

Aus der Chirurgischen Klinik der Universität Heidelberg

Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie
(Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Markus W. Büchler)

**Endotheliale Anreicherung: Konzept, Mechanismen und Potential
für Tumor-Targeting mithilfe von Antikörpern und Nanopartikeln**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doctor scientiarum humanarum (Dr. sc. hum.)

an der

Medizinischen Fakultät Heidelberg

der

Ruprecht-Karls-Universität

vorgelegt von

Nora Winkler

aus

Dresden

2018

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Wolfgang Herzog

Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. Eduard Ryschich

Für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	VII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Tumor-Targeting: Wahl der optimalen Strategie	1
1.2 Das hepatozelluläre Karzinom und intrahepatische Metastasen des Pankreaskarzinoms	2
1.3 Tumorendothel als vielversprechendes Target	5
1.4 Lokoregionale Applikation als therapeutische Option	9
1.5 Verwendung von Nanopartikeln in der Therapie und Diagnostik	12
1.6 Zielsetzung	15
2 MATERIAL UND METHODEN	17
2.1 Material	17
2.1.1 Laborausstattung, Verbrauchsmaterial und Software	17
2.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Kits	21
2.1.3 Zellmedium und Zusätze	23
2.1.4 Puffer	24
2.1.5 Antikörper	25
2.1.6 Nanopartikel	30
2.1.7 Mausstämme und Zelllinien	30
2.1.8 Humane Gewebeproben	30
2.2 Methoden	31
2.2.1 Experimente mit Tieren	31
2.2.2 Immunfluoreszenzfärbung und -mikroskopie	36
2.2.3 EC ₅₀ -Analyse	38
2.2.4 LSEC-Isolierung und Aviditätsbestimmung	40
2.2.5 Rat IgG total Ready-SET-Go! [®] -ELISA	41
2.2.6 Nanopartikelbeschichtung	42
2.2.7 Perfusionskammerexperimente	47
2.2.8 Liposomen-Charakterisierung	48
2.2.9 Zellkulturbedingungen	49

2.2.10	Bestimmung der Zellzahl (Neubauer-Zählkammer).....	50
2.2.11	Zellviabilitätsassay (Resazurinassay).....	50
2.2.12	Zellbindungsversuche	51
2.2.13	Statistische Auswertung.....	52
3	ERGEBNISSE	53
3.1	Antikörperselektion für die Nanopartikelbeschichtung	53
3.1.1	Endothelspezifische Antikörper werden durch eine sehr unterschiedliche Dynamik der Bindung am Endothel charakterisiert.....	53
3.1.2	Quantitative Dynamik der Antikörperbindung ist Gewebetyp-unabhängig	56
3.1.3	Konjugation von Antikörpern kann deren Bindung stark beeinträchtigen	59
3.2	Antikörperretention während der ersten intravaskulären Passage	61
3.2.1	Erstbeschreibung „endotheliale Anreicherung“: nahezu vollständige Retention selektierter endothelspezifischer Antikörper bei der ersten intravaskulären Passage.....	61
3.2.2	Effizienz der endothelialen Anreicherung ist Antikörperdosis-unabhängig.....	62
3.2.3	Effizienz der endothelialen Anreicherung ist Perfusionsgeschwindigkeits- abhängig.....	63
3.2.4	Starke Effizienzbeeinträchtigung der endothelialen Anreicherung durch wiederholte oder Langzeitinjektion von Antikörpern	64
3.2.5	EC ₅₀ der Antikörperbindung am histologischen Schnitt als Parameter für die Antikörperselektion zur Anwendung der endothelialen Anreicherung	66
3.2.6	Negativer Zusammenhang zwischen lokaler Antikörperkonzentration und Masse des perfundierten Gewebes bei endothelialer Anreicherung.....	66
3.2.7	Nachweis der intratumoralen Antikörperakkumulierung mithilfe der endothelialen Anreicherung <i>in vivo</i>	67
3.3	Anwendbarkeit von Nanopartikeln für das Konzept der endothelialen Anreicherung – primärer und sekundärer Mechanismus.....	68
3.3.1	Effizienz der Nanopartikelbeschichtung und Dialysekontrolle.....	68
3.3.2	Bindung beschichteter Nanopartikel am Endothel substantiell schlechter als Antikörperbindung.....	70
3.3.3	Beeinträchtigung der Bindung beschichteter MNP durch Scherkraft des Flusses	71
3.3.4	Charakterisierung beschichteter und unbeschichteter Liposomen.....	73
3.3.5	Zytotoxizität von purem DOX und DOX-Liposomen auf Tumorzellen <i>in vitro</i>	73

3.3.6	Hohe Effizienz der Anreicherung von CD49e-DOX-ILP im Zellsuspensionsmodell (primäre Bindung)	75
3.3.7	Bindung von DOX-ILP an CD49e-beschichteten Tumorzellen (sekundäre Bindung)	76
3.3.8	Zytotoxizität von DOX-ILP auf Tumorzellen <i>in vitro</i> (primäre und sekundäre Bindung)	78
3.3.9	Effizienz der endothelialen Anreicherung beschichteter Nanopartikel	80
3.3.10	Lokoregionale Applikation von ILP zeigt erhöhte Anreicherung <i>ex vivo</i> und <i>in vivo</i> (primärer Mechanismus)	83
4	DISKUSSION	87
4.1	Antikörperselektion anhand ihrer Bindungsdynamik	87
4.2	Phänomen endothelialer Antikörperanreicherung: Mechanismen und klinisches Potential	91
4.3	Nanopartikelbeschichtung: chemische Aspekte und Effizienz	97
4.4	Scherkraftabhängige Nanopartikelbindung	102
4.5	Zytotoxisches Potential eigener DOX-ILP	105
4.6	Übertragbarkeit des Konzepts der endothelialen Anreicherung auf Nanopartikel	110
4.7	Therapeutisches Potential lokoregional applizierter DOX-ILP	118
4.8	Klinische Relevanz der vorliegenden Studie	121
4.9	Schlussfolgerung	124
5	ZUSAMMENFASSUNG	126
6	LITERATURVERZEICHNIS	128
7	EIGENANTEIL AN DATENERHEBUNG UND –AUSWERTUNG UND EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN	157
	LEBENS LAUF	IX
	DANKSAGUNG	X
	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	XI

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A.	<i>Arteria</i>
Aco-HSA	<i>Aconitylated human serum albumin</i> – aconityliertes (<i>cis</i> -Aconitic anhydride) humanes Serumalbumin
ACUPA	<i>S,S-2-[3-[5-amino-1-carboxypentyl]-ureido]-pentanedioic acid</i>
A. dest.	<i>Aqua destillata</i> – destilliertes Wasser
AFP	Alphafetoprotein
BCLC	<i>Barcelona Clinic Liver Cancer</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> – Rinderserum-Albumin
CAM	<i>Cell Adhesion Molecule</i> – Zelladhäsionsmolekül
CEPAL	<i>Collaborative Enhancement of Paired Affinity Ligands</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DEB-TACE	<i>Drug Eluting Beads-TACE</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> – Desoxyribonukleinsäure
d.nm	Durchmesser in Nanometern
DOX	Doxorubicin
DOX-HCl	Doxorubicinhydrochlorid
DPBS	Dulbecco's PBS ohne Natriumhydrogencarbonat
EC ₅₀	<i>halfmaximal effective concentration</i> – halbmaximale effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme linked Immunosorbent Assay</i>
EPR	<i>Enhanced Permeability and Retention</i> – erhöhte Permeabilität und Retention
544 _{Ex} /580 _{Em}	Exzitation (Anregung) bei 544 nm/Emission bei 580 nm
Fab	<i>Fragment antigen binding</i> – Antigen-bindendes Fragment
fbAb	<i>fast binding antibodies</i> – schnell bindende Antikörper
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> – fetales Kälberserum
FOLFIRINOX	Fluoruracil, Leucovorin, Irinotecan und Oxiplatin

Abkürzungsverzeichnis

G	Gauge
<i>g</i>	Zentrifugalkraft
HAI	Hepatisch Arterielle Infusion
HCC	<i>Hepatocellular Carcinoma</i> – Hepatozelluläres Karzinom
HEPES	Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure
HER2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i> – humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2
i.a.	intraarteriell
IBF	Interfakultäre Biomedizinische Forschungseinrichtung
ICAM	<i>Intercellular cell adhesion molecule</i> – interzelluläres Zelladhäsionsmolekül
%ID/g	prozentualer Anteil der absoluten Injektionsdosis pro Gramm Gewebe
IgG	Immunglobulin G
ILP	Immunoliposomen
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
kDa	Kilodalton
KHB	Krebs-Henseleit-Puffer
LAS	<i>Left anterior segment</i> – linkes vorderes Segment
LED	<i>Light-Emitting Diode</i> – lichtemittierende Diode
LPS	<i>Left posterior segment</i> – linkes hinteres Segment
LSEC	<i>Liver sinusoidal endothelial cells</i> – Lebersinusoidale Endothelzellen
MACS	<i>Magnetic-Activated Cell Sorting</i>
MCAM	<i>Melanoma cell adhesion molecule</i> – Melanom-assoziiertes Zelladhäsionsmolekül
MFI	<i>Mean fluorescence intensity</i> – mittlere Fluoreszenzintensität
MNP	Magnetische Nanopartikel
mPa·s	Millipascalsekunde
MPS	Mononukleäres Phagozytensystem
Muc18	Zelloberflächen-Glykoprotein 18
MWCO	<i>Molecular weight cut off</i>

Abkürzungsverzeichnis

nab-Paclitaxel	<i>nanoparticle albumin bound paclitaxel</i> – Albumin-Nanopartikelgebundenes Paclitaxel
NaCl 0,9%	Isotone Natriumchloridlösung 0,9%
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> – phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PECAM	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule</i> – Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül
PEG	Polyethylenglycol
Plvap/PV1	<i>Plasmalemma vesicle associated protein-1</i> – Plasmalemma-Vesikelassoziiertes Protein 1
PSMA	<i>Prostate-specific membrane antigen</i> – Prostataspezifisches Membranantigen
RFA	Radiofrequenzablation
RGD	Arginin (R)-Glycin (G)-Asparaginsäure (D)-Aminosäuresequenz
RMS	<i>Right middle segment</i> – rechtes mittleres Segment
RPE	R-Phycoerythrin
RPS	<i>Right posterior segment</i> – rechtes hinteres Segment
s.c.	subkutan
SD	<i>Standard Deviation</i> – Standardabweichung
SIRT	Selektive Interne Radiotherapie
SNP	Superparamagnetische Nanopartikel
TACE	Transarterielle Chemoembolisation
TAE	Transarterielle Embolisation
TEM	Tumorendothelmarker
Upm	Umdrehungen pro Minute
V.	<i>Vena</i>
v.a.	vor allem
VCAM	<i>Vascular cell adhesion molecule</i> – vaskuläres Zelladhäsionsmolekül
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> – vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VEGFR	VEGF-Rezeptor

ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Abb. 1: Morphologische Unterschiede des Blutgefäßsystems in normalem und Tumorgewebe.....	8
Abb. 2: Experimenteller Aufbau der isolierten Leberperfusion <i>ex vivo</i>	33
Abb. 3: Schematische Darstellung der Lebersegmente und Gefäße.	36
Abb. 4: Workflow der EC ₅₀ -Analyse.....	39
Abb. 5: Beschichtung aminierter MNP.....	43
Abb. 6: MNP-Varianten.	44
Abb. 7: Schematischer Aufbau beschichteter MNP und Liposomen.	46
Abb. 8: Primärer und sekundärer Mechanismus der Nanopartikelanreicherung am Endothel.....	47
Abb. 9: Experimenteller Aufbau der MNP- und Antikörperperfusion auf histologischen Gewebeschnitten.....	48
Abb. 10: Bindung endothelspezifischer Antikörper in Mausgewebe.	54
Abb. 11: Bindung endothelspezifischer Antikörper in humanem Gewebe I.	55
Abb. 12: Bindung endothelspezifischer Antikörper in humanem Gewebe II.	56
Abb. 13: EC ₅₀ endothelspezifischer Antikörper nach 15 min in normaler Leber.	57
Abb. 14: EC ₅₀ von fbAb in unterschiedlichen Gewebetypen.....	58
Abb. 15: Avidität endothelspezifischer Antikörper zu LSEC.....	59
Abb. 16: Einfluss der Antikörperkonjugation auf das Bindungsverhalten.	60
Abb. 17: Endotheliale Anreicherung selektierter endothelspezifischer Antikörper.....	61
Abb. 18: Antikörperdosis-unabhängige endotheliale Anreicherung.	62
Abb. 19: Perfusionsgeschwindigkeits-abhängige endotheliale Anreicherung.....	63
Abb. 20: <i>Whole-mount</i> -Mikroskopie des perfundierten Lebergewebes.	64
Abb. 21: Reduktion der endothelialen Anreicherung durch wiederholte Injektion.....	65
Abb. 22: Reduktion der endothelialen Anreicherung durch Langzeitinjektion.	65
Abb. 23: Zusammenhang zwischen endothelialer Anreicherungsrate und EC ₅₀	66
Abb. 24: Lokale Antikörperkonzentration in Abhängigkeit der Masse des perfundierten Gewebes.	67
Abb. 25: Biodistribution von ¹²⁵ I-konjugiertem anti-CD146 (ME-9F1) nach i.a.-Applikation <i>in vivo</i>	68

Abb. 26: Beschichtungseffizienz von MNP und Liposomen.	69
Abb. 27: Dialysekontrollen zur Liposomenbeschichtung.	69
Abb. 28: Endothelbindung beschichteter MNP.	71
Abb. 29: Scherkraftabhängige Endothelbindung beschichteter MNP.	72
Abb. 30: Zytotoxizität von purem und liposomalem DOX auf Tumorzellen <i>in vitro</i>	74
Abb. 31: Antikörper-/DOX-ILP-Bindung an Hep55.1C-Zellen <i>in vitro</i>	76
Abb. 32: Sekundärantikörper-/DOX-ILP-Bindung an CD49e-Hep55.1C-Zellen <i>in vitro</i>	77
Abb. 33: Zytotoxizität von Sekundärantikörper-DOX-ILP und purem DOX-HCl auf Tumorzellen <i>in vitro</i> (sekundärer Mechanismus).	79
Abb. 34: Zytotoxizität von DOX-ILP und purem DOX-HCl auf Tumorzellen <i>in vitro</i> (primärer und sekundärer Mechanismus).	79
Abb. 35: Effizienz der endothelialen Anreicherung beschichteter MNP.	80
Abb. 36: Endotheliale Anreicherung von DOX-ILP.	82
Abb. 37: Visualisierung der DOX-ILP-Endothelbindung.	82
Abb. 38: Erhöhte ILP-Anreicherung nach lokoregionaler Applikation <i>ex vivo</i>	84
Abb. 39: Erhöhte ILP-Anreicherung im Tumor nach lokoregionaler Applikation <i>in vivo</i>	86
Abb. 40: Optimales Partikeldesign – eine komplexe Angelegenheit.	117
Tab. 1: Primäre anti-Maus-Antikörper für die deskriptive Analyse, Aviditäts-Analyse und <i>ex vivo</i> -Perfusion.	25
Tab. 2: Antikörper für die deskriptive Analyse in Humangewebe.	26
Tab. 3: Antikörper für die EC ₅₀ -Analyse in Mausgewebe.	27
Tab. 4: Antikörper für die Nanopartikelbeschichtung.	28
Tab. 5: Antikörper für Experimente mit Nanopartikeln.	29
Tab. 6: Antikörper für Zellbindungsversuche.	29
Tab. 7: Einfluss der RPE-Konjugation auf das Bindungsverhalten verschiedener Antikörper.	60
Tab. 8: Vergleich beschichteter und unbeschichteter Liposomen.	73
Tab. 9: Histologische Überprüfung der endothelspezifischen DOX-ILP-Anreicherung nach Perfusion <i>ex vivo</i>	83

1 EINLEITUNG

1.1 Tumor-Targeting: Wahl der optimalen Strategie

Für diverse Tumoren ist bekannt, dass eine Substanzanreicherung über die spezifische Bindung von Antikörpern oder ihrer Fragmente an Tumormarkern erfolgen und somit gezielte Krebstherapie durchgeführt werden kann. Dieser Ansatz wird Tumor-Targeting genannt und findet beispielsweise über PSMA im Prostatakarzinom (Tagawa *et al.*, 2013; Zechmann *et al.*, 2014) oder den HER2/neu-Rezeptor im Mammakarzinom (Baselga *et al.*, 2012; Cobleigh *et al.*, 1999) Anwendung. Für die gezielte Therapie neuroendokriner Tumoren mit Lebermetastasen hat sich der Somatostatinrezeptor als geeignetes Zielmolekül erwiesen (Kratochwil *et al.*, 2014; Miederer *et al.*, 2008). Antikörper-Arzneimittel-Konjugate haben die Targeting-Kapazitäten von Antikörpern zusätzlich erweitert (Beck und Reichert, 2014), da sie die Spezifität der Antikörperaffinität für Zelloberflächenproteine mit einer therapeutischen Ladung kombinieren (Gill *et al.*, 2017). Um den Transport zum Tumor zu ermöglichen, werden Targeting-Antikörper systemisch appliziert, sodass sie über die Blutbahn den Tumor erreichen. Aufgrund ihrer geringen Gewebe-Penetrationsrate (Thurber *et al.*, 2008) verweilen sie jedoch bis zu mehreren Tagen im Blutkreislauf (Rudnick *et al.*, 2011), was oft zu Nebenwirkungen unterschiedlicher Intensität führt, darunter Bluthochdruck, Diarrhö, gastrointestinale Blutungen und Thrombembolie (Kroschinsky *et al.*, 2017).

Für zirkulierende Arzneimittel sind tumorassoziierte Endothelzellen hingegen wesentlich besser zugänglich als Tumorzellen (Molema, 2005). Da außerdem Neovaskularisierung v.a. ein Merkmal vieler, besonders aggressiver, Krebsarten ist (Folkman, 2007; Neri, 2003), gilt das Tumorblutgefäßsystem als direktes Angriffsziel bzw. attraktiver Vermittler therapeutischer Substanzen (Cesca *et al.*, 2013). Desweiteren könnten Tumorgefäßgerichtete Antikörper, im Gegensatz zu Tumorzelloberflächenantigen-spezifischen Antikörpern, für unterschiedliche Krebsarten eingesetzt werden (Steiner und Neri, 2011). Obwohl mittlerweile eine Vielzahl vaskulärer Therapieansätze existiert, sind nur *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF)-gerichtete Therapien, beispielsweise mittels Bevacizumab oder Ramucirumab, zur Behandlung verschiedener Tumoren in der Klinik zugelassen. Doch auch diese Arzneimittel bewirken nur einen moderaten Überlebensvorteil (Aprile *et al.*, 2016; Baxter *et al.*, 2018). Das Potential tumorvaskulären Targetings kann durch die

Verwendung von Nanopartikeln weiter verbessert werden. Diese ermöglichen aufgrund ihrer Geometrie eine multivalente Bindung des Endothels (Atukorale *et al.*, 2017) und können das Therapeutikum in höherer Dosis bzw. als Kombinationspräparate zum Wirkort transportieren (Myerson *et al.*, 2015).

Ein weiterer Ansatz zur Erhöhung der lokalen intravaskulären Konzentration eines Arzneimittels ist die lokoregionale Applikation der Targeting-Substanz in die tumorversorgende Arterie. Dies erhöht nachweislich auch die lokale intratumorale Konzentration und trägt zu besseren Resultaten von Chemo- und Strahlentherapie bei (Goi *et al.*, 2015; Kratochwil *et al.*, 2010). Derzeit kann jedoch keine der vorhandenen Therapien das Problem der systemischen Arzneimittelzirkulation mit den daraus resultierenden Nebenwirkungen sowie die unter Umständen notwendige Reduktion der therapeutischen Konzentration umgehen (Kroschinsky *et al.*, 2017). Selbst hepatisch arterielle Infusion (HAI) birgt die beschriebene Problematik (D'Angelica *et al.*, 2015). In der Klinik bereits eingesetzte lokoregionale Methoden, wie Transarterielle Chemoembolisation (TACE) und Selektive Interne Radiotherapie (SIRT), nutzen Mikropartikel zur Embolisation der Blutgefäße, wodurch eine systemische Zirkulation therapeutischer Substanzen größtenteils verhindert werden kann (Liao *et al.*, 2013; Petitguillaume *et al.*, 2014).

1.2 Das hepatozelluläre Karzinom und intrahepatische Metastasen des Pankreaskarzinoms

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) gehört zu den am besten vaskularisierten Tumorentitäten (Bishayee und Darvesh, 2012). Im Gegensatz zu normaler Leber, welche lediglich zu etwa einem Fünftel bis Drittel von der *A. hepatica* versorgt wird (Lautt, 2009), erfolgt die Blutversorgung in HCC ausschließlich oder hauptsächlich arteriell, wobei der arterielle Anteil vom Differenzierungsgrad sowie der Tumorgröße abhängig ist (Yamamoto *et al.*, 2001). Mit diesen Eigenschaften prädestiniert sich HCC für den Tumorgefäß-gerichteten Therapieansatz und die lokoregionale Applikation therapeutischer Substanzen. Da daher für diese Arbeit mit einem, in der AG Ryschich bereits seit langem etablierten, murinen HCC-Modell gearbeitet wurde, soll an dieser Stelle das Krankheitsbild dieser Tumorentität näher charakterisiert werden.

Das HCC bildet sich direkt aus Hepatozyten und ist verantwortlich für 85-90% aller primären Lebertumoren (Ozakyol, 2017). Es repräsentiert das sechsthäufigste Krebsleiden weltweit,

mit ca. 782000 Neuerkrankungen (2012) jährlich (Ferlay *et al.*, 2015), wobei besonders Süd-/Ostasien sowie Westafrika als Hochrisikogebiete gelten. Die Inzidenz in Europa ist mit 6,2 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner jährlich vergleichsweise niedrig (Ferlay *et al.*, 2013). Dennoch wird beispielsweise in Großbritannien mit einem Anstieg der HCC-assozierten Mortalitätsrate bei Männern um 14% von 2006 bis 2025 gerechnet (Olsen *et al.*, 2008). Weltweit ist HCC die zweithäufigste Ursache Krebs-assoziierter Todesfälle (745000 Todesfälle in 2012) (Ferlay *et al.*, 2015). Auch die altersstandardisierte, stadienunabhängige 5-Jahresüberlebensrate nach Erstdiagnose ist mit 10-20% sowohl in Industrie- als auch Schwellen- und Entwicklungsländern generell schlecht (Allemani *et al.*, 2015).

Chronische Leberschädigung ist die Hauptursache für die Entstehung eines HCC. Die geographischen Unterschiede in dessen Inzidenz spiegeln jedoch den Einfluss viraler, genetischer, metabolischer sowie Umweltfaktoren wider (Childs *et al.*, 2013). Die wichtigsten Risikofaktoren für HCC in Hochinzidenz-Regionen sind Hepatitis B und Aflatoxin B1. In Niedriginzidenz-Regionen wie Westeuropa hingegen tragen chronische Hepatitis C sowie Alkoholabusus hauptsächlich zur Ausbildung dieses Tumors bei (Forner *et al.*, 2012). Eine andauernde Exposition der oben genannten Risikofaktoren führt in der Regel zu einer chronischen Leberschädigung, welche wiederum zu einem zirrhotischen Umbau des Lebergewebes beiträgt (El-Serag und Rudolph, 2007). Das Krankheitsbild der Leberzirrhose ist mit erhöhter Inzidenz des HCC assoziiert (El-Serag und Rudolph, 2007), wobei HCC gleichzeitig als Haupttodesursache bei Patienten mit Leberzirrhose gilt (Alazawi *et al.*, 2010). Zusätzlich gilt das metabolische Syndrom mit klinischen Manifestationen wie Diabetes mellitus oder Fettleibigkeit als Risikofaktor, v.a. in der westlichen Welt (Polesel *et al.*, 2009; Welzel *et al.*, 2011). Diabetes wird dabei auch als unabhängiger Risikofaktor betrachtet (Schlesinger *et al.*, 2013). Die rasch steigende Zahl von Patienten mit diesen Erkrankungen wird daher mit dem Anstieg der HCC-Inzidenz in Industriestaaten assoziiert (Ozakyol, 2017). Liegt eine chronische Leberschädigung durch genetische Prädisposition, Hepatitiden oder Alkohol vor, wird eine regelmäßige (aller sechs Monate) ultrasonographische Untersuchung angeraten, wodurch ein HCC im Frühstadium detektiert werden kann (Malek *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2004). Desweiteren gibt es die Möglichkeit der Alphafetoprotein (AFP)-Bestimmung als Tumormarker im Serum, wobei sich diese Methode zur HCC-Früherkennung als unsensitiv herausgestellt hat (Chen *et al.*, 2003; Malek *et al.*, 2014) und im klinischen Alltag nur begrenzt eingesetzt werden kann. Generell ist die Prognose eines HCC-Patienten

deutlich besser, wird die Diagnose während eines Screenings gestellt und nicht erst nach Auftreten von Symptomen (Llovet *et al.*, 2003). Insbesondere aufgrund der heterogenen Symptomatik von HCC kommt es bei fehlender Vorgeschichte jedoch zu einer vergleichsweise späten Diagnose, oft erst in inoperablem Stadium (Park *et al.*, 2015).

Trotz schlechter durchschnittlicher Prognose hängt die individuelle Prognose auch bei HCC entscheidend vom Tumorstadium bei Erstdiagnose ab. Zur Beurteilung des Schweregrades und entsprechender Therapieempfehlungen existieren für HCC eine Reihe unterschiedlicher Stagingmodelle, von denen die *Barcelona Clinic Liver Cancer* (BCLC)-Klassifikation die in Europa am weitesten verbreitete ist (Childs *et al.*, 2013). Diese berücksichtigt sowohl die Leberfunktion als auch den Patientenstatus (Llovet *et al.*, 1999). Nach der BCLC-Klassifikation eignen sich HCC-Patienten im (sehr) frühen Stadium für eine potentiell kurative Therapie durch Transplantation (70% 5-Jahresüberlebensrate) (Doyle *et al.*, 2012), Teilresektion oder Radiofrequenzablation (RFA; 30-50% 5-Jahresüberlebensrate) (Lee *et al.*, 2006; Sucandy *et al.*, 2016). Die Wahl der kurativen Methode richtet sich dabei nach der potentiellen Multifokalität des Tumors, vorliegender Leberfunktion (Child-Pugh A-B) sowie assoziierter Erkrankungen (Forner *et al.*, 2012). Bei inoperablen Tumoren mit verminderter Leberfunktion kommen nur noch lokal ablative Therapien, wie z.B. perkutane Ethanolinjektion (Ansari und Andersson, 2012) in Frage. Die einzigen palliativen Behandlungsoptionen, die nachweislich zu verbessertem Überleben beitragen, sind TACE bei intermediärem, inoperablem HCC (Bruix *et al.*, 2011) sowie systemische Therapie mit dem Multikinase-Inhibitor Sorafenib bei Patienten mit fortgeschrittenem HCC (Lin *et al.*, 2012; Llovet *et al.*, 2008). Mögliches Potential wird seit kurzem auch Lenvatinib, ebenfalls ein Multikinase-Inhibitor, zugeschrieben (Kudo *et al.*, 2018). Als neue vielversprechende Behandlungsstrategie ist zudem Immuntherapie momentan von großem Interesse in der HCC-Forschung (El-Khoueiry, 2017). Nivolumab, ein *Programmed cell death protein 1*-Checkpoint-Inhibitor, zeigte beispielsweise antitumorale Aktivität sowie vielversprechende Überlebensdaten von Patienten mit fortgeschrittenem HCC (El-Khoueiry *et al.*, 2017). Im HCC-Endstadium, welches mit deutlicher Verschlechterung des Patientenstatus sowie Symptomen von Leberversagen (Child-Pugh C), vaskulärer Invasion oder extrahepatischer Manifestierung assoziiert ist, steht nur noch symptomatische Therapie im Vordergrund (Cabrera und Nelson, 2010; Llovet *et al.*, 1999). Aufgrund der wenigen verfügbaren Behandlungsoptionen bei fortgeschrittenem HCC werden daher multidisziplinäre und

innovative Therapieansätze, die ein verlängertes Überleben der betroffenen Patienten gewährleisten können, dringend benötigt.

In der Leber kann sich nicht nur HCC als Primärtumor ausbilden, sondern sie stellt auch ein typisches Organ der Metastasierung anderer gastroenterologischer Tumoren dar (de Ridder *et al.*, 2016). Sich neu bildende, mikroskopisch kleine Lebermetastasen werden dabei, wie normale Leber, hauptsächlich portalvenös mit Blut versorgt. Die Versorgung etablierter makroskopischer Lebermetastasen erfolgt hingegen, wie in HCC, hauptsächlich mit arteriellem Blut (Breedis und Young, 1954; Dezso *et al.*, 2009). Der Großteil detektierter Lebermetastasen stammt aus dem kolorektalen Karzinom. Die Leber ist außerdem Hauptmetastasierungsort des Pankreaskarzinoms (de Ridder *et al.*, 2016).

Das Pankreaskarzinom gilt noch immer als die aggressivste Tumorentität mit einer 5-Jahresüberlebensrate von nur 3% bei Diagnose mit Fernmetastasierung, was aufgrund der späten Symptomatik in den meisten Fällen zutrifft (Siegel *et al.*, 2018). Bei lokalisiertem Tumorstadium gilt der operative Ansatz als die momentan einzig kurative Therapieoption, wobei dies nur für eine Minderheit der Patienten überhaupt in Frage kommt (Hackert und Buchler, 2013). Sobald jedoch hepatische Metastasen detektiert werden, ist palliative Chemotherapie mit FOLFIRINOX oder nab-Paclitaxel mit Gemcitabin der derzeitige Standard (Bellon *et al.*, 2016). Das mittlere Überleben beträgt jedoch auch dann nur 11,1 Monate (Conroy *et al.*, 2011). Aufgrund der beschriebenen schlechten Prognose, der mit HCC vergleichbaren Blutversorgung und weil in der AG Ryschich ebenfalls ein Mausmodell für Lebermetastasen pankreatischen Ursprungs etabliert ist, umfassten einige der in dieser Arbeit vorgestellten Experimente auch diese Tumorentität.

1.3 Tumorendothel als vielversprechendes Target

Als potentiell vielversprechendes Target für die HCC-Therapie hat sich das Tumorendothel herausgestellt. Grund für diesen Ansatz ist einerseits die starke Abhängigkeit der HCC-Progression von einem kontinuierlichen Wachstum der Blutgefäße sowie der Bildung eines Tumormikrozirkulationssystems. Nur so kann eine ausreichende Sauerstoff- und Nährstoffversorgung sowie die Abfuhr von Stoffwechselprodukten des soliden Tumors gewährleistet werden (Ryschich *et al.*, 2002; Siemann, 2005). Andererseits weisen neugebildete Tumorblutgefäße sowohl strukturelle als auch funktionelle Anomalien auf, z.B. durch VEGF-Überexpression (Zhu *et al.*, 2011).

Das tumorversorgende Gefäßsystem fungiert für eine Reihe unterschiedlicher Therapieansätze als Angriffspunkt. Der antiangiogene Ansatz hat das Ziel, die Neubildung von Tumorblutgefäßen zu verhindern und wird bereits in der Therapie verschiedener solider Tumoren erfolgreich angewandt (Giantonio *et al.*, 2007; Sridhar und Shepherd, 2003). Im Falle eines fortgeschrittenen HCC wird beispielsweise Sorafenib unter anderem zur Inhibierung des VEGF-Signalwegs verwendet (Llovet *et al.*, 2008). Der gefäßzerstörende (*vascular disruptive*) Ansatz richtet sich indessen gegen bereits bestehende Gefäße und sorgt für Ischämie und Nekrose im Tumor, z.B. TACE bei intermediärem HCC (Siemann, 2005). Zudem gibt es den weitergefassten gefäßgerichteten Ansatz, der auch in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz kam. Dabei steht nicht die Schädigung des tumorvaskulären Systems im Vordergrund, sondern dessen Nutzung für bildgebende Verfahren sowie tumorspezifische Arzneimittelanreicherung. Für einige Endothelmarker liegen dazu bereits Studien vor, beispielsweise $\alpha_5\beta_1$ -Integrin (Magnussen, 2005) sowie $\alpha_v\beta_3$ -Integrin (Zhang, 2006), Plvap/PV1 (Tichauer *et al.*, 2014) oder TEM8 (Kuo *et al.*, 2014). Da die Grundlage dieser Therapie in den phänotypischen Unterschieden zwischen normalem und Tumorendothel liegt, wird im Folgenden genauer darauf eingegangen.

Normale Leber besitzt aufgrund ihrer sowohl portalvenösen (70%) als auch arteriellen (30%) Gefäßzufuhr (Wang und Frober, 2009) arterielle und venöse Endothelien. Das spezialisierte Endothel der Lebersinusoiden überwiegt jedoch und hat aufgrund seiner spezifischen Funktion eine besondere Bedeutung. Lebersinusoidale Endothelzellen (LSEC) fungieren als Schnittstelle zwischen Blutzellen auf der einen und Hepatozyten auf der anderen Seite. Durch ihr diskontinuierliches Erscheinungsbild (Fenestrierung) sowie diskontinuierliche Basalmembran stellen sie das permeabelste Endothel im Menschen dar (Poisson *et al.*, 2017). Aufgrund ihrer Schnittstellenfunktion und Permeabilität nehmen LSEC eine besondere immunologische Bedeutung ein, da sie so zum Austausch, aktiver Aufnahme sowie Degradation von Molekülen in der Lage sind (Braet und Wisse, 2002). Die hohe endozytotische Aktivität der LSEC begründet sich durch das Vorhandensein einer Reihe hoch affiner Endozytose-Rezeptoren. Von besonderer Bedeutung sind dabei die *Scavenger*-Rezeptoren Stabilin-1 und -2, die für die Degradation von Makromolekülen wie Lipoproteinen oder Hyaluronan aus dem Blut verantwortlich sind (Sorensen *et al.*, 2012). Durch die Expression von Fc γ -Rezeptor IIb2 sorgen LSEC für die Eliminierung kleiner, zirkulierender Immunkomplexe und sind daher immunologisch besonders relevant

(Smedsrod *et al.*, 2009). Ihr hoher Differenzierungsgrad erklärt die spezifische Oberflächenexpression von LSEC, welche im Rahmen der HCC-Ausbildung jedoch verloren geht (insbesondere Verlust von Stabilin-1 und -2, Lyve-1 und CD32b) und somit die Grundlage für Expressionsunterschiede zwischen Tumor- und Lebersinusendothel bildet (Geraud *et al.*, 2013).

Im Gegensatz zu Lebergewebe ist HCC-Gewebe bereits in frühem Stadium hauptsächlich arteriell perfundiert (Semela und Dufour, 2004). Wie auch in anderen Tumorentitäten, sind in HCC sowohl morphologische als auch funktionelle Anomalien des Gefäßsystems zu verzeichnen. Morphologisch kommt es in HCC zur Störung der normalen Gefäßorganisation und stattdessen zu chaotischer Anordnung der Gefäße (Aird, 2009). Charakteristisch sind Dilatation, zunehmende Verzweigung, gewundener Verlauf, Aussackungen der Tumorblutgefäße (Wu *et al.*, 2013) und ein loserer Gefäßverband (Fukumura *et al.*, 1997). Es kommt weiterhin zum Verlust funktioneller Lymphgefäße (Leu *et al.*, 2000), vermindertem Kontakt zwischen Perizyten und Endothelzellen (Morikawa *et al.*, 2002) sowie zu einer unverhältnismäßig dicken oder fehlenden Basalmembran (Baluk *et al.*, 2003). Die morphologischen Unterschiede zwischen normalen und Tumorblutgefäßen sind in Abb. 1 (nach Aird, 2009) dargestellt.

Morphologische Veränderungen beeinflussen wiederum die funktionellen Eigenschaften des Tumorendothels, wobei die erhöhte vaskuläre Permeabilität im Mittelpunkt steht. Diese führt beispielsweise zur Erhöhung des interstitiellen hydrostatischen Drucks (McDonald und Baluk, 2002). Durch die vorliegenden variablen anatomischen Verhältnisse ist das Tumorblutgefäßsystem zudem unterschiedlichen Strömungsgeschwindigkeiten unterworfen, wobei diese und damit auch die Wandscherkräfte (*shear stress*) aufgrund dilatierter Gefäße im Durchschnitt reduziert sind (Jain, 1988; Schmidt *et al.*, 2000). Auf molekularer Ebene kommt es zur Veränderung des Oberflächenexpressionsprofils und somit phänotypischer Umprogrammierung der Endothelzellen. Damit stellt das Tumorendothelium in HCC ein plastisches System dar, welches von Änderungen im Mikromilieu beeinflusst wird (Salnikova *et al.*, 2013; Takeichi *et al.*, 2012).

Der Begriff „Kapillarisation“ fasst den Verlust der Fenestrierung, die Ausbildung einer Lamininbasalmembran sowie die modifizierte Expression von Oberflächenmarkern von LSEC zusammen (Yang und Poon, 2008). Dazu zählen eine erhöhte Integrin- und verminderte ICAM-1-Expression sowie die verstärkte angiogene, gerinnungsfördernde und fibrinolytische

Kapazität (Wu *et al.*, 2008). Während der Kapillarisation überexprimierte Oberflächenmarker werden auch als Tumorendothelmarker (TEM) bezeichnet. Da diese sowohl ein hohes diagnostisches als auch therapeutisches Potenzial aufweisen, sind bereits einige TEM gut charakterisiert, insbesondere VEGF-Rezeptoren (VEGFR) sowie verschiedene endotheliale Integrine (Nanda und St Croix, 2004; Walton *et al.*, 2000). Für die Anwendung des gefäßgerichteten Ansatzes zur Anreicherung von Antikörpern bzw. damit beschichteter Trägermoleküle, ist die Auswahl intravasal gut zugänglicher TEM notwendig (Oh *et al.*, 2004; Ruoslahti, 2002).

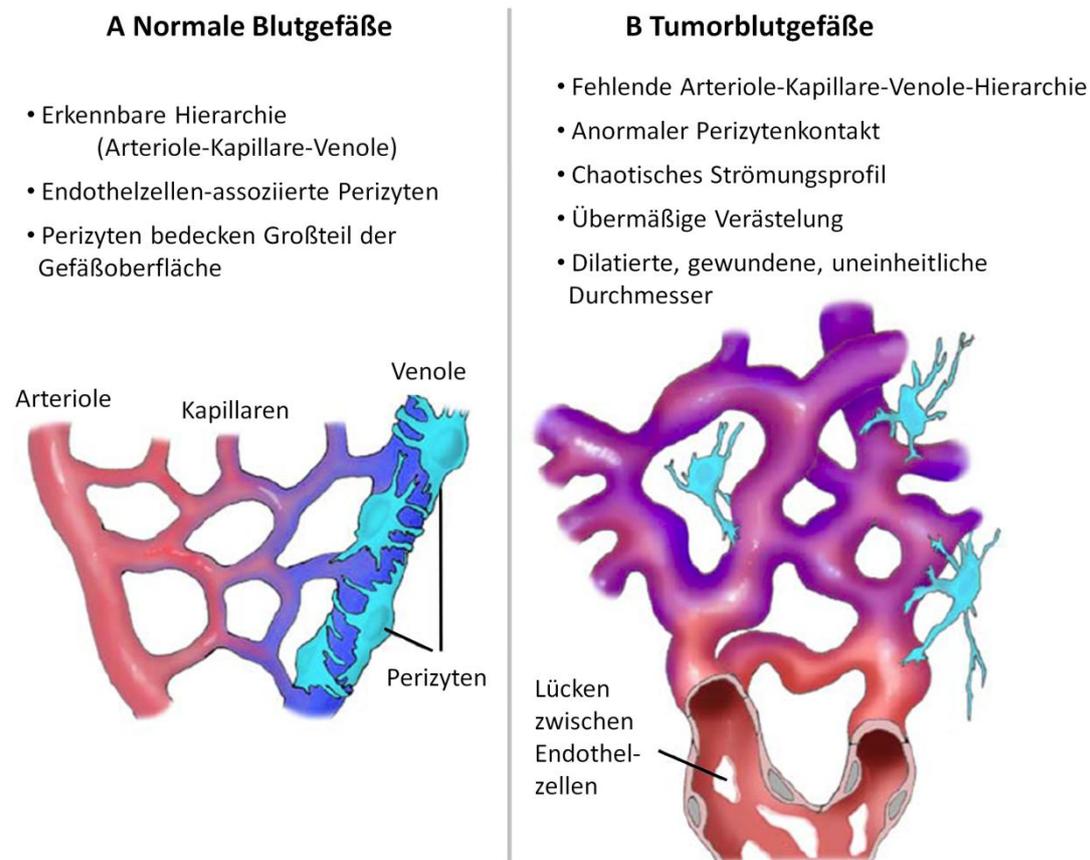


Abb. 1: Morphologische Unterschiede des Blutgefäßsystems in normalem und Tumorgewebe. Vergleich der Eigenschaften von normalen (A) und Tumorblutgefäßen (B). Aus Gründen der Veranschaulichung sind Perizyten nur auf normalen Venolen, nicht auf Kapillaren dargestellt (nach Aird, 2009).

Im Folgenden werden die in dieser Studie untersuchten, überexprimierten Endothelmarker vorgestellt, mit Fokus auf die Überexpression in humanem und murinem HCC: CD146, auch bekannt als MCAM oder Muc18, wird auf Endothelzellen exprimiert und ist in Tumoren, v.a. auch im hier verwendeten murinen HCC-Modell, nachweislich überexprimiert (Jiang *et al.*, 2016; Thomann *et al.*, 2014). Auch seine essentielle Funktion während der Angiogenese als Teil des Rezeptorkomplexes von VEGFR-2 ist bereits beschrieben (Jiang *et al.*, 2012). CD31

(PECAM-1) ist ein interzelluläres Adhäsionsmolekül, das klassischerweise auf der Oberfläche endothelialer Zellen, aber auch verschiedener Leukozyten exprimiert wird (Woodfin *et al.*, 2007). Die Überexpression von CD31 in HCC-assozierten Blutgefäßen ist sowohl für Ratte (Wang *et al.*, 2010b) als auch Mensch in der Literatur beschrieben (Frachon *et al.*, 2001). CD49e (Integrin- α_5) ist ein weiteres Molekül, das eine wichtige Rolle in der Tumorigenese und Tumorangiogenese spielt (Li *et al.*, 2011). Im Mausmodell konnte beispielsweise ein langsames Wachstum α_5 -negativer Teratokarzinome (Taverna und Hynes, 2001) sowie verstärkte Expression auf Endothelzellen während der Tumorangiogenese (Parsons-Wingerter *et al.*, 2005) gezeigt werden. Zudem ist CD49e nachweislich in humanem HCC überexprimiert und mit schlechter Prognose assoziiert (Zhang *et al.*, 2015). Auch für CD105 (Endoglin) ist eine Überexpression am HCC-assozierten Endothel in Ratte (Wang *et al.*, 2010b) und Mensch (Benetti *et al.*, 2008) beschrieben, wobei CD105 ebenfalls von HCC-Zellen exprimiert wird (Li *et al.*, 2015). CD34 ist in humanem HCC überexprimiert und wird z.B. für die Evaluation der Blutgefäßdichte herangezogen (Poon *et al.*, 2002; Yao *et al.*, 2013). CD144 (vaskulär-endotheliales Cadherin) ist in verschiedenen Tumorendothelien überexprimiert (Breier *et al.*, 2014; Rezaei *et al.*, 2018) und in die HCC-Metastasierung involviert (Zhao *et al.*, 2016). CD309 (VEGFR-2) wird von aktivierten Endothelzellen verstärkt exprimiert und zeigt insbesondere im tumormikrovaskulären System eine erhöhte Expression, so auch in HCC (Roth *et al.*, 2007). Hohe CD309-Expression in humanem HCC korreliert zudem mit chronischer Hepatitis B sowie Zirrhose (Chu *et al.*, 2013). Ein mit der Entstehung, der Metastasierung sowie dem Infiltrationsprozess von HCC assoziierter Marker ist CD102 (ICAM-1), welcher sowohl von Tumorendothelien als auch von HCC-Zellen exprimiert wird (Zhu und Gong, 2013). CD151 wird ebenfalls sowohl auf HCC- (Ke *et al.*, 2009) als auch Tumorendothelzellen (Wadkin *et al.*, 2017) exprimiert und ist mit Krebszell-Invasivität und -Metastasierung assoziiert (Sadej *et al.*, 2009).

1.4 Lokoregionale Applikation als therapeutische Option

Unter lokoregionaler Tumorthherapie versteht man im Allgemeinen minimalinvasive therapeutische Eingriffe, wobei eine antitumorale Substanz, oft unter Ultraschallkontrolle, direkt bzw. in unmittelbarer Nähe des Tumors appliziert wird und so zum Tumorzelltod führt (Huo, 2011). Der größte Vorteil liegt dabei in der hohen Arzneimittelanreicherung im Tumor schon nach der ersten Passage und gleichzeitiger Umgehung einiger Arzneimittelresistenz-

Mechanismen, wie z.B. Arzneimittel-Efflux-Pumpen (Bouchahda *et al.*, 2011). Klinische Relevanz erhält eine lokoregionale Methode jedoch nur, wenn sie zu verstärkter Arzneimittelexposition von Tumorzellen führt und gleichzeitig (im Fall der Leber) extrahepatisches Gewebe sowie gesunde Hepatozyten vor unerwünschter Arzneimittelwirkung schützt (Bouchahda *et al.*, 2011). Die besondere arterielle Blutversorgung von HCC und makroskopischen Lebermetastasen bietet daher günstige Voraussetzungen für den lokoregionalen Zugang über die *A. hepatica*.

Dieser kann ausgenutzt werden, um durch Embolisation der beteiligten Blutgefäße eine ischämische Tumornekrose zu induzieren. Dies ist als transarterielle Embolisation (TAE) bekannt und geschieht mithilfe einer embolisierenden Substanz, z.B. Gelfoam (Bruix *et al.*, 2005). Bei Kombination mit vorangestellter Injektion eines Chemotherapeutikums spricht man von TACE (Bruix *et al.*, 2005). Als chemotherapeutische Substanz werden beispielsweise Cisplatin, Epirubicin oder Doxorubicin (DOX) verwendet, welche man meist in Lipiodol suspendiert (Kasai *et al.*, 2013; Llovet und Bruix, 2003; Sottani *et al.*, 2012). Dies führt zu verbesserter Retention des Wirkstoffs im Tumor und damit verlängerter Kontaktzeit zwischen der chemotherapeutischen Substanz und den Krebszellen (de Baere *et al.*, 2016). DOX ist ein aus *Streptomyces*-Bakterien gewonnenes Anthracyclin der Klasse I und gilt als eines der effektivsten Zytostatika (Barenholz, 2012). Freies DOX gelangt durch Diffusion in die Zellen, wo es mittels Translokation durch die Kernporen in den Nukleus eindringen kann (Kiyomiya *et al.*, 2001). Durch Interkalierung in die DNA und Bindung der Topoisomerase II verhindert DOX die weitere Nukleinsäuresynthese und kann DNA-Doppelstrangbrüche verursachen (Minotti *et al.*, 2004). Durch Bildung freier Radikale kann DOX außerdem eine Zellmembran-schädigende Wirkung haben, was die Hauptursache für unerwünschte die Kardiotoxizität und gleichzeitig einer der Gründe für die effektive Tumorzell-schädigende Wirkung ist (Gewirtz, 1999). TACE ist die momentan empfohlene lokoregionale Methode bei inoperablem HCC, kann aber auch als „Überbrückungstherapie“ bis zum Zeitpunkt einer chirurgischen Intervention oder Transplantation fungieren (de Lope *et al.*, 2012). Die Art und Weise der Durchführung von TACE ist zwischen den unterschiedlichen Behandlungszentren jedoch extrem heterogen, wobei Variablen wie die Art und Dosis des Chemotherapeutikums, die Nutzung von Lipiodol und die Art der embolisierenden Substanz, der Verabreichung, des Timings, der Selektivität sowie des Behandlungsplans eine entscheidende Rolle spielen (Cabrera und Nelson, 2010). Im Idealfall führt TACE zu Verringerung der Tumormasse,

symptomatischer Linderung sowie verbesserter Lebensqualität (Azizi *et al.*, 2011). Initial zur HCC-Therapie entwickelt, hat sich TACE auch als effizient in der Kontrolle von pankreatischen Lebermetastasen erwiesen (Vogl *et al.*, 2007). Obwohl TACE als effektiv in der Kontrolle von HCC gilt, wird sie nicht als kurative Methode betrachtet. Ein möglicher Grund dafür ist eine durch Ischämie ausgelöste neoangiogene Reaktion, wobei v.a. zirkulierendes VEGF von prognostischer Bedeutung ist (Sergio *et al.*, 2008). Für eine relativ neue Variante von TACE kommen sogenannte *Drug Eluting Beads* (DEB), direkt mit einem Zytostatikum beschichtete Embolisationspartikel, zum Einsatz. Für DEB-TACE wird momentan v.a. DOX verwendet, welches auf diese Weise kontrolliert, lokal freigesetzt wird und so in noch höherer Konzentration in den Tumorzellen, bei gleichzeitig reduzierter systemischer Toxizität, wirken soll (Burrel *et al.*, 2012; Do Minh *et al.*, 2017). Sowohl bei konventioneller als auch bei DEB-TACE beobachtet man jedoch als häufigste Nebenwirkung das Postembolisations-syndrom mit transientem Fieber, Abgeschlagenheit, Abdominalschmerzen und Übelkeit (Huang *et al.*, 2014).

SIRT ist im Gegensatz zu TACE keine Standardmethode für die Therapie des HCC, gilt aber bei intermediärem HCC und gleichzeitig fehlender Toleranz gegenüber TACE oder Sorafenib als effektiv (Quirk *et al.*, 2015; Sacco *et al.*, 2015). SIRT wird als zielgerichtete transarterielle Infusion von radioaktiven Mikrosphären definiert, wobei deren Administration, wie auch bei TACE, mittels Fluoroskopie-gesteuerter Infusion in die *A. hepatica* erreicht wird (Salem und Thurston, 2006). Da die verwendeten Mikrosphären in SIRT wesentlich kleiner sind (20-60 μm) als in TACE (100-500 μm) und somit tiefer in das Tumorblutgefäßsystem penetrieren, kommt es zwar zu einem embolisierenden Effekt, jedoch nicht zur vollständigen Okklusion beteiligter Blutgefäße (Salem und Lewandowski, 2013). Auch im Mechanismus der induzierten Zytotoxizität unterscheidet sich SIRT von TACE, da die tumorzellschädigende Wirkung hier vorrangig durch DNA-Doppelstrangbrüche erzielt wird (Mosconi *et al.*, 2015). Dies wird mithilfe des β -Emitters Yttrium-90 erreicht, der Gewebe in 2,5-11 mm Entfernung der Mikrosphärenlokalisierung schädigen kann (Guney, 2017) und ursprünglich für die Therapie von inoperablem Kolonkarzinom mit Lebermetastasen zugelassen wurde (Fidelman und Kerlan, 2015).

Bei der Anwendung von HAI steht nicht die Embolisation der tumorversorgenden Gefäße im Vordergrund, sondern die verstärkte, lokal begrenzte Anreicherung von Chemotherapeutika im Tumor. Dazu verwendete Substanzen müssen eine hohe hepatische Eliminierung schon

bei der ersten intravaskulären Passage und eine damit einhergehende niedrige systemische Exposition aufweisen (Kuan *et al.*, 1996), was idealerweise die Erhöhung der applizierten Dosis erlaubt. In diesem Zusammenhang zeigte beispielsweise Floxuridin eine höhere hepatische Extraktionsrate als 5-Fluorouracil (>90% versus <50%), was auch in einem besseren Verhältnis von hepatischer zu systemischer Exposition resultierte (Mocellin *et al.*, 2007). Eine Chemotherapie mittels HAI verlangt die Katheterisierung der *A. hepatica* (Ishikawa, 2009) und kann mittels Bolus-Injektion oder durch kontinuierliche Perfusion erfolgen (Cortesi *et al.*, 1994). Zur Behandlung des HCC gilt HAI derzeit aufgrund fehlender Daten von umfangreichen randomisierten klinischen Studien nicht als Standardmethode. Doch v.a. für Patienten mit fortgeschrittenem HCC, die bereits eine systemische Sorafenib-Chemotherapie erhalten haben, oder Patienten mit schlechter Leberfunktion gilt HAI als eine der wenigen verfügbaren Therapieoptionen (Obi *et al.*, 2015). Ein wesentlicher Vorteil von HAI gegenüber anderen lokoregionalen Methoden ist außerdem, dass die Tumorgroße, Multifokalität des Tumors sowie die Nähe zu großen Gefäßen keine Limitation darstellen (Nishikawa *et al.*, 2012). Aktuelle klinische Studien zur Anwendung von HAI in der HCC-Therapie werden jedoch fast ausschließlich im asiatischen Raum erhoben (He *et al.*, 2017; Sato *et al.*, 2017). Auch die in dieser Arbeit vorgestellten *in vivo*-Experimente basieren auf der HAI-Technik.

1.5 Verwendung von Nanopartikeln in der Therapie und Diagnostik

Defizite traditioneller diagnostischer und therapeutischer Substanzen konnten in den letzten Jahren durch Fortschritte in der Nanotechnologie angegangen werden, indem Nanopartikel mit spezifischen funktionellen Eigenschaften entwickelt wurden (Zamboni, 2005). Nanopartikel sind Partikel mit einer Größe von 1-100 nm und können im Gegensatz zu Einzelmolekül-Anwendungen mit einer Vielzahl zur Bildgebung verwendeter oder therapeutischer Substanzen beladen werden (Davis *et al.*, 2008). Die beschriebenen Anomalien des Blutgefäßsystems im Tumorgewebe, das Fehlen von Lymphgefäßen, erhöhte Steifheit der extrazellulären Matrix sowie erhöhter interstitieller Druck tragen gemeinsam zu einer höheren Permeabilität und Retention (EPR-Effekt) in soliden Tumoren wie HCC bei (Matsumura und Maeda, 1986). Im Gegensatz zu normalem Endothel, welches eine selektive Barriere bildet, erlauben Tumorendothelien die Extravasation, aber auch Retention von Makromolekülen mit einer Größe von 40-70 kDa (Azzi *et al.*, 2013). Dies ist insbesondere im

Hinblick auf die tumorspezifische Arzneimittelverabreichung ein wichtiger Aspekt. Um erfolgreich wirken zu können, müssen therapeutische Moleküle sowohl biologische als auch physische Barrieren überwinden, unter anderem den endothelialen Transport (Azzi *et al.*, 2013). Da die Hürden insbesondere für kleine Moleküle im anormalen Tumorblutgefäßsystem besonders hoch sind, wird versucht, durch Veränderung der Größe und Ladung von Trägermolekülen, den beschriebenen EPR-Effekt auszunutzen. Mit Eigenschaften wie verlängerter Plasmahalbwertszeit und verlangsamter Clearance sind Nanopartikel daher eine bewährte pharmazeutische Option für tumorspezifische Arzneimittelverabreichung (Fang *et al.*, 2011; Seymour *et al.*, 1995). Aufgrund des Schwellenwerts der renalen Clearance (40 kDa \approx 10 nm), sollten therapeutische Nanopartikel mindestens 10 nm groß sein (Venturoli und Rippe, 2005). Ein Größenlimit ist nicht definiert, allerdings gibt es Hinweise auf ein schlechteres Diffusionsvermögen großer Nanopartikel im Extrazellularraum (Dreher *et al.*, 2006).

Ein großes Hindernis hinsichtlich des Transports makromolekularer therapeutischer Substanzen zum Tumor stellt das Mononukleäre Phagozytensystem (MPS) dar, welches v.a. in der Leber und der Milz präsent ist (Gregoriadis, 2008; van Furth *et al.*, 1972). Dies kann insbesondere für die hepatische Nanopartikel-Applikation Probleme mit sich bringen. Die am weitesten verbreitete Strategie zur Reduktion der phagozytotischen Eliminierung ist die Modifizierung der Nanopartikel-Oberfläche durch die Konjugation mit Polyethylenglycol (PEG)-Ketten (Fang *et al.*, 2011). Die dadurch gebildete hydratisierte Barriere resultiert in einer sterischen Hinderung der Phagozytenbindung und führt damit zu verminderter MPS-Eliminierung bei gleichzeitiger Erhöhung der Plasmahalbwertszeit PEGylierter Nanopartikel (Allen *et al.*, 1991; Owens und Peppas, 2006).

Unter der Vielzahl vorhandener Partikel im Nanobereich sind unter anderem magnetische Nanopartikel (MNP) Gegenstand der Forschung. Ursprünglich wurden sie aufgrund ihrer intrinsischen magnetischen Eigenschaften v.a. zu diagnostischen Zwecken mittels Magnetresonanztomografie für das Tumor-Targeting unter Ausnutzung des EPR-Effekts entwickelt (Veiseh *et al.*, 2010). Jüngste Fortschritte in der Forschung haben für MNP, insbesondere superparamagnetische Nanopartikel (SNP), neue Wege für tumorspezifisches Targeting sowie die Arzneimittelverabreichung eröffnet (Hsu *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2017).

Weiterhin können Liposomen in Abhängigkeit ihrer Größe zu Nanopartikeln gezählt werden. Dies sind kugelförmige, in sich geschlossene Strukturen, die durch eine oder mehrere

konzentrische Lipiddoppelschichten, bestehend aus natürlichen oder synthetischen Phospholipiden, gebildet werden (Pisal *et al.*, 2010). Die sich im Zentrum bildende wässrige Phase erlaubt daher den Einschluss hydrophiler Substanzen, wie beispielsweise kleinmolekulare Chemotherapeutika (Gabizon *et al.*, 2006; Zamboni, 2005). So ist in kleinen unilamellaren Vesikeln eingeschlossenes, PEGyliertes liposomales DOX unter dem Namen DOXIL bzw. Caelyx (80-90 nm) zur Therapie von HIV-assoziiertem Kaposi-Sarkom, metastasierendem Ovarialkarzinom sowie anderen Tumorentitäten zugelassen (Northfelt *et al.*, 1997; Soloman und Gabizon, 2008; Tejada-Berges *et al.*, 2002). Die PEGylierung verleiht DOXIL eine wesentlich längere Halbwertszeit als freies DOX durch eine verlangsamte Eliminierung aus dem Plasma und sorgt so für eine erhöhte Bioverfügbarkeit im Tumor (Gabizon *et al.*, 2003). Die Stabilisierung durch PEG-Ketten verhindert außerdem die Wirkstofffreigabe während der Zirkulation im Blut, wodurch DOXIL deutlich weniger Nebenwirkungen auf gesunde Zellen hat als freies DOX. Das wesentlich geringere Verteilungsvolumen von liposomalem DOX begünstigt ebenfalls die Aufnahme in das Tumorgewebe (Gabizon *et al.*, 2003). Liposomale Verabreichung von DOX resultiert in wesentlich reduzierter Kardiotoxizität, kann jedoch Liposom-assoziierte Nebenwirkungen hervorrufen, insbesondere das sogenannte Hand-Fuß-Syndrom, welches in einigen Patienten ein Dosis-limitierender Faktor ist (Soloman und Gabizon, 2008).

Aktuelle Studien befassen sich insbesondere mit der Optimierung der Oberflächeneigenschaften von Nanopartikeln, um deren biologische Verfügbarkeit sowie Tumorspezifität zu verbessern. Hinsichtlich der Verbesserung spezifischer Arzneimittelverabreichung in den Tumor, hat sich v.a. auch die Nanopartikel-Beschichtung mit tumorspezifischen funktionellen Gruppen, wie kleine Moleküle, Peptide, Proteine oder Antikörper, als vorteilhaft erwiesen (ElBayoumi und Torchilin, 2009; Wang *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2016). Dabei tragen diese v.a. zu einer verbesserten Aufnahme der beschichteten Nanopartikel in die Tumorzellen über Rezeptor-vermittelte Endozytose bei (Bartlett *et al.*, 2007; Kirpotin *et al.*, 2006). Damit sind die meisten Nanopartikel bislang so konzipiert, dass sie an Moleküle binden, die an der Tumorzelloberfläche exprimiert sind. Einen potentiellen Nutzen für die HCC-Therapie zeigten beispielsweise *Epidermal Growth Factor*-Rezeptor-gerichtete Immunliposomen (ILP) (Gao *et al.*, 2012), AFP-gerichtete SNP (Chieh *et al.*, 2012) oder Asialoglykoprotein-Rezeptor-gerichtete DOX/Paclitaxel-Lactose-Albumin-Nanopartikel (Thao *et al.*, 2017), zumindest im Mausmodell. Dafür ist jedoch ein Transport des Nanopartikels durch die Gefäßwand mit

anschließender, zu den Tumorzellen gerichteter Diffusion in der extrazellulären Matrix erforderlich (Jain, 1990; Maeda *et al.*, 2013). Dabei muss außerdem eine für solide Tumoren übliche, durch Hypoxie hervorgerufene Diffusionsbarriere überwunden werden, was die Mobilität des Nanopartikels und somit die Verteilung der geladenen Substanzen beeinträchtigt (Minchinton und Tannock, 2006).

Der gefäßgerichtete Ansatz hingegen erlaubt laut Hypothese den direkten Zugang zur Oberfläche der Tumorendothelzellen nach systemischer Applikation von Nanopartikeln (Decuzzi und Ferrari, 2008; Lin *et al.*, 2010). Außerdem ermöglicht dieser Ansatz die Freisetzung des Therapeutikums direkt am Ort der Erkrankung (im Gegensatz zu systemischer Freisetzung) und trägt damit sowohl zur Erhöhung der therapeutischen Effizienz als auch zur Verringerung systemischer Nebenwirkungen bei (Kelley *et al.*, 2016). Ein nicht zu vernachlässigender Faktor ist jedoch das besondere intravaskuläre Verhalten beschichteter Nanopartikel. Im Gegensatz zu Einzelmolekülen hängt deren Bindungsverhalten zusätzlich von hydrodynamischen Kräften ab, wie es für die aviditätsabhängige Leukozytenbindung am Endothel bereits bekannt ist (Lin *et al.*, 2010). Die in Blutgefäßen natürlich vorkommenden Wandscherkräfte sind eine fluktuationsbedingte Kraft, die durch den Blutfluss auf die endotheliale Oberfläche ausgeübt wird. Sie sind proportional zur Durchblutungsintensität sowie der Blutviskosität und indirekt proportional zum Gefäßradius (Davies, 1995). Wandscherkräfte haben generell einen eher negativen Effekt auf die Endothelbindung beschichteter Nanopartikel, da die Scherkräfte auf die Nanopartikel mit deren Bindungskräften konkurrieren (Calderon *et al.*, 2009). Die oft dilatierten Gefäße und dadurch reduzierten Wandscherkräfte im Tumormikrozirkulationssystem haben daher einen potentiell günstigen Einfluss auf die tumorspezifische Anreicherung Antikörperbeschichteter Nanopartikel am Endothel (Thomann *et al.*, 2015). Dies stellt die Grundlage für die hier vorgestellte Studie dar.

1.6 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung des Potentials der zielgerichteten, lokalen Substanzanreicherung mithilfe von endothelspezifischen Antikörpern und Antikörper-beschichteten Nanopartikeln in der Leber und in experimentellen Lebertumoren. Dafür soll die Bindungsdynamik unterschiedlicher endothelspezifischer Antikörper am Leber- und Tumorendothel der Maus sowohl deskriptiv als auch quantitativ analysiert und deren

translationales Potential bewertet werden. Anschließend sollen schnell bindende Antikörper selektioniert werden, um die Mechanismen der Antikörperanreicherung am Endothel im Modell der isolierten Leberperfusion (*ex vivo*) zu untersuchen. Desweiteren soll das Potential der lokoregionalen Applikation für eine mögliche Verbesserung der Antikörperanreicherung am Endothel (*ex vivo* und *in vivo*) validiert werden.

Unterschiedliche Nanopartikel (MNP und Liposomen) sollen mit selektierten endothel-spezifischen, schnell bindenden Antikörpern beschichtet und deren Anreicherung am Endothel in histologischen Präparaten, *ex vivo* und *in vivo* untersucht werden. Weiterhin soll überprüft werden, inwieweit sich die für endothelspezifische Antikörper herausgestellten Anreicherungsmechanismen auf die Anreicherung beschichteter Nanopartikel übertragen lässt.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Laborausstattung, Verbrauchsmaterial und Software

Laborausstattung

Accu-Jet Pro	Brand, Wertheim, Deutschland
Analysewaage LA230P	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Axio Observer.Z1 (Fluoreszenzmikroskop) mit monochromatischem LED-Belich- tungssystem Colibri.2 und AxioCam MRR3	Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland
Behälter für flüssigen Stickstoff	Thermo Fisher Scientific (Nalgene), Waltham, USA
Biofuge fresco	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
CoolCell®-Einfrierbox	BioCision, San Rafael, USA
CO ₂ -Inkubator CB 150	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Feuchtkammer (dunkel)	Simport, Beloeil, Kanada
FLUOstar OPTIMA Plate Reader	BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland
Gamma-Imager (Abtlg. Nuklearmedizin)	Biospace Lab, Paris, Frankreich
Gamma-Zähler (Abtlg. Nuklearmedizin)	Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland
Glasware (Messzylinder, Bechergläser)	Schott, Mainz, Deutschland
Hamilton-Spritzen 10 und 25 µl mit Hamilton RN 34 G-Nadel	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Handschuhe (Super-therma, Grip N)	Honeywell, Seelze, Deutschland
Ibidi Air Pressure Pump 02	Ibidi, Martinsried, Deutschland
Inhalationsnarkosegerät (IBF) Matrx VIP 3000 (Isofluran)	Midmark, Dayton, USA
Kühlschrank +2-+8 °C	Liebherr, Bulle, Schweiz
Kühltruhe -20 °C	Liebherr, Bulle, Schweiz
Kühltruhe -80 °C	Sanyo, Moriguchi, Japan

Kühltruhe -150 °C	Sanyo, Moriguchi, Japan
Küvetten (Glas)	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Leica CM1950 Kryostat	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Leica Wild M650 OP-Mikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Leica Wild M655 OP-Mikroskop (IBF)	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Lichtmikroskop (aufrecht)	Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland
MACSmix Tube Rotator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS Multistand mit MACS-Separatoren	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Magnetrührer IKAMAG RCT	IKA-Werke, Staufen im Breisgau, Deutschland
Mikrotiterschüttler MTS 2	IKA-Werke, Staufen im Breisgau, Deutschland
Megafuge 16R	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Mehrkanalpipette Discovery Comfort	PZ HTL S.A., Warschau, Polen
NAPCO 2028R (Zentrifuge)	Precision, Winchester, USA
Neubauer-Zählkammer <i>improved</i>	Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim v.d. Rhön, Deutschland
Objektträgermappen	Marburger Signier-Technik-Systeme, Marburg, Deutschland
Operationsbesteck:	Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
Anatomische Pinzetten	
Mikroschere	
Nahthalter	
Operationsschere	
Pipetten (2-20 µl, 20-200 µl, 200-1000 µl)	Mettler-Toledo Rainin, Oakland, USA
pH-Meter MP225 mit Elektrode	Mettler-Toledo Rainin, Oakland, USA
Präzisionswaage BA 4100	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Reaktionsgefäßständer	Techno Plastic Products (TPP), Trasadingen, Schweiz
Retraktoren	Spezialanfertigung, Feinmechanikwerkstatt, Zentralbereich Neuenheimer Feld, Heidelberg, Deutschland
Rundschüttler Vibrax-VXR	IKA-Werke, Staufen im Breisgau, Deutschland
Sicherheitswerkbank HeraSafe	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland

Spritzen-Infusions-Pumpe (sp230iw syringe)	World Precision Instruments (WPI), Sarasota, USA
Vakuumpumpe	Vacuubrand, Wertheim, Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Wärmeplatte	Labotect, Rosdorf, Deutschland
Wilovert S Typ 30 (inverses Mikroskop)	Helmut Hund, Wetzlar, Deutschland
Zetasizer Nano ZS (Institut für Pharmazie & Molekulare Biotechnologie)	Malvern Instruments, Worcestershire, Großbritannien

Verbrauchsmaterial

Angiocath I.V. Katheteraufsatz (24 G)	Becton, Dickinson and Company (BD), Franklin Lakes, USA
Aspirationspipetten	Corning, Corning, USA
Baumwollfaden	Gütermann, Gutach im Breisgau, Deutschland
Cellstar-Petrischalen (5 cm)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar-Zellkulturflaschen (75 und 175 cm ²) mit Filterschraubverschluss	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar-Zentrifugenröhrchen (15 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Costar-Stripetten (10, 25, 50 ml)	Corning, Corning, USA
Dako Pen (Polymerstift)	Dako, Jena, Deutschland
Deckgläser (32 und 50 mm)	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
Dialysekassetten (300 kDa MWCO) Float-a-Lyzer Dialysis Device G2	Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, USA
Drei-Wege-Hahn	Codan, Lensahn, Deutschland
Einmalküvetten (Polystyrol)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Einwegklingen (Schmalband für Kryostat)	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Einwegskalpelle	Braun, Melsungen, Deutschland
Falcon-Zentrifugenröhrchen (50 ml)	Corning, Corning, USA
Filterpapier (gefaltet)	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Größenausschluss-Chromatographie- Kartuschen (Abtlg. Nuklearmedizin)	Biorad, Hercules, USA

Ibidi <i>sticky slides</i> I ^{0,4} Luer	Ibidi, Martinsried, Deutschland
Kanülen (Microlance, 27 G, 0,4×19 mm)	Becton, Dickinson and Company (BD), Franklin Lakes, USA
Kryoröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Leukosilk S/M	BSN medical, Hamburg, Deutschland
LDPE-Schlauch für Medizintechnik (∅ innen 0,28 mm; ∅ außen 0,61 mm)	Reichelt Chemietechnik, Heidelberg, Deutschland
MESH-Filter (40, 70, 100 µm)	Becton, Dickinson and Company (BD), Franklin Lakes, USA
MS- und LS-Säulen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Nahtmaterial:	
MOPYLEN 7-0, 0.5 <i>metric</i> (monofiler, nicht-resorbierbarer Polypropylenfaden)	Resorba Medical, Nürnberg, Deutschland
polysorb 5-0, 1 <i>metric</i> (resorbierbarer Faden aus geflochtenen Polyesterfasern)	Covidien (Medtronic), Dublin, Irland
Objektträger (76×26×1 mm)	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Perfusionsset (weiß, 50 cm; ID 0,8 mm)	Ibidi, Martinsried, Deutschland
Pipettenspitzen (20, 200, 1000 µl)	Mettler-Toledo Rainin, Oakland, USA
Pipettenspitzen, steril (20, 200, 1000 µl)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Polystyrol Mikroplatten, 384-Well	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Reagiergefäße (1,5 und 2 ml)	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Rundbodenröhrchen (5 ml) mit Deckel	Corning, Corning, USA
Schnittstrecker (70 mm, für Kryostat)	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Spezialvernichtungsbeutel	Nerbe plus, Winsen/Luhe, Deutschland
Spritzen (1, 5, 10 und 20 ml)	Becton, Dickinson and Company (BD), Franklin Lakes, USA
Spritzen (1 ml, Injekt-F und Omnican-F)	Braun, Melsungen, Deutschland
Teflonschale (Uhrschale aus Polytetrafluorethylen, ∅ 5 cm)	Neolab, Heidelberg, Deutschland

Vivaspin-Säulen (500 µl, 50000 MWCO)	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Waagschälchen (Einweg)	VWR, Radnor, USA
Wattestäbchen	NOBA Verbandsmittel, Wetter, Deutschland
96-Well-Platten	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
96-Well-Strips (F8 Maxisorp Loose)	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zeba Spin-Entsalzungssäulen (7 kDa MWCO)	Thermo Fisher Scientific (Pierce Biotechnology), Waltham, USA

Software

Adobe Illustrator (Version 6.1)	Adobe Systems, San José, USA
EndNote (Version 17.4.0.8818)	Clarivate Analytics, Philadelphia, USA
Microsoft Office Excel 2007	Microsoft, Redmond, USA
Microsoft Office PowerPoint 2007	Microsoft, Redmond, USA
Microsoft Office Word 2007	Microsoft, Redmond, USA
Optima-Software (Version 2.20R2)	BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland
PumpControl (Version 1.4.4)	Ibidi, Martinsried, Deutschland
sctmult (Version 1.3.0.1)	Dr. Wolfgang Groß, Experimentelle Chirurgie, Universitätsklinik Heidelberg, Deutschland
SPSS Statistics (Version 22.0.0.0)	International Business Machines Corporation (IBM), New York, USA
ZEN 2012 (<i>blue edition</i> ; Version 1.1.2.0)	Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland
ZEN 2011 Lite (<i>blue edition</i> ; Version 1.0.0.0)	Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland

2.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Kits

Chemikalien und Reagenzien

Aceton	Honeywell, Seelze, Deutschland
Aluminiumspray	Albrecht, Aulendorf, Deutschland
<i>Aqua destillata (A. dest.):</i>	
<i>Aqua ad iniectabilia</i>	Braun, Melsungen, Deutschland
Ampuwa für Spülzwecke	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt, Deutschland

Carprieve® (Carprofen)	Norbrook Laboratories, Newry, Nordirland
Collagenase D	Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Cystein HCl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Doxorubicinhydrochlorid (DOX-HCl)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Dinatriumsalz-Dihydrat (Titriplex® III)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol (EtOH, absolut, unvergällt)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Fluoromount G	Southern Biotech, Birmingham, USA
Fugaten®-Spray	Lysoform, Berlin, Deutschland
Hautantiseptikum (alkoholisch)	Schülke, Norderstedt, Deutschland
HEPES	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
Histodenz	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Isotone Natriumchloridlösung 0,9% (NaCl 0,9%)	Braun, Melsungen, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Honeywell, Seelze, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ketanest® S (Ketamin, Injektionslösung)	Pfizer, Berlin, Deutschland
Kohlenstoffdioxid (CO ₂)	Guttmann, Wertheim-Reicholzheim, Deutschland
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ ×6H ₂ O)	Merck, Darmstadt, Deutschland
modifizierter Krebs-Henseleit-Puffer (KHB)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Grüssing, Filsum, Deutschland
Natronlauge (NaOH)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Resazurin	R&D Systems, Minneapolis, USA
Rinderserum-Albumin (BSA)	New England Biolabs, Frankfurt a.M., Deutschland
RPMI 1640-Medium, pulverförmig, mit L-Glutamin, ohne NaHCO ₃	Merck, Darmstadt, Deutschland

Salzsäure (HCl)	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Stickstoff, flüssig (N ₂)	Zentralbereich Neuenheimer Feld, Heidelberg, Deutschland
Streptavidin (lyophilisiert)	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen), Waltham, USA
Sulfo-SMCC (Sulfosuccinimidyl 4-[N-maleimidomethyl]cyclohexan-1-carboxylat)	Thermo Fisher Scientific (Pierce Biotechnology), Waltham, USA
Traut's Reagenz (2-Iminothiolan-HCl)	Thermo Fisher Scientific (Pierce Biotechnology), Waltham, USA
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Trypanblau 0,4%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Tween-20	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
Xylavet [®] (Xylazin, Injektionslösung)	CP-Pharma, Burgdorf, Deutschland

Kits

Lightning-Link Streptavidin Labeling Kit	Innova Biosciences, Cambridge, Großbritannien
Rat IgG total Ready-SET-Go! [®]	eBioscience, Wien, Österreich

2.1.3 Zellmedium und Zusätze

Accutase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dulbecco's PBS ohne NaHCO ₃ (DPBS)	CCPro, Oberdorla, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	CCPro, Oberdorla, Deutschland
Iscove's <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM) ohne L-Glutamin	CCPro, Oberdorla, Deutschland
L-Glutamin + Penicillin-Streptomycin	CCPro, Oberdorla, Deutschland

2.1.4 Puffer

Alle Puffer wurden in *A. dest.* angesetzt, wenn nicht anders vermerkt.

HEPES-Puffer (pH 7,4)	10,07 mM HEPES 150,58 mM NaCl 5,37 mM KCl 0,98 mM MgCl ₂ ×6H ₂ O 2,34 mM CaCl ₂
MACS-Puffer (pH 7,2)	in 1× PBS 0,5% BSA 2 mM EDTA (Titriplex III)
Modifizierter KHB (pH 7,4)	modifizierter KHB (Sigma Aldrich, pulverförmig) 25 mM NaHCO ₃ 1% BSA
PBS (10×, pH 6,84)	0,03 M KH ₂ PO ₄ 0,11 M Na ₂ HPO ₄ 1,23 M NaCl
PBS (1×, pH 7,4)	1:10-Verdünnung des 10× PBS
PBS/EDTA für MNP-Beschichtung:	
Puffer I (pH 7,4)	1,5 M NaCl 0,1 M Na ₂ HPO ₄ 0,01 M EDTA (Titriplex III)
Puffer II (pH 7,4)	1:10-Verdünnung von Puffer I
Puffer III (pH 7,4)	1:10-Verdünnung von Puffer I 0,02 M Cystein HCl
Puffer IV (pH 8)	0,15 M NaCl 0,01 M Na ₂ HPO ₄ 0,005 M EDTA (Titriplex III)
Stop-Lösung (ELISA)	2 N H ₂ SO ₄
Waschpuffer (ELISA)	0,05% Tween-20 in 1× PBS

2.1.5 Antikörper

Tab. 1: Primäre anti-Maus-Antikörper für die deskriptive Analyse, Aviditäts-Analyse und *ex vivo*-Perfusion.

° Antikörper wurden für die deskriptive Analyse in einer Konzentration von 2 µg/ml verwendet. * Antikörper wurden für die Aviditäts-Analyse in LSEC in einer Konzentration von 2 µg/ml verwendet. † Antikörper wurden in unterschiedlicher Konzentration für *ex vivo*-Perfusionsexperimente verwendet. RPE = R-Phycoerythrin.

Antigen	Klon	Organismus	Isotyp	Konjugation	Hersteller
CD31	390	Ratte	IgG2a, κ	RPE ^{°*} †, pur†	BioLegend, San Diego, USA
CD34	MEC14.7	Ratte	IgG2a, κ	RPE [°]	BioLegend, San Diego, USA
CD34	RAM34	Ratte	IgG2a, κ	RPE [°]	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
CD49e	5H10-27 (MFR5)	Ratte	IgG2a, κ	RPE [°] †	BioLegend, San Diego, USA
CD105	MJ7/18	Ratte	IgG2a, κ	RPE ^{°*} †, pur†	BioLegend, San Diego, USA
CD144	BV13	Ratte	IgG1, κ	RPE ^{°*} †	BioLegend, San Diego, USA
CD146	ME-9F1	Ratte	IgG2a	RPE ^{°*} †, pur†	BioLegend, San Diego, USA
CD309	89B3A5	Ratte	IgG2a, κ	RPE [°] †	BioLegend, San Diego, USA
Isotyp	RTK2758	Ratte	IgG2a, κ	RPE [*] †, pur†	BioLegend, San Diego, USA

2 Material und Methoden

Tab. 2: Antikörper für die deskriptive Analyse in Humangewebe. Alle Primär- und Sekundärantikörper wurden in einer Konzentration von 2 µg/ml verwendet. Der Sekundärantikörper wurde nur in Kombination mit unkonjugierten (puren) Primärantikörpern verwendet. RPE = R-Phycoerythrin.

Antigen	Klon	Organismus	Isotyp	Konjugation	Hersteller
CD31	WM59	Maus	IgG1, κ	RPE	BioLegend, San Diego, USA
CD34	581	Maus	IgG1, κ	pur	BioLegend, San Diego, USA
CD34	Qbend-10	Maus	IgG1	pur (azidfrei)	Exbio, Vestec, Tschechische Republik
CD49e	NKI-SAM-1	Maus	IgG2b, κ	RPE	BioLegend, San Diego, USA
CD49e	M200 (Volociximab)	Maus	IgG1, κ	pur	Absolute Antibody, Oxford, Großbritannien
CD102	CBR-IC2/2	Maus	IgG2a, κ	pur	BioLegend, San Diego, USA
CD105	43A3	Maus	IgG1, κ	RPE	BioLegend, San Diego, USA
CD146	SHM-57	Maus	IgG2a, κ	Alexa Fluor 488	BioLegend, San Diego, USA
CD151	50-6	Maus	IgG1, κ	pur	BioLegend, San Diego, USA
Maus-Ig	polyklonal	Ziege	Ig	RPE	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA

2 Material und Methoden

Tab. 3: Antikörper für die EC₅₀-Analyse in Mausgewebe. Alle aufgeführten Antikörper wurden von BioLegend, San Diego, USA hergestellt. EC₅₀ = halbmaximale effektive Konzentration, RPE = R-Phycoerythrin, SA = Streptavidin, Thiol = Thiolgruppen.

Antigen	Klon	Organismus	Isotyp	Konjugation	Startkonzentration (µg/ml)	
					EC ₅₀ 15 min	EC ₅₀ 5 s
CD31	390	Ratte	IgG2a, κ	RPE	8	32 oder 128
CD49e	5H10-27 (MFR5)	Ratte	IgG2a, κ	RPE	8 oder 16	128
CD105	MJ7/18	Ratte	IgG2a, κ	pur RPE	32 32	– –
CD144	BV13	Ratte	IgG1, κ	RPE	128	–
CD146	ME-9F1	Ratte	IgG2a	pur	8	32 oder 64
				RPE	8	32 oder 128
				Alexa Fluor 488	16	128
				pur + Thiol	8	128
				pur + SA	8 oder 16	128
				Alexa Fluor 488	1 (für alle Tumorpräparate zur Doppelfärbung bei CD49e-EC ₅₀)	
CD309	89B3A5	Ratte	IgG2a, κ	RPE	64 oder 128	–
Ratte-IgG	Poly4054	Ziege	Ig	RPE	2 (für alle Präparate bei EC ₅₀ von reinen Primärantikörpern)	

2 Material und Methoden

Tab. 4: Antikörper für die Nanopartikelbeschichtung. * Mit diesen Antikörperklonen beschichtete Liposomen wurden für Zellviabilitätsassay-Experimente verwendet. Fc-Frmt. = Fc-Fragment.

Antigen	Klon	Organismus	Isotyp	Konjugation	Konzentration (µg/ml)	Hersteller
Maus-CD31	390	Ratte	IgG2a, κ	pur	ILP: 25	BioLegend, San Diego, USA
Maus-CD49e	5H10-27 (MFR5)*	Ratte	IgG2a, κ	pur (azidfrei)	MNP: 50 ILP: 25	BioLegend, San Diego, USA
Maus-CD146	ME-9F1	Ratte	IgG2a	pur	MNP: 50 MNP (Fc-Frmt.): 30 ILP: 25	BioLegend, San Diego, USA
Isotyp-Kontrolle	RTK2758*	Ratte	IgG2a, κ	pur	MNP: 50 ILP: 25	BioLegend, San Diego, USA
Ratte-IgG2a	2A8F4	Maus	IgG1, κ	pur	ILP: 25	Southern Biotech, Birmingham, USA
Ratte-IgG2a	MRG2a-83*	Maus	IgG	pur	ILP: 25	BioLegend, San Diego, USA
Ratte-IgG2a	Rg7/1.30	Maus	IgG2b, κ	pur	ILP: 25	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Ratte-IgG-Fc-Fragment	polyklonal	Ziege	IgG	pur	MNP: 50	Bethyl Laboratories, Montgomery, USA

Tab. 5: Antikörper für Experimente mit Nanopartikeln. BeKo = Beschichtungskontrolle, DiaKo = Dialysekontrolle, Fc-Frmt. = Fc-Fragment, RPE = R-Phycoerythrin.

Verwendung	Antigen	Klon	Organismus	Isotyp	Konjugation	Konzentration (µg/ml)	Hersteller
MNP-BeKo und -Histologie	Maus-CD146	ME-9F1	Ratte	IgG2a	pur	0,5	BioLegend, San Diego, USA
	Ratte-IgG	Poly4054	Ziege	Ig	RPE	2	BioLegend, San Diego, USA
ILP-BeKo und -DiaKo	Ratte-IgG	Poly4054	Ziege	Ig	Alexa Fluor 488	1	BioLegend, San Diego, USA
ILP-DiaKo	Isotyp-Kontrolle	RTK2758	Ratte	IgG2a, κ	Alexa Fluor 488	5-10	BioLegend, San Diego, USA
PEG-Färbung (ILP)	PEG	09F02	Maus	IgG3, κ	pur	2	BioVision, Milpitas, USA
	Maus-IgG3	SB76b	Ratte	IgG2a, λ	RPE	2	Southern Biotech, Birmingham, USA

Tab. 6: Antikörper für Zellbindungsversuche. Alle aufgeführten Antikörper wurden in einer Konzentration von 0,2 µg/ml für Zellbindungsversuche verwendet. Unkonjugierte (pure) Antikörper kamen ausschließlich Liposomen-gebunden zum Einsatz (siehe Tab. 4). Für die Zellbindungsversuche mit Sekundärantikörpern wurden Hep55.1C-Zellen im Vorfeld mit purem anti-CD49e in einer Konzentration von 2 µg/ml beschichtet. RPE = R-Phycoerythrin.

Antigen	Klon	Organismus	Isotyp	Konjugation	Hersteller
Maus-CD49e	5H10-27 (MFR5)	Ratte	IgG2a, κ	pur (azidfrei), RPE	BioLegend, San Diego, USA
Isotyp-Kontrolle	RTK2758	Ratte	IgG2a, κ	pur, RPE	BioLegend, San Diego, USA
Ratte-IgG2a	2A8F4	Maus	IgG1, κ	pur, RPE	Southern Biotech, Birmingham, USA
Ratte-IgG2a	MRG2a-83	Maus	IgG	pur, RPE	BioLegend, San Diego, USA
Ratte-IgG2a	Rg7/1.30	Maus	IgG2b, κ	pur, RPE	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA

Im Fließtext werden monoklonale Antikörper als anti-CDxxx (Klon) bezeichnet.

2.1.6 Nanopartikel

MNP

Aminierte MNP:	micromod Partikeltechnologie, Rostock, Deutschland
Nanomag-D-spio 20 nm, -NH ₂	
Nanomag-D-spio 20 nm, -PEG-NH ₂	
CD31 und CD146 (LSEC) Microbeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

Liposomen

Caelyx	Apotheke der Universitätsklinik Heidelberg, Deutschland
PEGyliertes liposomales Doxorubicin mit Biotin-Lipid	Encapsula NanoSciences, Brentwood, USA

2.1.7 Mausstämme und Zelllinien

C57BL/6N	Mausstamm; Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland
Hep55.1C	murines hepatozelluläres Karzinom; CLS Cell Lines Service, Eppelheim, Deutschland
Panc02	murines Pankreaskarzinom; von AG Prof. A. Märten, Universitätsklinik Heidelberg, Deutschland, zur Verfügung gestellt

2.1.8 Humane Gewebeproben

HCC- und Lebergewebe	Gewebebank, Chirurgische Klinik Heidelberg, Deutschland
----------------------	--

2.2 Methoden

2.2.1 Experimente mit Tieren

Alle Tierexperimente erfolgten nach tierschutzrechtlichen Vorschriften und wurden vom zuständigen Veterinäramt (Regierungspräsidium Karlsruhe) genehmigt. Während der Zeit der Dissertation waren anzeige- bzw. genehmigungspflichtige Tieranträge mit folgenden Aktenzeichen aktiv: T-27/14, T-69/15, T-64/16, T-80/17, 35-9185.82/A-24/16, 35-9185.81/G-201/13, 45-9185.81/G-11/17. C57BL/6-Mäuse (Charles River) wurden in Standardkäfigen bei einem zwölfstündigen Licht-Dunkel-Zyklus und *ad libitum*-Zugang zu Wasser und Standard-Tierfutter gehalten. Murine HCC- (Hep55.1C) (Kress *et al.*, 1992) und Pankreaskarzinom-Zelllinien (Panc02) (Corbett *et al.*, 1984) wurden in C57BL/6-Mäusen produziert und kommerziell erworben.

2.2.1.1 Isolierte Leberperfusion *ex vivo*

Für isolierte Leberperfusionsen wurden 8-12 Wochen alte C57BL/6-Mäuse verwendet. Vor Experimentbeginn erfolgte der Aufbau des Pumpsystems inklusive Spritzen-Katheter-Kombination, Perfusionspuffer (NaCl 0,9% oder modifizierter KHB) und Injektionslösung (Antikörper- oder Nanopartikel-Lösung, siehe Tab. 1). Nach Euthanasie der Maus mit CO₂, wurde das Gewicht des Tieres erfasst und das Fell am Abdomen entfernt. Das euthanasierte Tier wurde unter einem Operationsmikroskop (Leica Wild M650, 10×-Vergrößerung) platziert und eine mediane Laparotomie durchgeführt. Um bessere Sicht zur Präparation der *V. portae* zu erhalten, wurde das Mesenterium mithilfe von Wattestäbchen auf die linke Süssseite verlagert. Mit zwei gebogenen anatomischen Pinzetten wurde die *V. portae* stumpf aus dem Bindegewebe freipräpariert und auf eine Pinzette aufgespannt. Anschließend wurde sie unter Zuhilfenahme der 16×-Vergrößerung mit einer Mikroschere eröffnet und ein kleiner, an die Infusions-Pumpe (WPI) angeschlossener Katheter (27 G-Kanüle + LDPE-Schlauch: Ø innen 0,28 mm; Ø außen 0,61 mm) in das Lumen eingeführt. Zusätzlich wurde der Katheter mit einem Baumwollfaden am Gefäß befestigt. Es folgte die Eröffnung des Thorax sowie die Durchtrennung der *V. cava inferior* direkt unterhalb des Herzens mit der Mikroschere. Anschließend wurde das Blut mit einer Infusion von 1 ml Perfusionspuffer bei einer Geschwindigkeit von 1 ml/min aus der Leber gespült. Für die Perfusion einzelner Segmente (rechtes mittleres (RMS) bzw. rechtes hinteres Segment (RPS)

(Nikfarjam *et al.*, 2004)) folgte die Ligatur der, die anderen Segmente versorgenden, Gefäße. Die blutleere Leber wurde anschließend mikrochirurgisch aus dem Abdomen reseziert und auf einer Teflonschale platziert. Die isolierte Leber wurde zunächst mit 100 µl Injektionslösung entsprechender Konzentration manuell und anschließend mit 0,9 ml Perfusionspuffer bei gewünschter Perfusionsgeschwindigkeit (0,2; 0,5 oder 1 ml/min) mithilfe der Infusions-Pumpe perfundiert, um ungebundenen Antikörper oder Nanopartikel aus der Leber zu eliminieren. Das Perfusat wurde für die anschließende Quantifizierung gesammelt (ca. 1 ml) und enthaltene Erythrozyten abzentrifugiert (5000 Upm \approx 2400g, 2 min, 4 °C). Des Weiteren wurde das Gewicht jeder isolierten Leber erfasst, um später Aussagen über den prozentualen Anteil der absoluten Injektionsdosis pro Gramm Gewebe (%ID/g) machen zu können. Der experimentelle Aufbau der isolierten Leberperfusion ist in Abb. 2, die schematische Anordnung der Lebersegmente in Abb. 3 dargestellt.

Für die Quantifizierung von unkonjugiertem Antikörper wurde ein ELISA verwendet (siehe 2.2.5). RPE-konjugierte Antikörper (Duplikate) sowie DOX-ILP (Triplikate) wurden fluorimetrisch (544_{Ex}/580_{Em} bzw. 485-12_{Ex}/580_{Em}, FLUOstar OPTIMA) in 384-Well-Mikroplatten quantifiziert. Um eine erhebliche Reduktion der Fluoreszenzintensität von in NaCl 0,9% gelösten R-Phycoerythrin (RPE)-konjugierten Antikörpern auszuschließen, wurde die Perfusat-Antikörperkonzentration innerhalb von 45 min nach Probenvorbereitung bestimmt. DOX-ILP mussten vor der Analyse mit 1% Triton X-100 (1:2) aufgebrochen werden, um eingeschlossenes DOX-HCl für die fluorimetrische Analyse zugänglich zu machen. Beschichtete MNP wurden über die optische Dichte in Duplikaten mittels Absorption (355_{Ex}, FLUOstar OPTIMA) in 96-Well-Strips quantifiziert.

Nach der Perfusion mit RPE-konjugierten Antikörpern wurde die Endothelbindung mithilfe von *whole-mount*-Mikroskopie verifiziert (siehe 2.2.2). Für histologische Analysen nach der Perfusion mit DOX-ILP wurden die einzelnen Lebersegmente des isolierten Organs in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff eingefroren und dauerhaft bei -150 °C gelagert.

In einigen Experimenten wurde die Leber diskontinuierlich in mehreren, direkt aufeinanderfolgenden Zyklen mit 100 ng RPE-konjugiertem Antikörper bei 0,2 bzw. 1 ml/min perfundiert, wobei das jeweilige Perfusat nach jedem Zyklus gesammelt und einzeln analysiert wurde. In anderen Experimenten wurden unterschiedliche Volumina einer RPE-Antikörper-Lösung (10 µl – 16 ml) mit derselben Antikörpermenge von 2 µg bei 1 ml/min perfundiert.

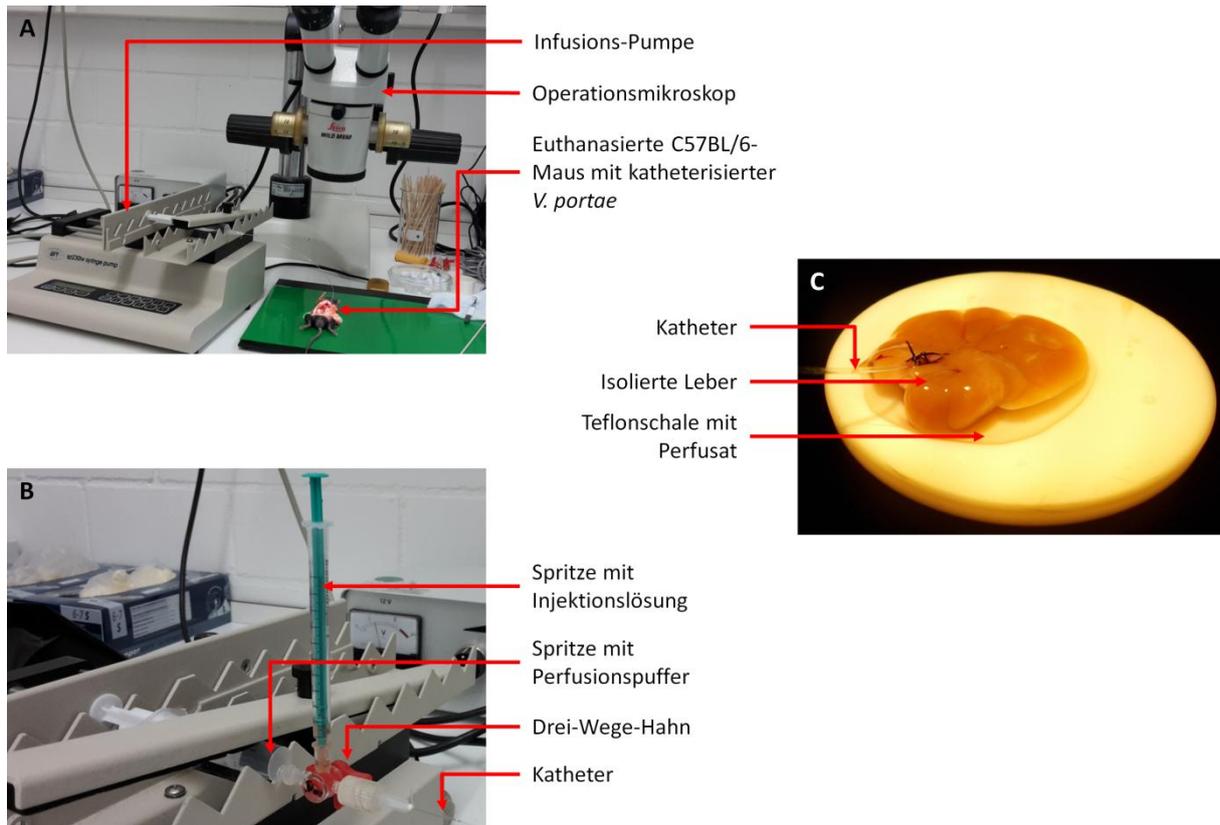


Abb. 2: Experimenteller Aufbau der isolierten Leberperfusion *ex vivo*. Nach Eröffnung des Abdomens der euthanasierten C57BL/6-Maus wurde die *V. portae* katheterisiert, an das Pumpsystem angeschlossen und die Leber mit Perfusionspuffer blutleer gespült (A-B). Die Leber wurde im Anschluss mikrochirurgisch reseziert und auf einer Teflonschale platziert (C). Mithilfe des Pumpsystems inklusive Spritzen-Katheter-Kombination wurde die isolierte Leber dann mit der Injektionslösung sowie Perfusionspuffer mit gewünschter Geschwindigkeit und Dauer perfundiert (B). Das ausgetretene Perfusat wurde für die folgende quantitative Analyse gesammelt (C).

2.2.1.2 Tumormodelle

Für diese Dissertation wurden ausschließlich implantierbare Tumormodelle verwendet. Dafür wurden C57BL/6-Mäuse im Alter von 10-14 Wochen Hep55.1C- bzw. Panc02-Zellen injiziert. Die Operation wurde in der Interfakultären Biomedizinischen Forschungseinrichtung (IBF) der Universität Heidelberg durchgeführt. Zur Vorbereitung des Kleintier-OPs wurde zunächst die Wärmeplatte auf 37 °C vorgeheizt, der Narkoseschlauch (mit Rattenmaske) an die Narkosevorrichtung (Midmark) angeschlossen, das Ventil auf die Kammer ausgerichtet sowie die Maske an der Wärmeplatte befestigt. Nach Einstellung des Operationsmikroskops (Leica Wild M655, 10×-Vergrößerung) wurde die Maus nach Vorschrift mit einem Isofluran-Sauerstoffgemisch in der Kammer betäubt (5% Isofluran, 600 ml Sauerstoff), wobei die Atmung der Maus beobachtet wurde. War eine Respirationsrate von etwa einem Atemzug/s erreicht, wurde die Maus aus der Kammer entnommen und bäuchlings auf die Wärmeplatte

gelegt. Diese Positionierung ermöglichte die s.c.-Injektion von 100 µl Carprofen (1,25 mg/ml, Norbrook Laboratories) sowie eine gegebenenfalls notwendige Ohrmarkierung. Das Ventil des Narkoseschlauchs wurde nun auf die Maske ausgerichtet, die Maus rücklings mit der Schnauze in der Narkosemaske platziert und nach Vorschrift betäubt (2% Isofluran, 200 ml Sauerstoff), wobei wieder die Atmung des Tieres beobachtet wurde. Die Extremitäten wurden mit Leukosilk fixiert, ein schmaler Streifen am Abdomen rasiert und die Haut mit einem alkoholischen Hautantiseptikum desinfiziert. Nun wurde das Zellpellet vom Eis genommen und bei Raumtemperatur gelagert. Nach Überprüfung der Schmerzfreiheit der Maus durch Provokation des Zwischenzehreflexes wurde der peritoneale Hohlraum durch mediane Laparotomie (8-10 mm) eröffnet. Nach Reinigung der 10 µl-Hamilton-Spritze mit 70%igem Ethanol und *A. dest.* wurden $1-1,5 \times 10^6$ Tumorzellen/5 µl aufgenommen. Mithilfe eines Wattestäbchens wurde das entsprechende Lebersegment (linkes vorderes (LAS), linkes hinteres Segment (LPS) oder RMS (Nikfarjam *et al.*, 2004)) exponiert und 5 µl Zellen oberflächlich, atraumatisch in das Leberparenchym appliziert. Dabei unter Umständen austretende Zellen wurden mit einem Tupfer eliminiert, um einem Tumorwachstum im Bauchraum vorzubeugen. Nach der Tumorzellapplikation wurden das Peritoneum und die Bauchdecke mit einer fortlaufenden Naht geschlossen. Zum Abschluss wurde die Naht mit Aluminiumspray zur Wunddesinfektion behandelt, die Maus in einen neuen Käfig gesetzt und das Aufwachen des Tieres beobachtet. Während der folgenden 48 h wurde dem operierten Tier alle 12 h Carprofen s.c. zur Schmerzlinderung verabreicht (je 100 µl à 1,25 mg/ml).

Anschließende Tierversuche wurden 12-14 Tage nach der Tumorzellinokulation durchgeführt und sind in 2.2.1.3 näher erläutert. Zur Organentnahme für die histologische Analyse wurden tumortragende Mäuse mit CO₂ euthanasiert, zu untersuchende Organe entnommen, in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff eingefroren und dauerhaft bei -150 °C gelagert.

2.2.1.3 Substanzapplikation *in vivo*

Intraarterielle Substanzapplikationen wurden ausschließlich *in vivo*, an tumortragenden C57BL/6-Mäusen 12-14 Tage nach Inokulation der Tumorzellen (siehe 2.2.1.2) durchgeführt. Die Tiere wurden zunächst durch i.p.-Injektion von 40 mg/kg Ketamin (Pfizer) sowie 10 mg/kg Xylazin (CP-Pharma) anästhesiert und anschließend auf einer Wärmeplatte (37 °C) unter einem Operationsmikroskop (Leica Wild M650, 10×-Vergrößerung) platziert. Um

Zugang zur tumorversorgenden Arterie für die lokoregionale Substanzapplikation i.a. zu erhalten, wurde das Abdomen eröffnet und unter Zuhilfenahme mehrerer Retraktoren für ein ausreichend großes Sichtfeld gesorgt. Anschließend wurden alle Äste der *A. hepatica* ligiert, mit Ausnahme des, das tumortragende Lebersegment versorgenden Astes (40×-Vergrößerung). Aufgrund zweier unterschiedlicher gefäßanatomischer Varianten in C57BL/6-Mäusen, wurde eine 34 G-Nadel (25 µl-Hamilton-Spritze) entweder in die Bifurkation der *A. pancreaticoduodenalis superior* oder der *A. gastrica* eingeführt, zur *A. hepatica* vorbelegt und der ¹²⁵I-konjugierte Antikörper bzw. DOX-ILP injiziert. Der Zugang über die *A. gastrica* war dabei häufiger (Kim *et al.*, 2017). Zur Veranschaulichung ist die Anordnung der Lebersegmente und zuführenden Gefäße in Abb. 3 dargestellt.

Für szintigrafische Analysen wurden 1 ng/g Körpergewicht (5 µl) des ¹²⁵I-konjugierten anti-CD146 (ME-9F1) i.a. in RMS-tumortragende Mäuse appliziert. Die letzte Manipulation wurde mit Hilfestellung von Prof. E. Ryschich (Chirurgische Universitätsklinik Heidelberg) ausgeführt. Dazu wurde der Antikörper vor Versuchsbeginn mit radioaktivem ¹²⁵I mithilfe der Chloramin-T-Methode (Petersen *et al.*, 2008) von Prof. W. Mier (Abteilung für Nuklearmedizin, Universitätsklinik Heidelberg) konjugiert. Die Proteinaufreinigung erfolgte dafür über Größenausschluss-Chromatographie. 10-15 min nach der Substanzapplikation wurde das Tier durch zervikale Dislokation euthanasiert. Szintigrafische Analysen wurden direkt im Anschluss durchgeführt (K. Leotta, Abteilung für Nuklearmedizin, Universitätsklinik Heidelberg). Das gesamte Tier bzw. das seziierte Gewebe wurde nach Versuchsende auf einem Gamma-Imager (Biospace Lab) mit hochenergetischer Blende platziert und die Bilder innerhalb von 10 min aufgenommen. Für die Bioverteilungsanalysen wurde das Gewebe gewogen und mit einem Gamma-Zähler (Berthold Technologies) analysiert. Die lokale Verteilung des ¹²⁵I-konjugierten Antikörpers wurde schließlich als %ID/g angegeben.

Für histologische Analysen wurde eine 58,8 µM DOX-ILP-Lösung (136 ng/g Körpergewicht, 50 µl à 200 ng Antikörper ≈ 8 ng/g Körpergewicht) verwendet und in LPS- bzw. LAS-tumortragende Mäuse appliziert. Die i.a.-Applikation erfolgte wie oben beschrieben. Für die i.v.-Applikation wurde die DOX-ILP-Lösung in die *V. cava inferior* appliziert. Nach der Applikation von DOX-ILP wurde das Tier durch zervikale Dislokation euthanasiert und der Tumor, die einzelnen Lebersegmente sowie die Milz in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff eingefroren und dauerhaft bei -150 °C gelagert. Das weitere Vorgehen ist in Abschnitt 2.2.2 beschrieben.

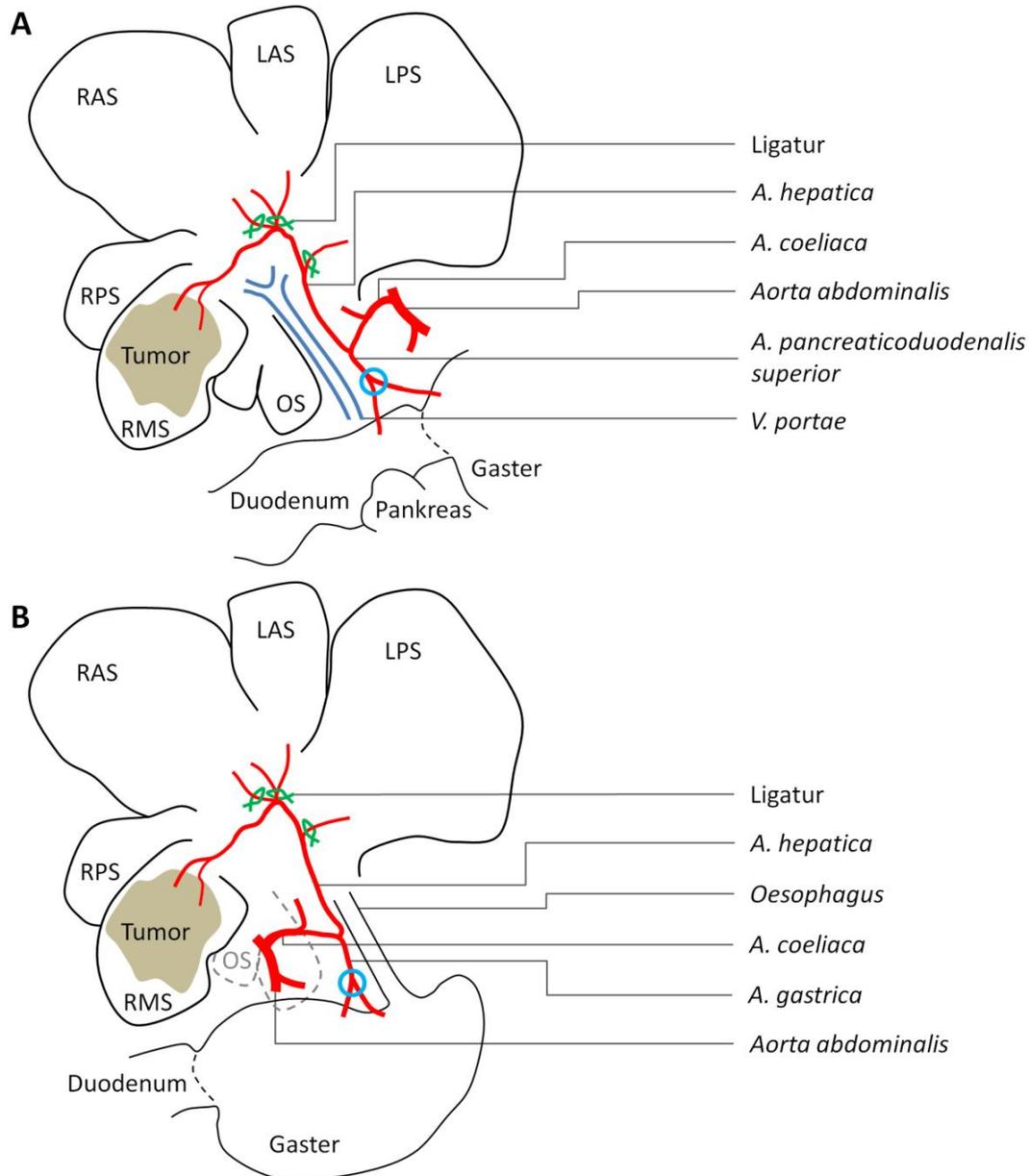


Abb. 3: Schematische Darstellung der Lebersegmente und Gefäße. Anordnung der Lebersegmente und zuführender Gefäße nach Eröffnung des Abdomens und der Präparation des Leberhilus. Substanzapplikation *ex vivo* erfolgte in die *V. portae*. Substanzapplikation *in vivo* erfolgte über die Bifurkation der *A. pancreaticoduodenalis superior* (A) oder der *A. gastrica* (B) in die *A. hepatica* (blauer Kreis = Injektionsstelle) bzw. zur Kontrolle in die *V. cava inferior* (nicht dargestellt). Nicht-tumorversorgende Äste der *A. hepatica* wurden vorher ligiert. Gallengang und -blase sind nicht dargestellt. LAS = linkes vorderes, LPS = linkes hinteres, OS = omentales, RAS = rechtes vorderes, RMS = rechtes mittleres, RPS = rechtes hinteres Segment.

2.2.2 Immunfluoreszenzfärbung und -mikroskopie

Murines und humanes Gewebe wurde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Kryostat (Leica) zu $7\text{ }\mu\text{m}$ dicken Gewebeschnitten auf Objektträgern aufgetragen, mit kaltem Aceton 10 min fixiert, bei Raumtemperatur getrocknet und dauerhaft bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Humangewebe stammt aus

operativen Resektaten (AG Hoffmann/Schemmer, Chirurgische Universitätsklinik Heidelberg) und wurde ausschließlich anonymisiert verwendet. Die Morphologie der humanen Gewebeproben wurde von einem Pathologen (Pathologisches Institut, Universität Heidelberg) begutachtet und das Gewebe entsprechend vor Verwendung kategorisiert.

Histologische Präparate wurden vor Beginn der Färbung mit einem Polymerstift umrandet und 10 min gewaschen. Anschließend wurden 100 µl Primärantikörperlösung in entsprechender Konzentration pro Gewebeschnitt aufgetragen und unter Lichtausschluss entsprechend inkubiert (5 s, 15 min, 30 min bzw. 60 min). Es folgten drei Waschschrte à 5 min. Bei unkonjugierten Antikörpern folgte eine 30-minütige Inkubation mit einem geeigneten Sekundärantikörper sowie erneut drei Waschschrte à 5 min. Alle Waschschrte erfolgten in 1× PBS auf dem Rundschüttler in Glasküvetten unter Lichtausschluss. Zum Abschluss wurden die Gewebeschnitte in Fluoromount G eingebettet, eingedeckt, getrocknet und mikroskopiert.

Für die deskriptive Analyse in murinem Gewebe wurden RPE-konjugierte Primärantikörper verwendet (siehe Tab. 1). Für die deskriptive Analyse in humanem Gewebe wurde direkte oder indirekte Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt (siehe Tab. 2). Für die Bestimmung der halbmaximalen effektiven Konzentration (EC_{50}) wurde eine passende Verdünnungsreihe des Primärantikörpers hergestellt und zur Färbung von zwölf konsekutiven Präparaten desselben Gewebes verwendet. Die Startkonzentration wurde in Abhängigkeit der Inkubationszeit sowie des verwendeten Primärantikörpers gewählt (siehe Tab. 3). Für die Untersuchung der MNP-Bindung in histologischen Präparaten wurde eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung mit anti-CD146 (ME-9F1) (MNP-gebunden oder ungebunden) durchgeführt (siehe Tab. 5). Für die Visualisierung gebundener ILP in perfundiertem Lebergewebe wurde eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung mittels PEG-Färbung (15 min) durchgeführt (siehe Tab. 5).

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden am Zeiss Axio Observer.Z1 mit einer AxioCam MRR3 sowie mithilfe der ZEN-Software (Zeiss) akquiriert. Für die Darstellung RPE-konjugierter Antikörper wurden eine Anregung von 555 nm, eine Lichtquellenintensität von 100% sowie eine Belichtungszeit von 1 s gewählt, für Alexa Fluor 488-konjugierte Antikörper entsprechend 470 nm, 50% sowie 500 ms. Die Auswahl des Objektivs richtete sich nach der Fragestellung: für deskriptive Analysen der Antikörperbindung im Gewebe sowie EC_{50} -Analysen wurde ein 20×/0,50 W-Objektiv (UMPlanFL; Olympus, Tokio, Japan), zur

Visualisierung der ILP-Bindung ein 63×/1,30 W Ph3-Objektiv (LCI Plan-Neofluar; Zeiss) verwendet. Eine Ausnahme stellte die EC₅₀-Analyse für anti-CD49e (5H10-27) in murinem Tumorgewebe dar. Hierfür musste zusätzlich zur Inkubation mit RPE-konjugiertem anti-CD49e (5H10-27) eine Doppelfärbung mit Alexa Fluor 488-konjugiertem anti-CD146 (ME-9F1) (1 µg/ml, 30 min) zur Gefäßdarstellung durchgeführt werden (siehe Tab. 3). Entsprechende fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden anschließend mithilfe eines 40×/0,8 W-Objektivs (Achromplan; Zeiss) akquiriert. Eine weitere Besonderheit war die EC₅₀-Analyse für Streptavidin-konjugierten anti-CD146 (ME-9F1). Hierfür musste das entsprechende Gewebe im Vorfeld 60 min bei Raumtemperatur mit Streptavidin (100 ng/ml) inkubiert werden, um endogenes Biotin zu blocken und somit endothelunabhängige Bindung des Streptavidin-konjugierten Antikörpers zu verhindern.

Die sogenannte *whole-mount*-Mikroskopie, die Mikroskopie eines gesamten Organs, wurde nach isolierter Leberperfusion mit RPE-konjugierten Antikörpern angewandt. Dazu wurde die isolierte, perfundierte Leber auf einem Deckglas platziert und anschließend mit dem 20×/0,50 W-Objektiv (Olympus) und den oben genannten Einstellungen für RPE-konjugierte Antikörper mikroskopiert. Mit dieser Methode konnte die spezifische Endothelbindung des verwendeten Antikörpers direkt nach der Perfusion visuell überprüft werden.

Wurden Kachelaufnahmen angefertigt, um ein größeres Areal zu visualisieren, musste die Aufnahme vor einer eventuell weiterführenden Analyse zusammengefügt (*stitching*, ZEN-Software) werden. Bei einem histologischen Vergleich unterschiedlicher, unter denselben Bedingungen behandelte und in derselben Abbildung dargestellte Präparate bzw. Proben wurden dieselben Bildparameter (Schwarz-, Weiß- und Gammawerte) für die Bearbeitung und finale Darstellung verwendet.

2.2.3 EC₅₀-Analyse

Um für die EC₅₀-Bestimmung ausreichend Blutgefäße visualisieren zu können, wurden Kachelaufnahmen mit einer Größe von 11,3 mm² angefertigt. Anschließend wurden in der ZEN Lite-Software (Zeiss) 100 Antikörper-markierte Blutgefäße pro Tumorgewebepräparat umrandet. Bei Lebergewebe sowie Kontrollpräparaten wurde die gesamte Fläche des detektierten Gewebes umrandet. Für die auf diese Weise erhobenen mittleren Fluoreszenzintensitäts (MFI)-Werte wurde in Excel der Mittelwert für jede Antikörperkonzentration bestimmt. Diese so generierten elf MFI-Werte wurden anschließend jeweils um den

Hintergrund (Kontrollpräparate mit Primärantikörper-Konzentration = 0 µg/ml) korrigiert und zur Quantifizierung in die sctmult-Software (Dr. W. Groß) transferiert (zwölf MFI-Werte pro Gewebe). Mithilfe der *Hill equation* und nach Einstellung diverser Parameter (E_{max} = Erwartungswert der Sättigung (y-Achse); $slope\ n = 1-5$; EC_{50}/IC_{50} = Erwartungswert für EC_{50} (x-Achse); $baseline = 0-1$) konnte die jeweilige EC_{50} berechnet werden. Um einen exakten Wert für die EC_{50} -Analyse zu erhalten, mussten die MFI-Werte für die höchsten Antikörperkonzentrationen im Sättigungsbereich liegen (Abb. 4).

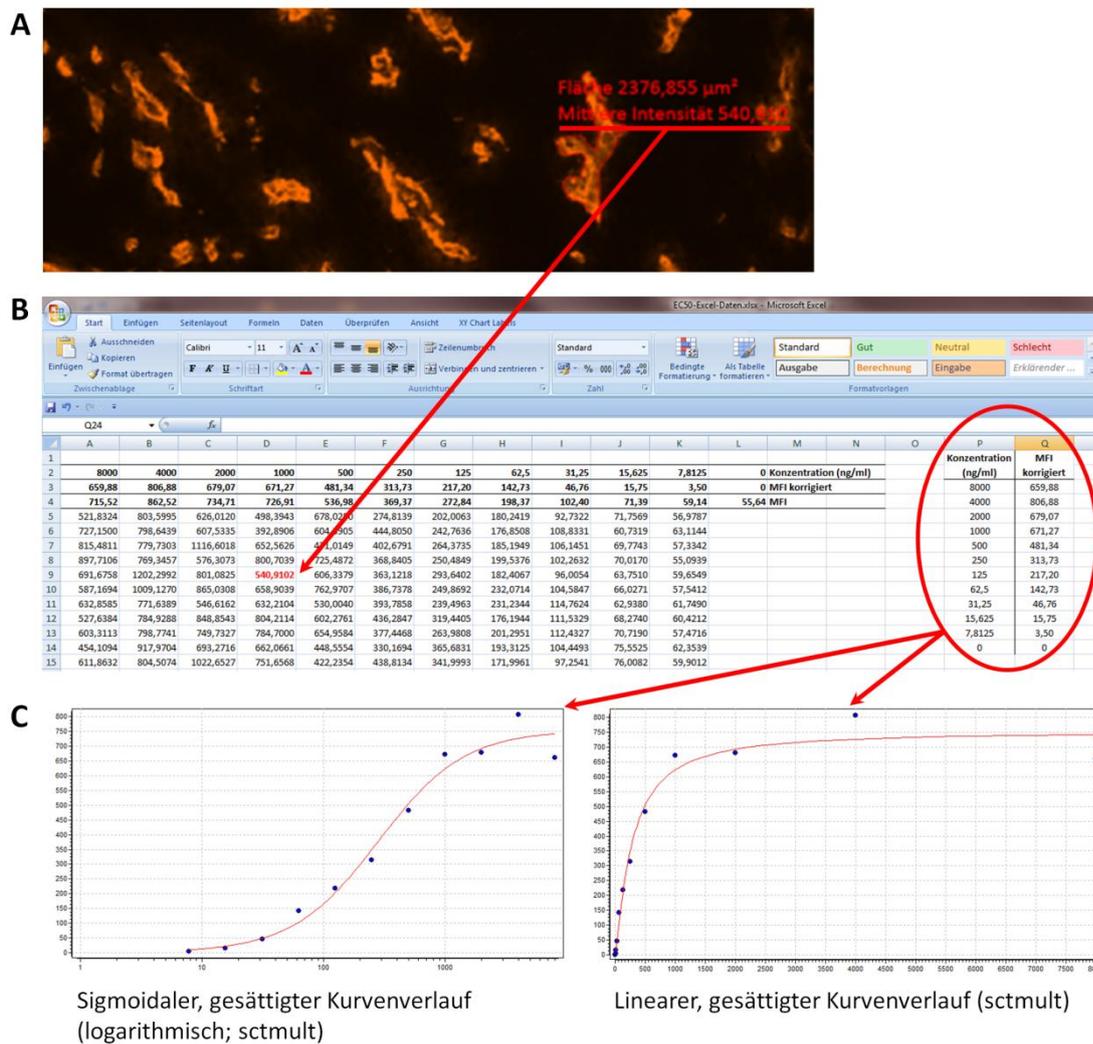


Abb. 4: Workflow der EC_{50} -Analyse. Exemplarisches Hep55.1C-Gewebepräparat mit RPE-markierten Blutgefäßen und einem ausgewählten Blutgefäß mit zugehörigem MFI-Wert (ZEN Lite-Software; A). Aus den MFI-Werten von je 100 entsprechend umrandeten Blutgefäßen pro Gewebe wurden zwölf MFI-Mittelwerte pro Antikörperkonzentration generiert (Excel; B) und in die sctmult-Software transferiert (C). Zur Berechnung der EC_{50} musste die generierte Kurve einen gesättigten Verlauf aufweisen (C).

2.2.4 LSEC-Isolierung und Aviditätsbestimmung

LSEC wurden aus der Leber 10-14 Wochen alter C57BL/6-Mäuse mittels Collagenase-verdauung und magnetischer Separierung isoliert (Salnikova *et al.*, 2013). Dazu wurden die Mäuse mit CO₂ euthanasiert, das Fell am Abdomen entfernt und die Haut sowie nötiges Operationsbesteck mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Es folgte die Öffnung des Abdomens und Freilegung der *V. portae*, sowie die Öffnung des Thorax und Durchtrennung der *V. cava inferior* unter Zuhilfenahme eines Operationsmikroskops (Leica Wild M650, 10×-Vergrößerung), wie in 2.2.1.1 bereits beschrieben. Für die Perfusion der Leber mit 1 ml Collagenase-Lösung (2 mg Collagenase D/ml HEPES-Puffer, siehe 2.1.4) wurde ein 24 G-Angiocath-Katheteraufsatz in das Lumen der *V. portae* eingeführt (16×-Vergrößerung). Anschließend wurde die Leber komplett reseziert, in grobe Stücke zerkleinert und umgehend in 50 ml kaltem DPBS zur Entfernung des restlichen intravaskulären Blutes gewaschen. Unter Zugabe von 9 ml Collagenase-Lösung wurde die Leber in einer Petrischale mit einer Operationsschere weiter zerkleinert. Die so erhaltene Gewebelösung wurde mit einem Glastrichter in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und für 45 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert, um eine Endothelzellfreisetzung aus dem Gewebegerüst zu bewirken. Die Gewebesuspension wurde anschließend mithilfe von MESH-Filtern (100 µm → 70 µm → 40 µm) homogenisiert und die Zellsuspension in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen mit kaltem DPBS zweimal gewaschen (10 min, 300g, 4 °C). Das erhaltene Zellpellet wurde in 2 ml RPMI (10 mg/ml in *A.dest.*) und 10 ml 30%iger Histodenz-Lösung (in 1× PBS) resuspendiert. Anschließend wurden 10 ml Zellsuspension vorsichtig unter 2 ml RPMI in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen pipettiert. Es folgte die Durchführung einer Dichtegradienten-Zentrifugation (Megafuge 16R: 20 min, 1500g, 4 °C, Beschleunigung Stufe 5, Bremse Stufe 3). Zellen niederer Dichte waren anschließend anhand einer „weißen“ Phase (von unten nach oben: Erythrozyten – Histodenz – Zellen niederer Dichte – RPMI) gut zu erkennen und wurden gezielt mit einer 1000 µl-Pipette abgenommen. Zur Entfernung des restlichen Histodenz wurde die Zellsuspension in MACS-Puffer (siehe 2.1.4) gewaschen (10 min, 300g, 4 °C). Ein weiterer Waschschrift erfolgte nach der Überführung in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß (10 min, 2000 Upm ≈ 380g, 4 °C). Das Zellpellet wurde in 90 µl MACS-Puffer resuspendiert und nach Zugabe von 10 µl paramagnetischen anti-CD31 bzw. anti-CD146 (LSEC) Microbeads sowie vortexen für 15 min bei 4 °C inkubiert. Über einen finalen Zentrifugationsschritt

(10 min, 2000 Upm \approx 380g, 4 °C) wurden ungebundene MNP aus der Zellsuspension entfernt und das Pellet in 500 μ l MACS-Puffer resuspendiert. Die magnetische Separation der CD146- bzw. CD31-positiven LSEC erfolgte über MACS-Säulen. Nach der Aufnahme in 1 ml MACS-Puffer wurde die Zellzahl, wie in 2.2.10 beschrieben, bestimmt, die verbliebene Zellsuspension erneut gewaschen (10 min, 2000 Upm \approx 380g, 4 °C) und in 1 \times PBS resuspendiert. Alle für die LSEC-Isolierung verwendeten Puffer wurden frisch und auf Eis angesetzt.

Für die Bestimmung der maximalen Antikörperbindung bzw. Avidität wurden frisch isolierte LSEC für 30 min bei 37 °C mit einem Überschuss (2 μ g/ml) an RPE-konjugiertem Antikörper (siehe Tab. 1) inkubiert, anschließend mit kaltem 1 \times PBS gewaschen (3 \times 5 min, 2000 Upm \approx 380g, 4 °C) und das Zellpellet in 100 μ l 1 \times PBS resuspendiert. Für die Berechnung der Avidität wurde das Reaktionsgefäß samt Probe gewogen, eine Standardreihe des RPE-konjugierten Antikörpers angesetzt und diese mit der Probe fluorimetrisch (544_{Ex}/580_{Em}, FLUOstar OPTIMA) in Duplikaten in 384-Well-Mikroplatten analysiert. Anschließend wurde die Menge des gebundenen Antikörpers pro Zelle (fg/Zelle) nach folgender Formel ermittelt:

$$\text{(Fluorimetrie-Ergebnis} \times 10^6 \text{ fg/ml)} / \text{(Zellzahl/ml)} = \text{fg/Zelle}$$

Zellzahl/ml = berechnet aus Zellzahl/Volumen nach Waschen (ca. 100 μ l)

2.2.5 Rat IgG total Ready-SET-Go![®]-ELISA

Für die Quantifizierung von unkonjugiertem Antikörper (rat IgG) nach isolierter Leberperfusion wurde der Rat IgG total Ready-SET-Go![®]-ELISA von eBioscience verwendet. Der für das Kit verwendete Waschpuffer sowie die Stop-Lösung wurden selbst, frisch angesetzt (siehe 2.1.4). Alle anderen Puffer und Lösungen gehörten zum Lieferumfang des ELISAs. Vor Versuchsbeginn musste die 96-Well-Platte über Nacht bei 4 °C mit anti-rat IgG-Antikörper in *Coating*-Puffer beschichtet werden. Am Folgetag (Tag der isolierten Leberperfusion) folgten mehrere Waschschrte sowie die Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen durch *Blocking*-Puffer (2 h bei Raumtemperatur). Nach weiteren Waschschrten wurde zusätzlich zum Kit-internen Standard für jeden verwendeten Antikörper ein Standard aus dem initialen Ansatz in Duplikaten aufgetragen. Da der Messbereich des verwendeten ELISAs zwischen 1,6 und 100 ng/ml lag, mussten die initialen Antikörperansätze sowie die Perfusatproben entsprechend verdünnt werden, um sicherzustellen, dass die zugehörigen Werte im linearen

Bereich der sigmoidalen Standardkurve liegen. Nach der Perfusion mit 200 ng Antikörper wurde der initiale Ansatz für die Standardkurve 1:10 und die Perfusatproben in Abhängigkeit des verwendeten Antikörpers unverdünnt, 1:2 oder 1:4 in Assay Buffer vorverdünnt in Duplikaten aufgetragen. Nach Perfusion mit 12800 ng Antikörper erfolgte eine 1:640 Vorverdünnung für die Standardkurve sowie eine 1:50, 1:100 und 1:200 Vorverdünnung der Perfusatproben. Der Standard und die Proben wurden 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehreren Waschschritten erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem Detektions-Antikörper bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Substratlösung zugegeben und die Farbreaktion nach 15 min durch Zugabe der Stop-Lösung beendet. Alle Verdünnungs-, Inkubations- und Waschschriffe erfolgten exakt nach Anleitung (eBioscience). Zur Auswertung wurde die Absorption bei 450_{Ex} (FLUOstar OPTIMA) gemessen.

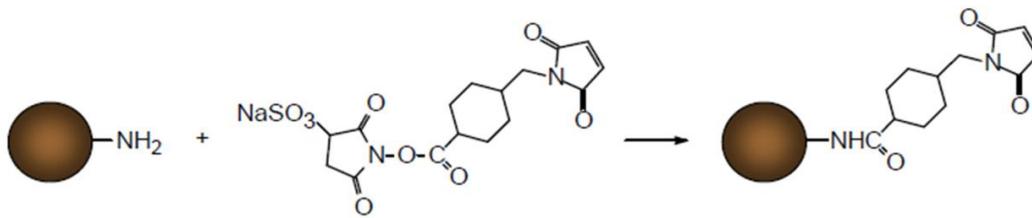
2.2.6 Nanopartikelbeschichtung

2.2.6.1 MNP-Beschichtung

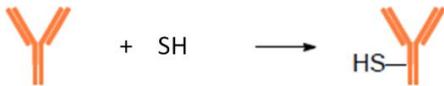
Für die vorliegende Doktorarbeit wurden 20 nm große, aminierte MNP (mit Amino-gruppe, -NH₂) mit oder ohne PEG-Beschichtung verwendet ((-PEG)-NH₂-MNP, micromod). Die Beschichtung mit endothelspezifischen Antikörpern erfolgte über eine kovalente Maleimid-Thiol-Bindung, was eine gute Aufrechterhaltung deren biologischer Funktionalität gewährleistet (Wang *et al.*, 2015). Dafür wurden die aminierte MNP durch Hinzufügen von Maleimidgruppen (Sulfo-SMCC, in Puffer I) nach Protokoll des Herstellers (micromod, Technote 202.1) funktionalisiert. Nach Herstellerprotokoll (micromod, Technote 201.1) wurde zeitgleich der zur Beschichtung verwendete Antikörper thioliert (2-Imino-thiolan-HCl) und anschließend über Größenausschlusschromatographie entsalzt (Zeba Spin-Entsalzungssäulen, beides in Puffer IV). Zuletzt erfolgten die Konjugation der thiolierten Antikörper mit den Maleimid-funktionalisierten MNP sowie eine einstündige Inkubation in Cystein-haltigem Puffer (Puffer III), ebenfalls nach Herstellerprotokoll (micromod, Technote 201.1). Ungebundener Antikörper wurde über magnetische Separierung eliminiert. Zum besseren Verständnis sind die einzelnen Schritte der MNP-Beschichtung in Abb. 5 dargestellt.

Für PEG-NH₂-MNP wurde zusätzlich eine abgewandelte Form der Beschichtung angewandt, indem die MNP zunächst mit thioliertem anti-Fc-Fragment-Antikörper und nach dem notwendigen Waschen mit unkonjugiertem anti-CD146 (ME-9F1) beschichtet wurden (CD146-Fc-Fragment-PEG-NH₂-MNP). Alle Angaben zu, zur MNP-Beschichtung verwendeter,

I Maleimid-Funktionalisierung aminierter MNP



II Antikörper-Thiolierung



III Konjugation von Maleimid-funktionalisierten MNP und thioliertem Antikörper

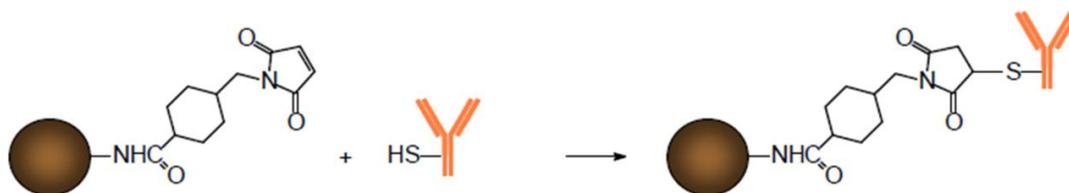


Abb. 5: Beschichtung aminierter MNP. Nach zeitgleicher Maleimid-Funktionalisierung der aminierten (-NH₂) MNP und Thiolierung (-SH) des verwendeten Antikörpers erfolgte die Konjugation beider Komponenten. Die Erstellung der Abbildung erfolgte unter Zuhilfenahme der Technote 201.1 sowie 202.1 von micromod.

Antikörper sind in Tab. 4 zusammengefasst. Die Unterschiede zwischen den MNP-Varianten sind in Abb. 6 verdeutlicht. Vor Verwendung der beschichteten MNP für histologische Untersuchungen oder Perfusionsexperimente wurde eine Beschichtungskontrolle durchgeführt sowie die Beschichtungseffizienz ermittelt. Zur Kontrolle der Beschichtung wurden 200 µl beschichteter MNP mit RPE-konjugiertem anti-rat IgG-Sekundärantikörper für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert (siehe Tab. 5). Ungebundener Sekundärantikörper wurde mithilfe von vier Waschschritten eliminiert. Anschließend wurde die Menge gebundenen Sekundärantikörpers und damit indirekt die Konzentration des gebundenen thiolierten Primärantikörpers in Duplikaten fluorimetrisch (544_{Ex}/580_{Em}, FLUOstar OPTIMA) in 384-Well-Mikroplatten ermittelt. Da es durch die zahlreichen Waschschriffe zu Verlust von MNP kommt, wurde zusätzlich die MNP-Beschichtungseffizienz bestimmt. Dazu wurde die optische Dichte beschichteter MNP in Duplikaten mittels Absorption (355_{Ex}, FLUOstar OPTIMA) in 96-Well-Strips gemessen, mit der optischen Dichte des initialen Ansatzes unbeschichteter MNP verglichen und mit der Primärantikörperkonzentration verrechnet (ng Antikörper/mg Partikel).

Alle Waschschritte erfolgten in Puffer II mittels magnetischer Trennung nach Herstellerprotokoll (micromod, Technote 101.2). Dazu wurden in Abhängigkeit des verwendeten Volumens LS- oder MS-Säulen im MACS-Separator befestigt und vor Benutzung befeuchtet. Anschließend erfolgten 3-4 Waschschritte mit 2 bzw. 1 ml Waschpuffer. Zuletzt wurde die Säule entfernt, über einem neuen Reaktionsgefäß platziert, das gewünschte Puffervolumen zugegeben und die MNP-Lösung mithilfe des zugehörigen Stempels vorsichtig überführt. Alle verwendeten Puffer (Puffer I-IV, siehe 2.1.4) wurden spätestens am Vortag der MNP-Beschichtung frisch angesetzt, maximal zwei Wochen verwendet und vor Beginn der Beschichtung auf Raumtemperatur gebracht.

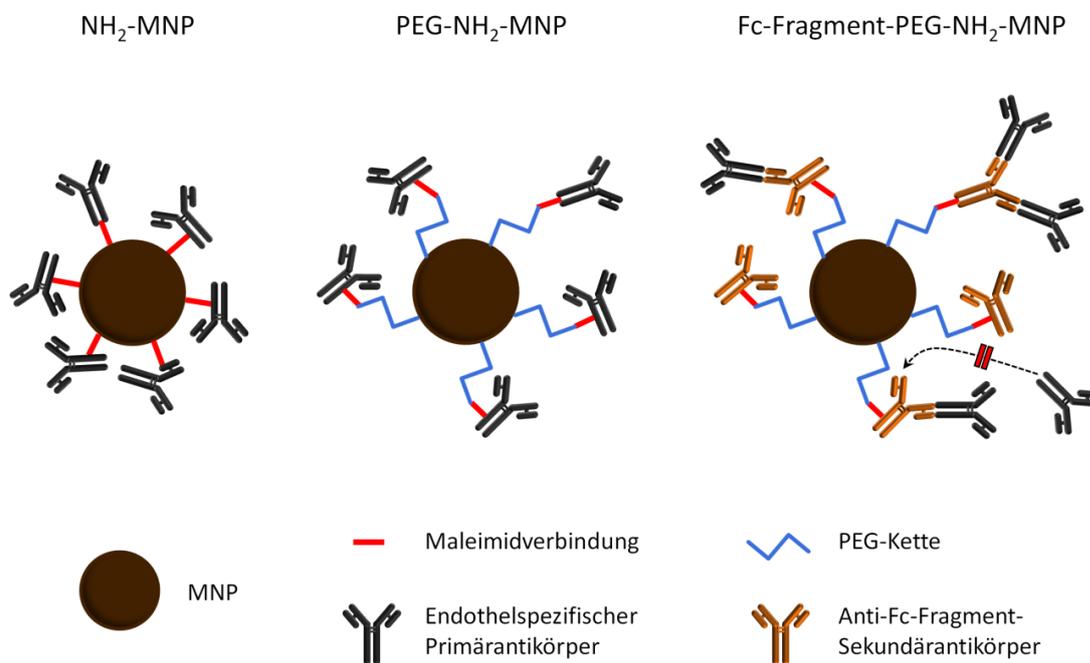


Abb. 6: MNP-Varianten. Beschichtungsunterschiede der hier verwendeten MNP-Varianten mit Verdeutlichung möglicher heterogener Antikörperausrichtung. Größenrelationen wurden nicht berücksichtigt.

2.2.6.2 Liposomenbeschichtung

Für die vorliegende Arbeit kam PEGyliertes liposomales DOX mit Biotinbeschichtung und 80-100 nm Durchmesser (Encapsula Nanosciences) zum Einsatz. Das Vorhandensein von Biotin ermöglichte eine Beschichtung mit endothelspezifischen Antikörpern über eine sehr stabile, nicht-kovalente Streptavidin-Biotin-Bindung (Schiestel *et al.*, 2004; Wilchek und Bayer, 1990). Dazu wurde der entsprechende Antikörper zunächst mit Streptavidin unter Verwendung des Lightning-Link Streptavidin Labeling Kits (Innova Biosciences) konjugiert. Antikörper mit einer Konzentration von <1 mg/ml wurden dafür im Vorfeld mithilfe von

Vivaspin500-Säulen auf 1 mg/ml aufkonzentriert (1 min, 9000 Upm \approx 7700g). Die Beschichtung der Biotin-haltigen Liposomen (1 mM, 1:22-Verdünnung) mit dem Streptavidin-konjugierten Antikörper (100 μ g/ml) erfolgte durch Koinkubation ($\frac{3}{4}$ Liposomen/ $\frac{1}{4}$ Streptavidin-Antikörper) bei Raumtemperatur für mindestens 1 h (siehe Tab. 4). Die so beschichteten Liposomen werden im Folgenden als ILP bezeichnet. Alle Verdünnungen wurden mit 1 \times PBS angefertigt.

Durch die für die Beschichtung mit Streptavidin-Antikörper notwendige, starke Verdünnung (1:29,33) der DOX-Liposomen-Lösung (2 mg/ml DOX) war die finale DOX-Konzentration der ILP-Lösung relativ gering (Molekulargewicht von DOX-HCl: 579,98 g/mol):

$$\frac{2 \text{ mg/ml}}{22} \times 0,75 = 0,0682 \text{ mg/ml}$$
$$\frac{0,0682 \text{ g/l}}{579,98 \text{ g/mol}} = 0,0001176 \text{ mol/l} = 117,6 \text{ }\mu\text{M}$$

Um ungebundenen Streptavidin-Antikörper aus der ILP-Lösung zu eliminieren, wurde diese für drei Tage bei Raumtemperatur in Dialysekassetten (300 kDa MWCO, Spectrum Laboratories) mit 1 \times PBS unter Lichtausschluss auf einem Magnetrührer dialysiert. Die Vorbereitung und Handhabung der Dialysekassetten erfolgte nach Anleitung des Herstellers: 10-15 min Inkubation in 10%igem Ethanol, 15-20 min Inkubation in *A. dest.* bei Raumtemperatur. Ein Pufferwechsel wurde 2 und 6 h nach Dialysebeginn vorgenommen, anschließend zweimal täglich. Um den Grad der Eliminierung des ungebundenen Antikörpers abschätzen zu können, wurde zusätzlich eine Dialysekontrolle mit Alexa Fluor 488-konjugiertem Antikörper mitgeführt, welche aller 24 h gemessen wurde (Tab. 5). Vor Verwendung der ILP für weitere Experimente wurde eine Beschichtungskontrolle durchgeführt. Dazu wurden 120 μ l ILP mit Sekundärantikörper für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und der Ansatz anschließend 1:10 verdünnt, um ausreichend Volumen für die Dialyse (3 Tage wie oben beschrieben) sowie die Standardreihe zur Verfügung zu haben (Tab. 5). Aufgrund eines möglichen Fluoreszenzverlusts des für die Dialyse- und Beschichtungskontrolle verwendeten Alexa Fluor 488-konjugierten Antikörpers wurde derselbe Antikörperansatz undialysiert zu den jeweiligen Messzeitpunkten analysiert (Kontrollmesswert) und der Dialysemesswert dazu in Relation gesetzt:

$$\text{Dargestellter Messwert (\%)} = (\text{Dialysemesswert} / \text{Kontrollmesswert}) \times 100$$

Die Quantifizierung der Beschichtungs- und Dialysekontrollen erfolgte in Duplikaten fluorimetrisch bei 485-12_{Ex}/520_{Em} (FLUOstar OPTIMA) in 384-Well-Mikroplatten.

Zum besseren Verständnis ist der Aufbau der für diese Arbeit verwendeten beschichteten Nanopartikel in Abb. 7 schematisch dargestellt.

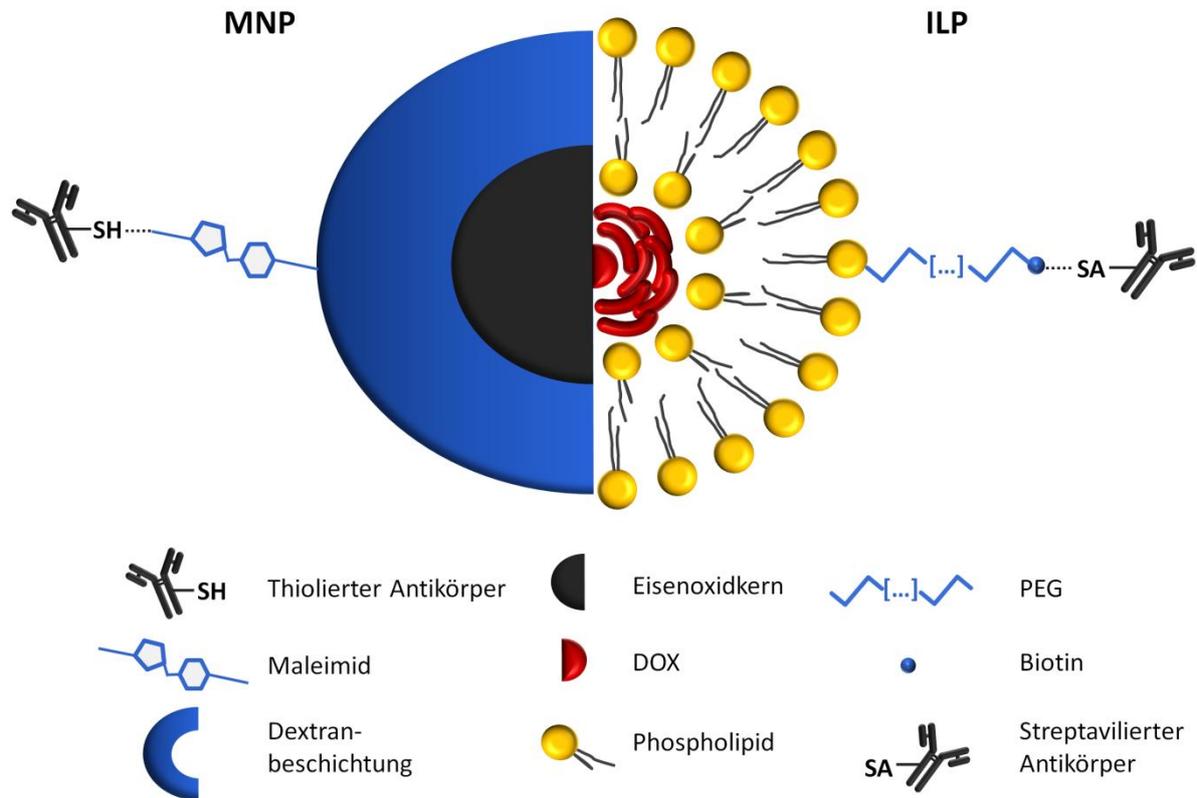


Abb. 7: Schematischer Aufbau beschichteter MNP und Liposomen. Schematische Gegenüberstellung der in dieser Arbeit verwendeten, beschichteten Nanopartikel. Links ist ein Maleimid-funktionalisiertes MNP mit thioliertem Antikörper (ohne PEG), rechts ein DOX-haltiges Liposom mit PEG-Biotin-Beschichtung und streptaviliertem Antikörper zu sehen (ILP). Größenrelationen wurden nicht berücksichtigt. SA = Streptavidin, SH = Thiolgruppe.

2.2.6.3 Zu testender Ansatz: primäre versus sekundäre Anreicherung

Da ein negativer Einfluss der vorliegenden Scherkräfte auf das Bindungsverhalten beschichteter Nanopartikel bekannt ist (Calderon *et al.*, 2009), sollten zu deren Anreicherung am Endothel zwei Mechanismen untersucht werden. Für die primäre Anreicherung wurden Liposomen mit endothelspezifischen Antikörpern beschichtet, welche dann durch die direkte Bindung zwischen Antikörper und Endothelmarker am Endothel angereichert werden sollten. Für den Mechanismus der sekundären Anreicherung hingegen, sollten die Liposomen mit einem Sekundärantikörper (anti-rat IgG) beschichtet werden. Anschließend sollte eine initiale Perfusion mit einem unkonjugierten endothelspezifischen Antikörper und dessen Akkumulierung am Endothel über das Prinzip der endothelialen Anreicherung erfolgen. In einem zweiten Perfusionsschritt sollte die Anreicherung von

Sekundärantikörper-ILP über die Bindung zwischen Sekundär- und endothelgebundenem Primärantikörper durch 30-minütige kontinuierliche Perfusion erfolgen (Abb. 8).

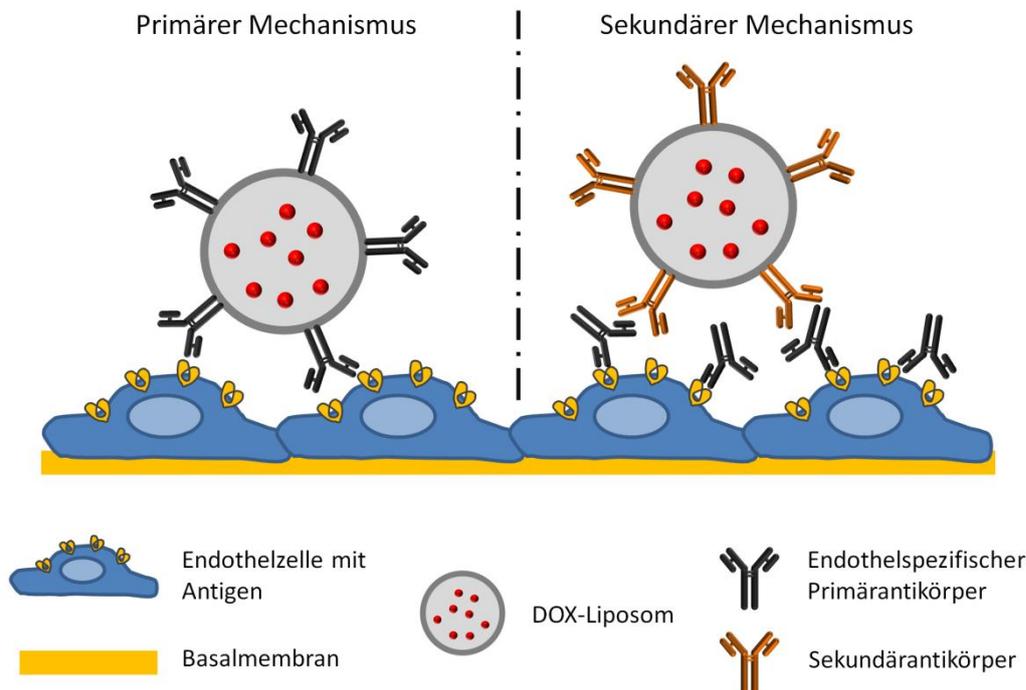


Abb. 8: Primärer und sekundärer Mechanismus der Nanopartikelanreicherung am Endothel. Schematische Darstellung der Nanopartikelanreicherung am Endothel anhand des primären bzw. sekundären Mechanismus am Beispiel von DOX-ILP. Größenrelationen wurden nicht berücksichtigt.

2.2.7 Perfusionskammerexperimente

Perfusionskammerexperimente an histologischen Schnitten wurden durchgeführt, um den Einfluss von Scherkräften auf das Bindungsverhalten beschichteter MNP zu untersuchen. Dafür wurde ein *sticky slide* auf einem Kryogewebeschnitt befestigt und die Kammer zunächst möglichst Luftblasenfrei mit $1\times$ PBS gefüllt, um ein Austrocknen des Gewebes zu verhindern sowie die Wasserundurchlässigkeit zu überprüfen. Anschließend erfolgte das Setup der Pumpvorrichtung, inklusive PumpControl-Software und Perfusionsset nach Anleitung (Ibidi). Folgende Einstellungen wurden in der Software vorgenommen: Kanalhöhe: $450\ \mu\text{m}$; Kanalbreite: $5\ \text{mm}$; Perfusionsset: weiß; Rekalibrierungsfaktor: abhängig von eventueller Anmerkung in der Perfusionssetbox; Viskosität: $0,01$; *next continuous*: $15\ \text{s}$ bei $5\ \text{dyn/cm}^2$, $120\ \text{s}$ bei $0,5\ \text{dyn/cm}^2$ bei $5\ \text{ml}$ Perfusionsflüssigkeit. Der Anschluss der Perfusionskammer an die Pumpvorrichtung erfolgte ebenfalls nach Anleitung (siehe Abb. 9). Um gebundenen Antikörper bzw. beschichtete MNP fluoreszenzmikroskopisch zu visualisieren, musste das Gewebe zusätzlich mit Sekundärantikörper inkubiert werden. Dazu

wurde die Kammer zunächst 5 min manuell mit 1× PBS gespült, um den Primärantikörper bzw. die MNP-Lösung zu eliminieren. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit RPE-konjugiertem Sekundärantikörper (siehe Tab. 5) sowie eine erneute Spülung mit 1× PBS. Zur Überprüfung der Antikörper- bzw. MNP-Bindung wurden die Schnitte bei 555 nm am Zeiss Axio Observer.Z1 mikroskopiert (20×/0,50 W-Objektiv; Olympus). Da die *sticky slides* irreversibel auf den Objektträgern befestigt wurden, erfolgte die Mikroskopie durch den gesamten Objektträger, was zu Qualitätsminderung der Aufnahmen führte.

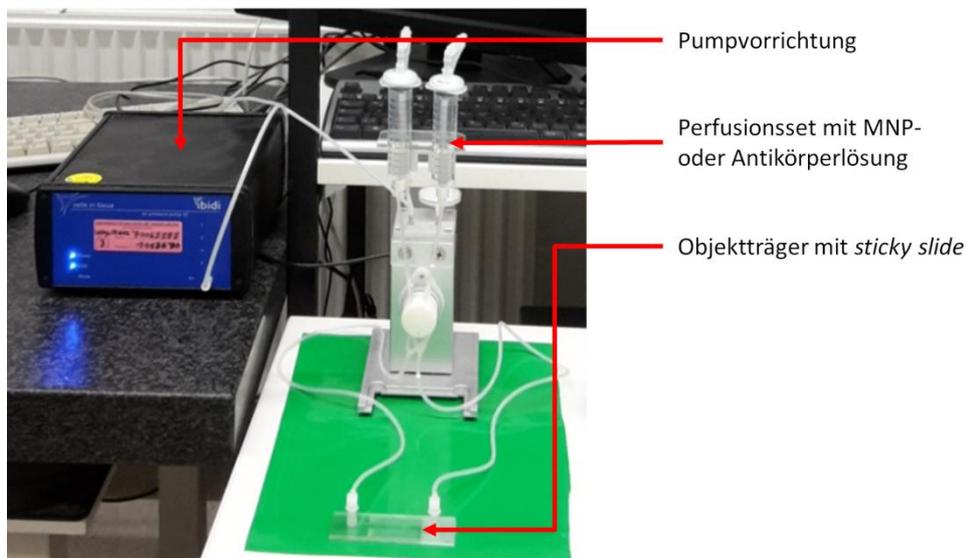


Abb. 9: Experimenteller Aufbau der MNP- und Antikörperperfusion auf histologischen Gewebeschnitten. Die Pumpvorrichtung war über einen Computer mit der PumpControl-Software verbunden, mithilfe derer die zu applizierende Scherkraft und Perfusionsdauer reguliert werden konnte. Nach Beendigung der Perfusion erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung zur Detektion gebundener MNP bzw. Antikörper.

2.2.8 Liposomen-Charakterisierung

Je eine DOX-Liposomen- und eine CD146-DOX-ILP-Probe wurden bei Raumtemperatur mit einem Zetasizer Nano ZS (Malvern) über dynamische Lichtstreuung analysiert (Uhl *et al.*, 2016). Dazu wurden die Proben 1:100 in DPBS verdünnt und je 1 ml in eine Polystyrolküvette überführt. Der Zetasizer wurde im Automatikmodus mit folgenden Einstellungen verwendet: Anzahl der Messungen = 3; Messdauer = 10 s; Anzahl der Einzelmessungen = 15; Equilibrierungszeit = 60 s; Brechungsindex der Lösung = 1,330; Brechungsindex der Polystyrolküvette = 1,590; Viskosität = 0,8872 mPa·s; Temperatur = 25 °C. Es wurden der dynamische Durchmesser sowie der Polydispersionsindex beider Proben ermittelt.

2.2.9 Zellkulturbedingungen

Alle Experimente, die eine Kultivierung von Zellen voraussetzten, wurden unter sterilen Bedingungen (Sicherheitswerkbank HeraSafe) durchgeführt, um das Risiko einer möglichen Kontaminierung durch externe Mikroorganismen wie Bakterien, Schimmelpilze, Mykoplasmen oder Hefen zu minimieren. Alle verwendeten Zellen wurden in einem Zellinkubator (Binder) bei 37 °C, gesättigtem Dampfdruck sowie 5% CO₂ kultiviert.

Hep55.1C- und Panc02-Tumorzellen wurden bei -150 °C in Kryoröhrchen (5-15×10⁶ Zellen) gelagert. Für die Kultivierung wurden sie möglichst zügig durch Handwärme aufgetaut, umgehend in 50 ml DPBS überführt und anschließend einmalig 10 min bei 300g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde im Anschluss mithilfe einer Vakuumpumpe abgesaugt, das Zellpellet durch kurzes Schaben aufgelockert, in 2-4 ml Nährmedium (Iscove's DMEM + 10% FCS + 3% L-Glutamin + Penicillin-Streptomycin) resuspendiert und die Zellsuspension in zwei, je etwa 10 ml Nährmedium enthaltende, Zellkulturflaschen (75 cm²) ausgesät. Die Zellen wurden daraufhin im Zellinkubator kultiviert. Das Nährmedium wurde am Tag nach dem Auftauen der Zellen und anschließend aller 2-3 Tage ausgetauscht, um die Zellen mit ausreichend Vitaminen und anderen Nährstoffen zu versorgen sowie der Behinderung des Zellwachstums durch metabolische Produkte vorzubeugen. Die Konfluenz der Zellen wurde mithilfe eines inversen Mikroskops (Wilovert S, A 4/0,10-Objektiv; Helmut Hund) bei Durchlicht überprüft. Sobald diese 80-100% erreicht hatte, wurde das Nährmedium mithilfe einer Vakuumpumpe abgesaugt, der Zellrasen vorsichtig mit 10 ml DPBS gewaschen und 5 ml Accutase zugegeben. Nach 3 min Inkubation bei 37 °C wurden die nun abgelösten Zellen in 50 ml DPBS gewaschen (10 min, 300g, 4 °C). Anschließend wurde, wie oben beschrieben, der Überstand verworfen, das Zellpellet in Nährmedium resuspendiert und die Zellsuspension in neue, größere Zellkulturflaschen (175 cm², mit etwa 20 ml Nährmedium) passagiert. Nicht verwendete Tumorzellen wurden nach dem Ablösen und Waschen bei bekannter Zellkonzentration in FCS + 10% DMSO aufgenommen und zügig in Kryoröhrchen aliquotiert (5-15×10⁶ Zellen/ml je Kryoröhrchen). Während der ersten 24 h wurden die so vorbereiteten Zellen in einem Isopropanol enthaltenden Gefäß (BioCision) kontrolliert auf -80 °C gekühlt und anschließend dauerhaft bei -150 °C gelagert. Da DMSO die Zellen in gefrorenem Zustand schützt, jedoch zellschädigend bei 37 °C wirkt, musste es zügig nach dem Auftauen durch Waschen aus der Zellsuspension eliminiert werden.

2.2.10 Bestimmung der Zellzahl (Neubauer-Zählkammer)

War die Bestimmung der Zellzahl notwendig, wurde das sterile Zellpellet nach dem Waschen, abhängig vom Versuchsaufbau, in einem angemessenen Volumen Nährmedium resuspendiert. Abhängig von der visuellen Zelldichte wurden 10 µl Zellsuspension 1:20 bzw. 1:200 in DPBS und Trypanblau verdünnt. Nach Säuberung und Anbringung des plangeschliffenen Deckglases auf der Neubauer-Zählkammer wurde die auszuzählende Zellsuspension seitlich aufpipettiert. Anschließend wurden lebende Zellen mithilfe eines aufrechten Lichtmikroskops (Zeiss; L20×/0,32-Objektiv, Leitz, Wetzlar, Deutschland) bei Durchlicht in den vier großen Eckquadraten ausgezählt. Da Trypanblau nur tote Zellen infiltriert, können diese problemlos von lebenden unterschieden werden (Louis und Siegel, 2011). Mithilfe folgender Formel wurde anschließend die Zellzahl/ml ermittelt:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittelwert der 4 Eckquadrate} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Volumenfaktor}$$

Mittelwert der 4 Eckquadrate = Gesamtzellzahl der 4 Eckquadrate/4.

Verdünnungsfaktor = z.B. 20 oder 200; experimentabhängig.

Volumenfaktor = 10^4 ; ergibt sich aus dem Volumen eines Zählquadrats (10^{-4} ml).

2.2.11 Zellviabilitätsassay (Resazurinassay)

Das Modell des Resazurin-basierten Zellviabilitätsassays wurde verwendet, um die Toxizität der verwendeten Substanzen für Maus-Lebertumorzellen (Hep55.1C, Panc02) zu untersuchen. Mit dieser Methode wird über das Redoxpotential indirekt die Glykolyserate lebender Zellen und damit die Zellviabilität der untersuchten Population bestimmt (O'Brien *et al.*, 2000). Nach Zugabe des Redoxindikators Resazurin (blau) können nur viable Zellen dessen Umwandlung zu fluoreszierendem Resofurin (pink) durchführen. Daher ist die Zellviabilität direkt proportional zur detektierten MFI (O'Brien *et al.*, 2000).

Die Ablösung der Zellen sowie die Bestimmung der Zellzahl zur Vorbereitung des Viabilitätsassays wurden, wie in 2.2.9 bzw. 2.2.10 beschrieben, durchgeführt. An Tag 1 wurden in Abhängigkeit der verwendeten Zelllinie sowie der Versuchsdauer $1,5\text{-}3 \times 10^3$ Zellen/100 µl/Well in 96-Well-Platten ausgesät (für 24/48/72/96 h – Hep55.1C: 3/2/1,75/1,5 $\times 10^3$ Zellen/Well; Panc02: 2,5/1,5/-/ $\times 10^3$ Zellen/Well), um 80-100%ige Konfluenz in den Kontrollwells zu Versuchsende nicht zu überschreiten. Die Randwells wurden dabei ausgespart und nur mit Nährmedium befüllt. An Tag 2 wurde das Medium aller Wells entfernt und mit DOX-HCl (Sigma Aldrich, in *A.dest.* gelöst) bzw. DOX-HCl-haltigen

Liposomen in entsprechender Konzentration ausgetauscht. Für 24- und 48-stündige Inkubation wurden DOX-Liposomen (Encapsula) sowie Caelyx verwendet und DOX-Konzentrationen von 0-30 μM in Duplikaten untersucht.

Für 30-minütige Inkubation mit anti-rat IgG-DOX-ILP (Sekundärantikörper-beschichtet, siehe Tab. 4) sowie DOX-HCl wurden die Zellen zunächst mit unkonjugiertem anti-CD49e (5H10-27) beschichtet (5 min Koinkubation mit 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Antikörper bei 37 °C; sekundärer Mechanismus). Nach dreimaligem Waschen mit kaltem DPBS wurde DOX-HCl bzw. anti-rat IgG-DOX-ILP in DOX-Konzentrationen von 0-58,8 μM in Triplikaten zugegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert. 30-minütige Inkubation mit CD49e (5H10-27)- und Isotyp-DOX-ILP (primärer Mechanismus, siehe Tab. 4) erfolgte ohne vorherige Beschichtung der Zellen mit 0-58,8 μM DOX, ebenfalls in Triplikaten. Anschließend wurde das DOX-haltige Medium durch Nährmedium ersetzt und die Zellen für 24, 48, 72 bzw. 96 h bei 37 °C inkubiert. Bei 48-96-stündiger Inkubation wurde ein täglicher Wechsel des Nährmediums durchgeführt.

Das Versuchsende wurde nach entsprechender Inkubationszeit mit dem Austausch des DOX-haltigen bzw. Nährmediums durch Resazurin-haltiges Nährmedium (10%) eingeleitet. Abhängig von der verwendeten Zelllinie und Inkubationszeit fand nach 1-4 h die fluorimetrische Auswertung bei 544_{Ex}/590_{Em} (FLUOstar OPTIMA) statt. Für die Analyse wurde die Resazurin-Autofluoreszenz (ohne Zellen) von allen ermittelten Werten subtrahiert. Die ermittelte MFI bei 0 μM DOX (Blank) wurde als 100% Zellviabilität definiert. Die Blank-Zusammensetzung wurde dabei für jede Probe auf das jeweilige Lösungsmittel-Verhältnis angepasst.

2.2.12 Zellbindungsversuche

Für die Untersuchung des Bindungsverhaltens RPE-konjugierter Antikörper sowie unterschiedlich beschichteter DOX-ILP an Hep55.1C-Zellen wurden die Tumorzellen nach Ablösen und Waschen in erwärmtem Nährmedium resuspendiert (siehe 2.2.9), die Zellzahl bestimmt (siehe 2.2.10) und die gewählte Anzahl an Zellen für eine definierte Zeit bei 37 °C mit Antikörper oder DOX-ILP inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 10 s bei 5000 Upm ($\approx 2400g$) abzentrifugiert und der Überstand in Triplikaten in 384-Well-Mikroplatten fluorimetrisch analysiert (RPE-konjugierte Antikörper: 544_{Ex}/580_{Em}, DOX-ILP: 485-12_{Ex}/580_{Em}, FLUOstar OPTIMA). DOX-ILP mussten vor der Analyse mit 1% Triton X-100 (1:2) aufgebrochen werden, um eingeschlossenes DOX-HCl frei zugänglich zu machen.

Zusätzlich wurde eine zellfreie Antikörper- bzw. DOX-ILP-Kontrolle in Medium mitgeführt. Da der Überstand fluorimetrisch analysiert wurde, erfolgte die Quantifizierung des gebundenen Antikörpers bzw. DOX-ILP aus der Differenz zur Kontrolle. Abschließend konnte die pro Zelle gebundene Menge Antikörper bzw. DOX berechnet werden. Zusätzlich zur quantitativen Analyse wurde eine qualitative Bewertung der Antikörper- bzw. DOX-ILP-Zellbindung vorgenommen. Dazu wurden die Zellen mit kaltem DPBS gewaschen (2×5 min, 2300 Upm \approx 500g, 4 °C). Abschließend wurden die Zellen in Abhängigkeit der Zellzahl in 200 μ l oder 1 ml DPBS resuspendiert und gebundene Antikörper bzw. DOX-ILP fluoreszenzmikroskopisch am Zeiss Axio Observer.Z1 visualisiert (63×/1,30 W Ph3-Objektiv; Zeiss). Für die Darstellung RPE-konjugierter Antikörper wurden eine Anregung von 555 nm, eine Lichtquellenintensität von 100% sowie eine Belichtungszeit von 1 s gewählt, für DOX-ILP entsprechend 470 nm, 50% sowie 220 ms.

Zur Untersuchung der Hep55.1C-Bindung von RPE-konjugiertem anti-CD49e (5H10-27), CD49e (5H10-27)- und Isotyp-DOX-ILP wurden diese mit 0,5 oder 10×10^6 Zellen für 5 min bei 37 °C inkubiert (Tab. 6). Die quanti- und qualitative Analyse erfolgte nach obiger Beschreibung.

Zur Untersuchung der Hep55.1C-Bindung von RPE-konjugierten anti-rat IgG- und Isotyp-Antikörpern sowie anti-rat IgG- und Isotyp-DOX-ILP wurden zunächst $0,5 \times 10^6$ Zellen mit einem Überschuss an unkonjugiertem anti-CD49e (5H10-27) (2 μ g/ml) für 5 min bei 37 °C koinkubiert und somit beschichtet. Anschließend erfolgte dreimaliges Waschen in Rundbodenröhrchen in kaltem DPBS (je 5 min, 300g, 4 °C). Die CD49e (5H10-27)-beschichteten Zellen wurden daraufhin mit der Antikörper- bzw. DOX-ILP-Lösung für 30 min bei 37 °C inkubiert (Tab. 6). Die qualitative Analyse erfolgte nach obiger Beschreibung.

2.2.13 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Experimente erfolgte mit der Software SPSS (IBM). Die Messwerte unterschiedlicher Gruppen wurden mittels *t*-Test für unabhängige Stichproben verglichen. Bei Alphafehler-Kumulierung wurde anschließend eine Korrektur nach der Bonferroni-Holm-Prozedur vorgenommen. Statistische Signifikanz wurde wie folgt definiert: * bzw. # $p < 0,05$ und ** bzw. ## $p < 0,01$. Alle Daten wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) dargestellt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Antikörperselektion für die Nanopartikelbeschichtung

3.1.1 Endothelspezifische Antikörper werden durch eine sehr unterschiedliche Dynamik der Bindung am Endothel charakterisiert

Wichtig für eine hochspezifische Anreicherung von Antikörpern und der damit beschichteten Nanopartikel ist eine homogene Expression des jeweiligen Antigens durch die Target-Endothelzellen. Vorherige Analysen der AG Ryschich (Thomann, 2014; Thomann *et al.*, 2014) haben eine entsprechende homogene Expression von CD146, CD31 sowie CD105 in Mausgewebe (Tumor und Leber) nachweisen können, weshalb diese Endothelmarker auch in der vorliegenden Arbeit weiter analysiert wurden. Andere Vorarbeiten haben ergeben, dass die minimale Zeit der ersten intravaskulären Passage nur 5-10 s beträgt (Faye *et al.*, 2011; Winkler *et al.*, 2018). Der ausgewählte Endothelmarker muss demnach im Tumorblutgefäßsystem luminal gut zugänglich sein und innerhalb nur weniger Sekunden vom entsprechenden Antikörper gebunden werden können. Um die Antikörperbindung in normalem und Tumorgewebe in dieser kurzen Zeit zu analysieren, wurde das Bindungsvermögen unterschiedlicher endothelspezifischer Antikörper in Maus- (HCC, Lebermetastasen des Pankreaskarzinoms, Leber) und humanen Gewebeproben (HCC, Leber) mittels Immunfluoreszenzfärbung (15 min und 5 s Inkubation), wie in 2.2.2 beschrieben, verglichen (Abb. 10, Abb. 11 und Abb. 12).

In Mausgewebe (siehe Abb. 10) zeigten alle ausgewählten monoklonalen Antikörper eine detektierbare Endothelbindung bei einer Konzentration von 2 µg/ml nach 15 min Inkubation. Für anti-CD34 (MEC14.7) konnte eine Endothelbindung nur in Tumorgewebe, nicht in Mausleber nachgewiesen werden. Anti-CD34 (RAM34) zeigte in Mausleber eine Endothelbindung vorwiegend in großen Gefäßen. Für anti-CD49e (5H10-27) und in geringerem Ausmaß für anti-CD105 (MJ7/18) war zudem auch eine Bindung auf Tumorzellen nachweisbar. Bei selber Antikörperkonzentration zeigten jedoch nur drei der untersuchten Antikörper, anti-CD146 (ME-9F1), anti-CD31 (390) und anti-CD49e (5H10-27), eine detektierbare Endothelbindung nach nur 5 s Inkubation. Daher werden diese drei Antikörper im Folgenden als *fast binding antibodies* (fbAb, schnell bindende Antikörper) bezeichnet.

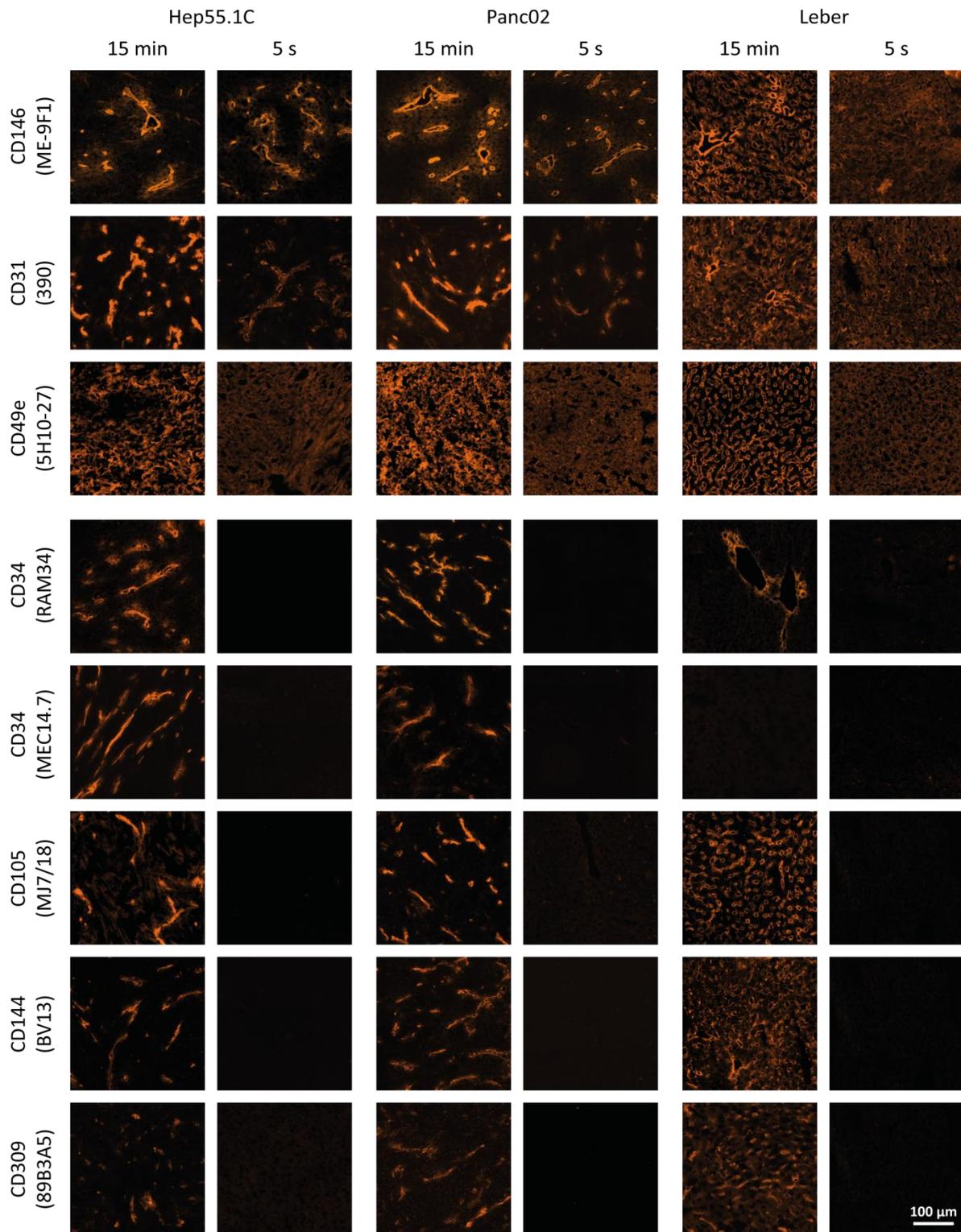


Abb. 10: Bindung endothelspezifischer Antikörper in Mausgewebe. Die Dynamik der Endothelbindung acht verschiedener endothelspezifischer RPE-konjugierter Antikörper (2 µg/ml; orange dargestellt) in Mausgewebe wurde durch direkte Immunfluoreszenzfärbung nach 15 min und 5 s verglichen. Die Abbildung zeigt repräsentative Aufnahmen für jeden Antikörperklon; n = 2.

Da eine schnelle Endothelbindung des Antikörpers unerlässlich für die Endothelanreicherung im Modell der isolierten Leberperfusion bzw. Perfusion des Tumors *in vivo* ist, wurden hauptsächlich fbAb für weitere Analysen ausgewählt.

In humanem Gewebe (siehe Abb. 11 und Abb. 12) zeigten alle ausgewählten monoklonalen Antikörper eine detektierbare Endothelbindung bei einer Konzentration von 2 µg/ml nach 15 min Inkubation. Eine Ausnahme war anti-CD146 (SHM-57), für den nur in Tumorgewebe eine Endothelbindung nachweisbar war, jedoch nicht in humaner Leber (Abb. 12). Anti-CD49e (NKI-SAM-1) zeigte zudem zwei unterschiedliche Bindungsmuster in HCC: (1) nur auf Endothelzellen, (2) auf Endothel- und Tumorzellen (Abb. 11).

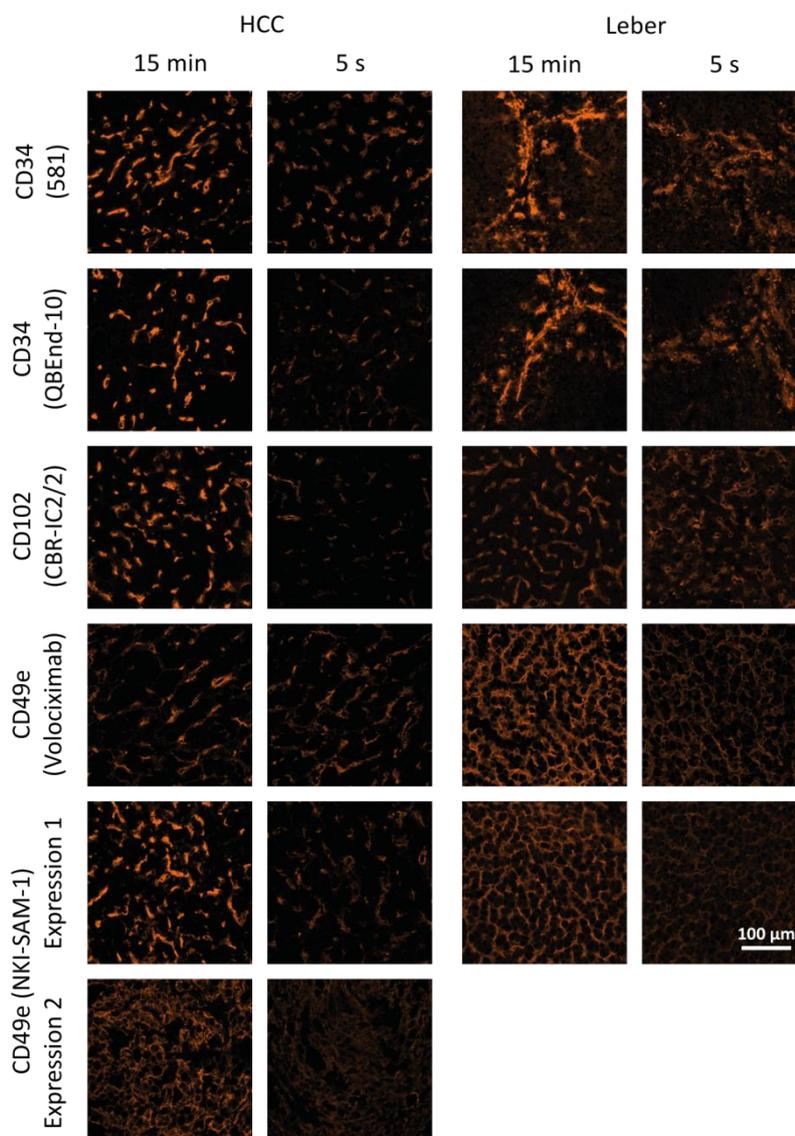


Abb. 11: Bindung endothelspezifischer Antikörper in humanem Gewebe I. Die Dynamik der Endothelbindung fünf verschiedener endothelspezifischer Antikörper (2 µg/ml; RPE: orange dargestellt) in humanem Gewebe wurde durch Immunfluoreszenzfärbung nach 15 min und 5 s verglichen. Die Abbildung zeigt repräsentative Aufnahmen für jeden Antikörperklon; n = 2.

Bei selber Antikörperkonzentration zeigten fünf der untersuchten Antikörper, anti-CD34 (581 und QBEnd-10), anti-CD102 (CBR-IC2/2) und anti-CD49e (Volociximab und NKI-SAM-1), eine detektierbare Endothelbindung nach nur 5 s Inkubation (Abb. 11).

Das Bindungsverhalten der untersuchten Antikörper wies damit in humanem und Mausgewebe eine unterschiedliche Dynamik auf. Anti-CD49e erwiesen sich hierbei als einzige Ausnahme, da diese in beiden Gewebetypen schon nach nur 5 s Inkubation eine detektierbare Endothelbindung zeigten.

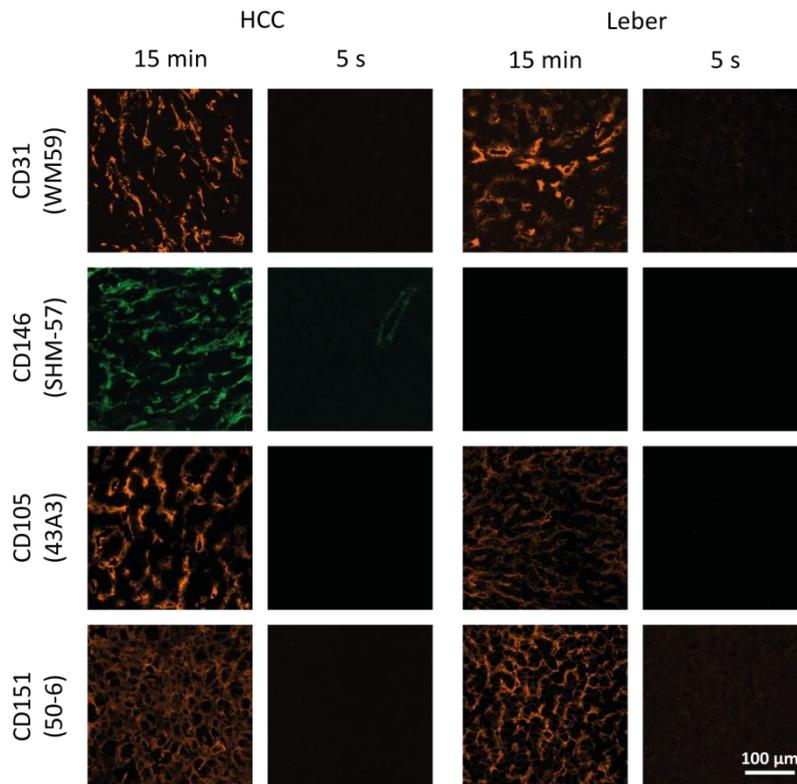


Abb. 12: Bindung endothelspezifischer Antikörper in humanem Gewebe II. Die Dynamik der Endothelbindung vier verschiedener endothelspezifischer Antikörper (2 µg/ml; RPE: orange dargestellt, Alexa Fluor 488: grün dargestellt) in humanem Gewebe wurde durch Immunfluoreszenzfärbung nach 15 min und 5 s verglichen. Die Abbildung zeigt repräsentative Aufnahmen für jeden Antikörperklon; n = 2.

3.1.2 Quantitative Dynamik der Antikörperbindung ist Gewebetyp-unabhängig

Um die Dynamik der Antikörperbindung am Endothel in HCC, Lebermetastasen des Pankreaskarzinoms und Leber quantifizieren zu können, wurden zwei Methoden angewandt: (1) die Analyse der Bindungsgeschwindigkeit selektierter endothelspezifischer Antikörper mittels EC_{50} -Bestimmung an histologischen Präparaten (siehe 2.2.2, 2.2.3) sowie (2) deren Avidität zu LSEC (siehe 2.2.4). Da alle folgenden *ex vivo*- und *in vivo*-Experimente im

Mausmodell durchgeführt wurden, hat man sich hierbei auf die Analyse von anti-Maus-Antikörpern fokussiert.

Zunächst wurde die EC_{50} der fbAb (anti-CD146 (ME-9F1), anti-CD31 (390), anti-CD49e (5H10-27)) mit der von drei, in der deskriptiven Analyse (Abb. 10) langsamer bindenden Antikörpern (anti-CD309 (89B3A5), anti-CD144 (BV13), anti-CD105 (MJ7/18)) verglichen. Die EC_{50} -Bestimmung erfolgte dazu nach 15 min Inkubation der RPE-konjugierten Antikörper an Mausleberpräparaten. Dabei ist die Bindungsgeschwindigkeit des Antikörpers zum untersuchten Gewebe umso höher, je niedriger der ermittelte EC_{50} -Wert ist. Die in 3.1.1 als fbAb deklarierten Antikörper wiesen mit 251-276 ng/ml eine niedrige und vergleichbare EC_{50} auf und zeigten damit eine hohe Bindungsgeschwindigkeit zum Mausleberendothel (siehe Abb. 13). Anti-CD105 (MJ7/18) zeigte mit einem fast zehnfach höheren EC_{50} -Wert von 2168 ng/ml eine wesentlich geringere Bindungsgeschwindigkeit zum Mausleberendothel. Bei anti-CD309 (89B3A5) und anti-CD144 (BV13) konnte der EC_{50} -Wert nicht ermittelt werden, da selbst bei einer sehr hohen Startkonzentration von 128 $\mu\text{g/ml}$ keine Sättigung der MFI-Werte erreicht werden konnte (angedeutet durch unterbrochene Balken in Abb. 13). Die mutmaßlichen EC_{50} -Werte waren mit >20000 ng/ml für anti-CD144 (BV13) sowie anti-CD309 (89B3A5) wesentlich höher als die der anderen vier getesteten Antikörper und deutete damit auf eine wesentlich geringere Bindungsgeschwindigkeit derselben zu Mausleberendothel hin.

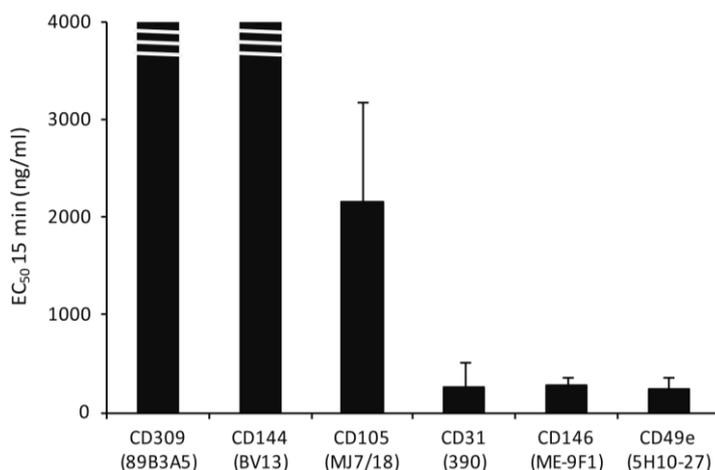


Abb. 13: EC_{50} endothelspezifischer Antikörper nach 15 min in normaler Leber. Für drei fbAb sowie drei nicht-fbAb wurde die EC_{50} nach 15 min in normaler Leber bestimmt. Unterbrochene Balken = geschätzter EC_{50} -Wert aufgrund fehlender Sättigung; Darstellung als Mittelwerte \pm SD; $n = 3$ für fbAb und anti-CD105; $n = 2$ für anti-CD309 und anti-CD144.

Für die EC_{50} -Bestimmung an murinem HCC, Lebermetastasen des Pankreaskarzinoms und Leber nach 15 min sowie 5 s Inkubation wurden fbAb selektiert (siehe Abb. 14). Dabei ließ sich feststellen, dass alle drei fbAb mit untereinander vergleichbar hoher Geschwindigkeit an den unterschiedlichen Gewebetypen binden. Zudem zeigten alle drei fbAb eine Gewebetyp-unabhängige Bindungsdynamik mit durchweg geringfügig niedrigeren EC_{50} -Werten in Mausleber. Weiterhin war das Bindungsverhalten der drei fbAb in den drei unterschiedlichen Gewebetypen nach 15 min und 5 s Inkubation vergleichbar. Anti-CD31 (390) wies nach 5 s Inkubation durchweg die niedrigsten EC_{50} -Werte auf (Abb. 14B).

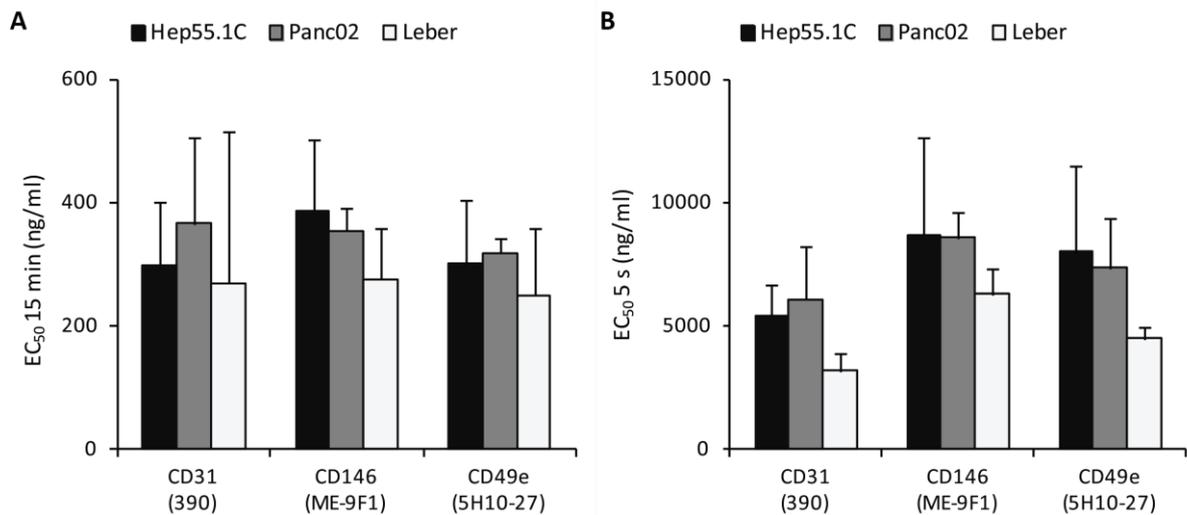


Abb. 14: EC_{50} von fbAb in unterschiedlichen Gewebetypen. Für drei fbAb wurde die EC_{50} nach 15 min (A) und 5 s (B) in unterschiedlichem Mausegewebe ermittelt. Darstellung als Mittelwerte \pm SD; n = 3.

Zusätzlich zur Analyse der Bindungsdynamik selektierter endothelspezifischer monoklonaler Antikörper wurde deren Avidität zu LSEC in einem *in vitro*-Modell untersucht. Unabhängig von ihrer Einordnung in fbAb (anti-CD31, anti-CD146) oder nicht-fbAb (anti-CD144, anti-CD105) zeigten alle vier untersuchten endothelspezifischen Antikörper eine vergleichbar hohe Avidität zu LSEC (1,9-2,8 fg/Zelle, Abb. 15). Zur Kontrolle wurde ebenfalls die Isotyp-Antikörper-Avidität zu LSEC untersucht, die mit 0,39 fg/Zelle wesentlich geringer war als die der untersuchten endothelspezifischen Antikörper.

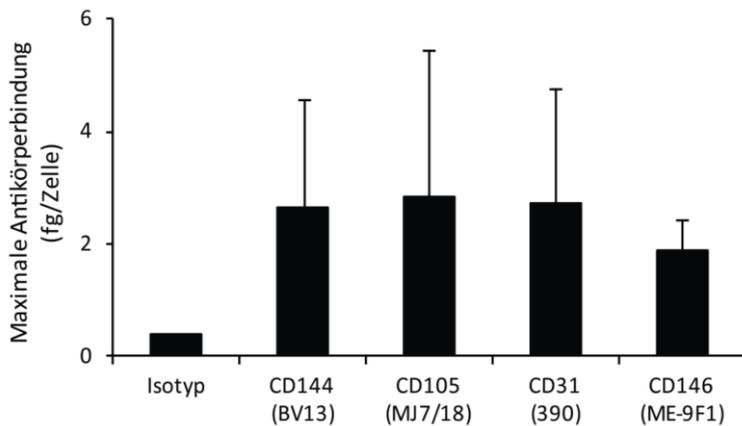


Abb. 15: Avidität endothelspezifischer Antikörper zu LSEC. Für vier endothelspezifische monoklonale sowie Isotyp-Antikörper wurde die maximale Bindung durch LSEC nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C ermittelt. Darstellung als Mittelwerte \pm SD; n = 3 für anti-CD105, anti-CD31, anti-CD146; n = 2 für anti-CD144; n = 1 für Isotyp.

3.1.3 Konjugation von Antikörpern kann deren Bindung stark beeinträchtigen

Es ist bekannt, dass Proteinmodifikation zu Affinitätsänderung und folglich zu verändertem Bindungsverhalten führen kann (Schellenberger *et al.*, 2004). Die für diese Arbeit verwendeten endothelspezifischen Antikörper wurden sowohl für die isolierte Leberperfusion *ex vivo* als auch für die Nanopartikelbeschichtung in modifiziertem Zustand verwendet. Deshalb wurde hier mittels EC_{50} -Analyse für 15 min und 5 s exemplarisch untersucht, inwiefern die Konjugation von anti-CD146 (ME-9F1) dessen Bindungsverhalten an Hep55.1C-Gewebe beeinflusst (Abb. 16). Die RPE- und Alexa Fluor 488-konjugierten Antikörper wurden kommerziell erworben und sollten v.a. in *ex vivo*-Experimenten für fluorimetrische Analysen und die mikroskopische Bildgebung zum Einsatz kommen. Zur ILP-Beschichtung wurde der Antikörper mit Streptavidin, zur MNP-Beschichtung mit Thiolgruppen konjugiert, weshalb auch der Einfluss dieser beiden Konjugationsformen untersucht wurde.

Abb. 16 zeigt, dass alle vier untersuchten Konjugationsformen von anti-CD146 (ME-9F1) dessen EC_{50} -Werte für 15 min und 5 s erhöhte. Besonders deutlich war dies bei den hier untersuchten Alexa Fluor 488-konjugierten Antikörpern sowie nach selbst durchgeführter Streptavidin-Konjugation. Letztere führte zu statistisch signifikanter Erhöhung ($p < 0,05$; Abb. 16B) der 5 s- EC_{50} -Werte. Eine RPE- sowie Thiolgruppenkonjugation führte dagegen nur zu geringfügiger Erhöhung der EC_{50} -Werte und zeigte daher keine wesentliche Reduktion der Bindungsgeschwindigkeit des Antikörpers. Von der Verwendung Alexa Fluor 488-

konjugierter Antikörper für fluoreszenzbasierte quantitative Analysen wurde daher abgesehen. Die Beeinträchtigung der Antikörperbindungsdynamik durch die Konjugation mit Streptavidin hingegen konnte nicht vermieden werden und stellt einen nicht zu vernachlässigenden Faktor bei der Interpretation der Daten mit Streptavidin-Antikörperbeschichteten ILP dar.

Zusätzlich wurden für anti-CD146 (ME-9F1) und anti-CD105 (MJ7/18) die EC_{50} -Werte nach 15 min Inkubation in muriner Leber sowie die endotheliale Anreicherungsrate bei 1 ml/min nach Applikation von 200 ng Antikörper für die unkonjugierte sowie die RPE-konjugierte Form verglichen (Tab. 7). Dabei ließ sich für beide Antikörper eine deutliche Erhöhung der EC_{50} -Werte und Reduktion der prozentualen endothelialen Anreicherung zeigen. Das Bindungsverhalten der hier verwendeten RPE-konjugierten anti-CD105 (MJ7/18) war dabei jedoch wesentlich stärker beeinflusst.

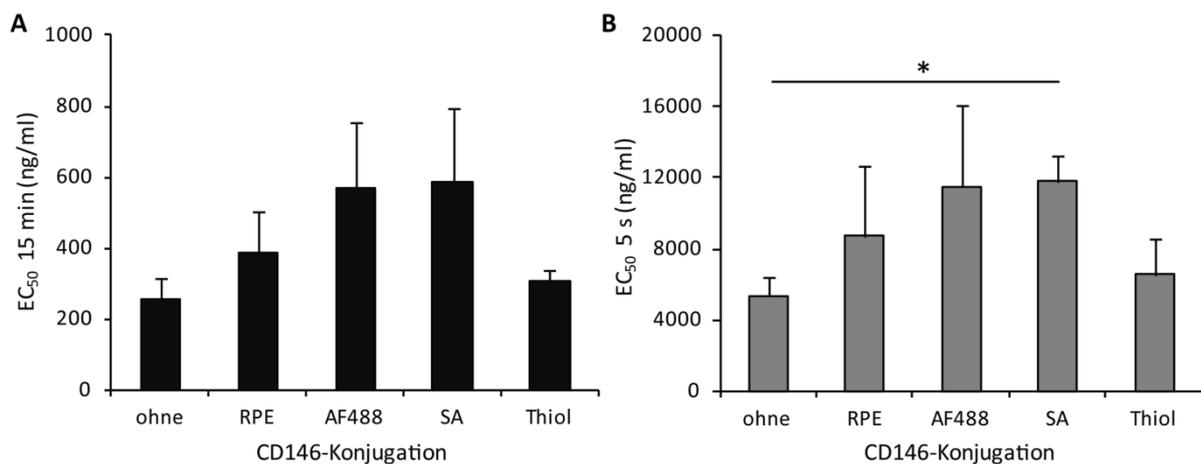


Abb. 16: Einfluss der Antikörperkonjugation auf das Bindungsverhalten. Mittels EC_{50} -Bestimmung für 15 min (A) und 5 s (B) in Hep55.1C-Gewebe wurde das Bindungsverhalten von anti-CD146 (ME-9F1) in Abhängigkeit der Konjugation untersucht. AF488 = Alexa Fluor 488, RPE = R-Phycoerythrin, SA = Streptavidin, Thiol = Thiolgruppen; Darstellung als Mittelwerte \pm SD; n = 3; * $p < 0,05$.

Tab. 7: Einfluss der RPE-Konjugation auf das Bindungsverhalten verschiedener Antikörper. Dargestellt ist der Faktor, um den der EC_{50} -Wert bzw. die endotheliale Anreicherungsrate des Antikörpers durch RPE-Konjugation erhöht bzw. reduziert wurde; n = 3.

Methode	CD146	CD105
EC_{50} (15 min, Leber)	1,74	2,69
endotheliale Anreicherung (1 ml/min; 200 ng)	1,77	5,44

3.2 Antikörperretention während der ersten intravaskulären Passage

3.2.1 Erstbeschreibung „endotheliale Anreicherung“: nahezu vollständige Retention selektierter endothelspezifischer Antikörper bei der ersten intravaskulären Passage

Mithilfe des Modells der isolierten Leberperfusion wurde die Retention verschiedener endothelspezifischer Antikörper während der ersten intravaskulären Passage quantitativ analysiert. Hierfür wurde als Standard-Perfusionsgeschwindigkeit 1 ml/min gewählt, da diese einem physiologisch intraportalen Druck von 10 mmHg entspricht (Winkler *et al.*, 2018). Bei der Perfusion mit einer, der konventionellen klinischen Dosis (ca. 8 mg/kg) entsprechenden Antikörperdosis (12,8 µg/Leber) zeigte sich eine detektierbare Retention während der ersten intravaskulären Passage. Die Extraktionseffizienz betrug in Abhängigkeit des gewählten Antikörpers jedoch nur 6,5-18% (Abb. 17A). Wurde die Leber hingegen mit einer deutlich geringeren Antikörperdosis (0,2 µg/Leber, ca. 0,125 mg/kg) perfundiert, wurden 80-86% (anti-CD31, anti-CD146) bzw. 64% (anti-CD105) der injizierten Antikörpermenge während der ersten intravaskulären Passage abgefangen ($p < 0,01$). Isotyp-Antikörper wurde hingegen bei beiden Applikationsdosen deutlich geringer und unspezifisch zurückgehalten. Auch die %ID/g war für die drei endothelspezifischen Antikörper bei Applikation der niedrigen Dosis statistisch signifikant größer als nach Applikation der hohen Dosis ($p < 0,01$; Abb. 17B).

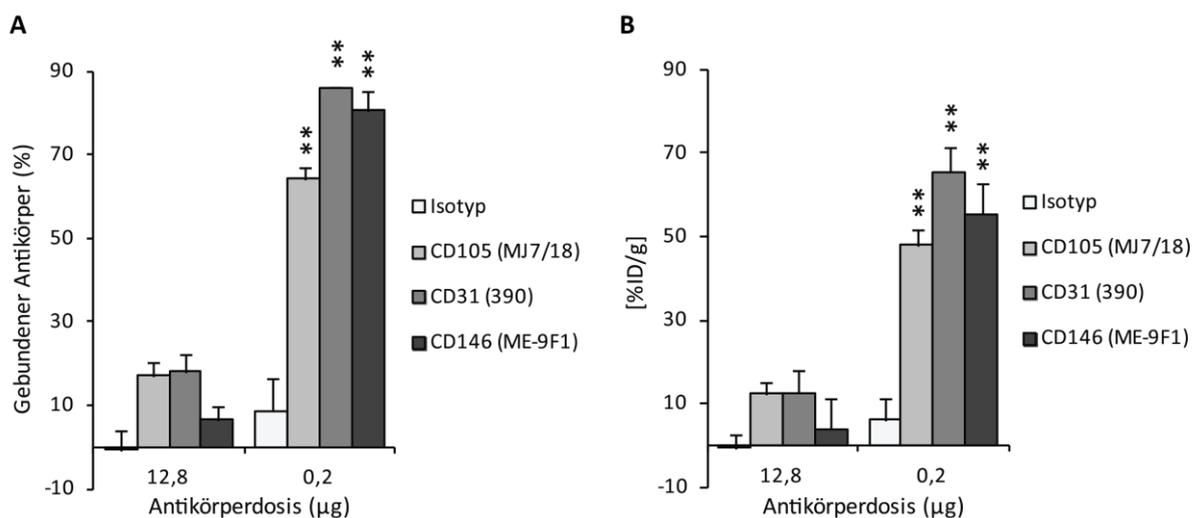


Abb. 17: Endotheliale Anreicherung selektierter endothelspezifischer Antikörper. Prozentuale endotheliale Anreicherungsrate (A) und %ID/g (B) für vier verschiedene, unkonjugierte Antikörper in Abhängigkeit der applizierten Dosis nach Perfusion der isolierten Mausleber mit 1 ml/min. Die Quantifizierung erfolgte mittels ELISA. Darstellung als Mittelwerte \pm SD; $n = 3$ für anti-CD105, anti-CD31, anti-CD146; $n = 4$ für Isotyp; $***p < 0,01$ zwischen unterschiedlichen Konzentrationen desselben Antikörpers.

Das hier beschriebene Phänomen der nahezu vollständigen Retention selektierter endothelspezifischer Antikörper bei der ersten intravaskulären Passage wird im Folgenden als „endotheliale Anreicherung“ bezeichnet.

3.2.2 Effizienz der endothelialen Anreicherung ist Antikörperdosis-unabhängig

Die eingesetzte Antikörperdosis ist neben der gewählten Perfusionsgeschwindigkeit sowie der Injektionsdauer ein potentiell wichtiger Faktor für die Effizienz der endothelialen Anreicherung. Für die in Abb. 18 dargestellten Ergebnisse wurden RPE-konjugierte Antikörper im Modell der isolierten Leberperfusion bei einer Perfusionsgeschwindigkeit von 1 ml/min verwendet und die prozentuale endotheliale Anreicherung fluorimetrisch quantifiziert. Die Effizienz der endothelialen Anreicherung der beiden fbAb ließ sich durch Erhöhung der applizierten Antikörperdosis nicht erhöhen, sondern betrug bei allen fünf untersuchten Dosen 33-47% für anti-CD31 (390) sowie 45-53% für anti-CD146 (ME-9F1) (Abb. 18A). Eine Anreicherung von Isotyp-Antikörper konnte nicht festgestellt werden (nur geringfügig bei 800 ng). Stattdessen war das detektierte RPE-Fluoreszenzsignal des Perfusats erhöht, was rechnerisch zu negativen Werten für die endotheliale Anreicherung des Isotyp-Antikörpers führte. Zusätzlich wurde die %ID/g berechnet, welche ebenfalls unabhängig von der verwendeten Antikörperdosis war (Abb. 18B).

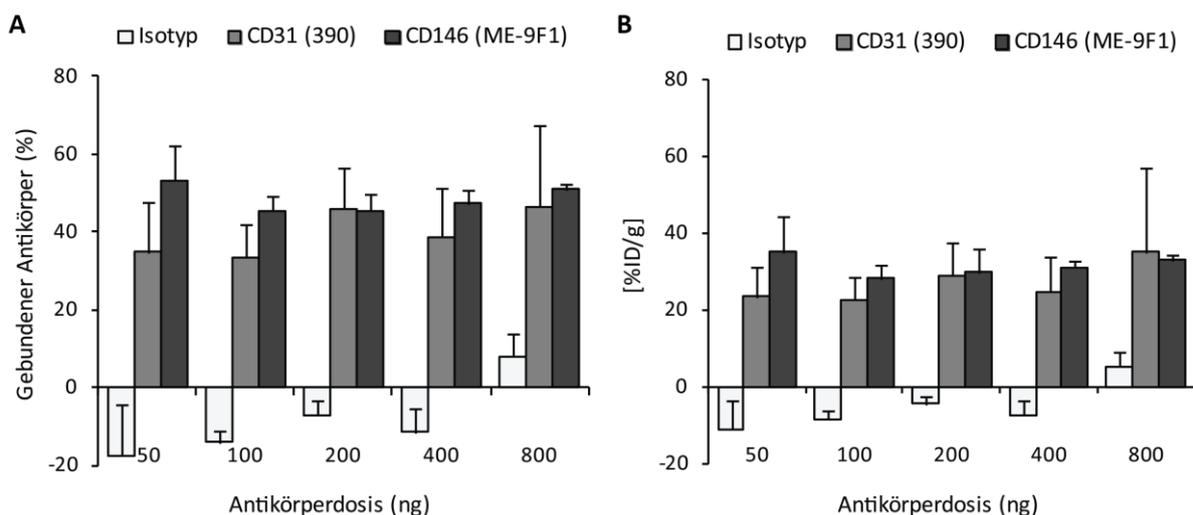


Abb. 18: Antikörperdosis-unabhängige endotheliale Anreicherung. Prozentuale endotheliale Anreicherungsrate (A) und %ID/g (B) für drei verschiedene, RPE-konjugierte Antikörper in Abhängigkeit der applizierten Dosis nach Perfusion der isolierten Mausleber mit 1 ml/min. Darstellung als Mittelwerte \pm SD; n = 3 für anti-CD31 und anti-CD146; n = 2 für Isotyp.

3.2.3 Effizienz der endothelialen Anreicherung ist Perfusionsgeschwindigkeits-abhängig

Die applizierte Perfusionsgeschwindigkeit ist ein weiterer potentiell wichtiger Faktor für die Effizienz der endothelialen Anreicherung. Für die in Abb. 19 dargestellten Ergebnisse wurden RPE-konjugierte Antikörper im Modell der isolierten Leberperfusion mit einer Dosis von 100 ng appliziert und die prozentuale endotheliale Anreicherung fluorimetrisch quantifiziert. Eine Reduzierung der Perfusionsgeschwindigkeit resultierte für alle endothelspezifischen Antikörper in einer erhöhten endothelialen Anreicherung. Die Verlängerung der Expositionszeit des Antikörpers mit dem entsprechenden endothelialen Antigen durch die Reduktion der Perfusionsgeschwindigkeit von 1 auf 0,5 ml/min führte zu wesentlicher Erhöhung der endothelialen Anreicherungsrate, signifikant ($p < 0,01$) für anti-CD105 (MJ7/18) und anti-CD146 (ME-9F1) (Abb. 19A). Durch weitere Reduktion von 0,5 auf 0,2 ml/min konnte, außer für anti-CD105 (MJ7/18) ($p < 0,05$), zwar keine weitere signifikante Erhöhung der endothelialen Anreicherungsrate festgestellt werden, jedoch eine deutliche Tendenz. Eine Isotyp-Antikörper-Anreicherung konnte nicht festgestellt werden. Stattdessen war das detektierte RPE-Fluoreszenzsignal des Perfusats erhöht, was rechnerisch zu negativen Werten für die endotheliale Anreicherung des Isotyp-Antikörpers führte. Die %ID/g war ebenfalls abhängig von der verwendeten Perfusionsgeschwindigkeit (Abb. 19B).

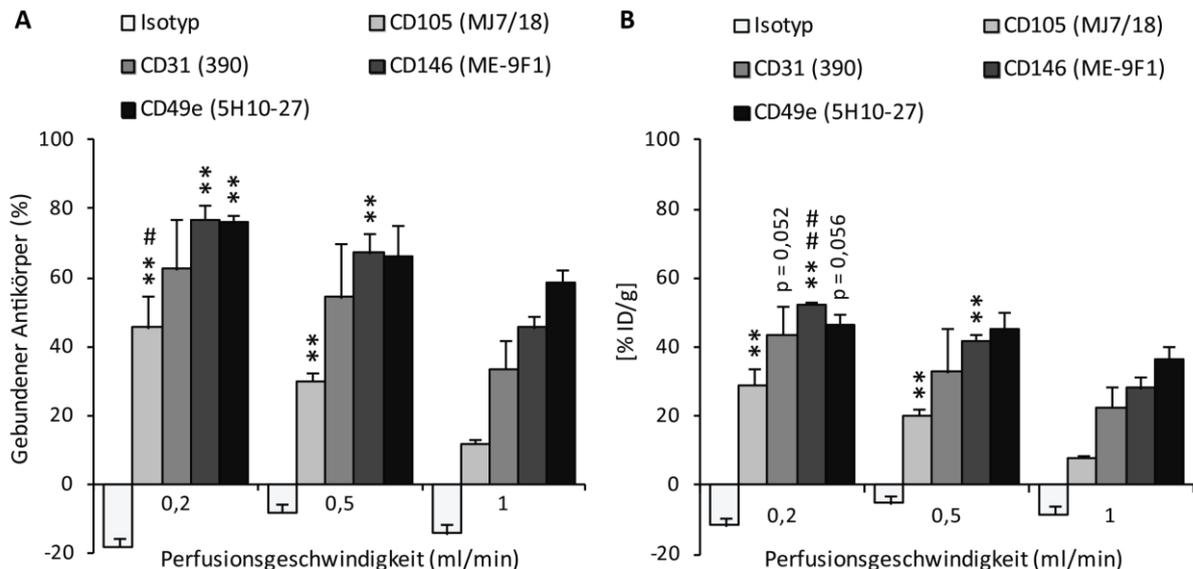


Abb. 19: Perfusionsgeschwindigkeits-abhängige endotheliale Anreicherung. Prozentuale endotheliale Anreicherungsrate (A) und %ID/g (B) für fünf verschiedene, RPE-konjugierte Antikörper in Abhängigkeit der Perfusionsgeschwindigkeit nach Applikation von 100 ng Antikörper im Modell der isolierten Mausleber. Darstellung als Mittelwerte \pm SD; $n = 3$ für endothelspezifische Antikörper; $n = 2$ für Isotyp; Signifikanz bezüglich 1 ml/min: $**p < 0,01$; Signifikanz bezüglich 0,5 ml/min: $\#p < 0,05$; $\#\#p < 0,01$.

Zusätzlich zur quantitativen Analyse der endothelialen Anreicherung wurde *whole-mount*-Mikroskopie nach der Perfusion mit RPE-konjugierten Antikörpern für die qualitative Überprüfung der Endothelbindung durchgeführt. Bei hoher Perfusionsgeschwindigkeit (1 und 0,5 ml/min) zeigte sich eine homogene Markierung der mikrovaskulären Blutgefäße. Nach der Perfusion mit 0,2 ml/min war die detektierte Blutgefäßmarkierung hingegen weniger homogen, aufgrund der höheren endothelialen Anreicherungsrate jedoch besser zu detektieren. Abb. 20 zeigt daher exemplarisch die durch *whole-mount*-Mikroskopie detektierte Blutgefäßmarkierung nach der Perfusion mit 0,2 ml/min für fünf verschiedene Antikörper. Eine Endothelbindung konnte für Isotyp-Antikörper nicht detektiert werden und war für anti-CD31 sowie anti-CD146 am deutlichsten sichtbar. Die Aufnahmen spiegeln die quantitativen Ergebnisse der endothelialen Anreicherung (siehe Abb. 19A) gut wider.

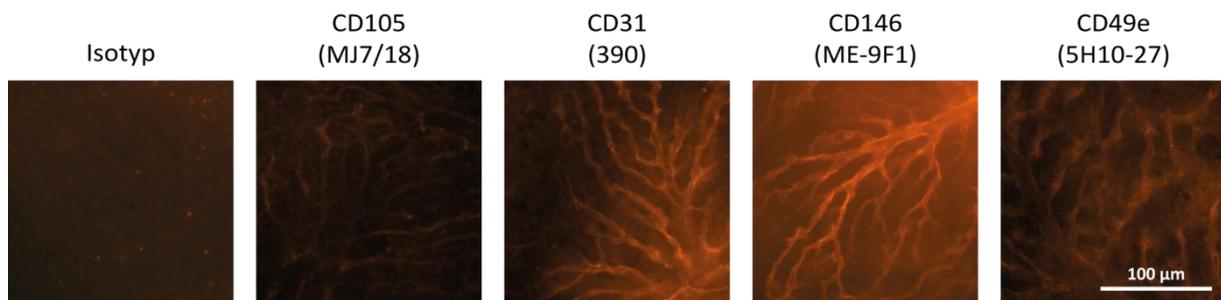


Abb. 20: *Whole-mount*-Mikroskopie des perfundierten Lebergewebes. Isolierte Mausleber wurde mit 100 ng RPE-konjugiertem Antikörper bei 0,2 ml/min perfundiert. Endothelbindung ist orange dargestellt. Die Abbildung zeigt repräsentative Aufnahmen für jeden Antikörperklon; n = 3 für endothelspezifische Antikörper; n = 2 für Isotyp.

3.2.4 Starke Effizienzbeeinträchtigung der endothelialen Anreicherung durch wiederholte oder Langzeitinjektion von Antikörpern

Ob die Effizienz der endothelialen Anreicherung durch wiederholte oder Langzeitinjektion von Antikörpern beeinflusst werden kann, wurde in zwei weiteren Experimentreihen untersucht (siehe 2.2.1.1). Dazu wurde zunächst eine diskontinuierliche isolierte Mausleberperfusion mit 100 ng RPE-konjugiertem anti-CD146 (ME-9F1) bei 0,2 und 1 ml/min durchgeführt. Dabei konnte eine fortschreitende Reduktion der endothelialen Anreicherungsrate nach jedem Zyklus beobachtet werden (Abb. 21).

In einer anderen Experimentreihe wurde die isolierte Mausleber mit 2 µg RPE-konjugiertem anti-CD146 (ME-9F1) bei 1 ml/min in unterschiedlichen Volumina von 10 µl – 16 ml perfundiert. Die höchste Anreicherungsrate wurde dabei nach der Perfusion mit 100 µl

erreicht, wohingegen Langzeitinjektion des Antikörpers eine schrittweise abnehmende Effizienz der endothelialen Anreicherung zeigte (Abb. 22). Auch nach der Perfusion mit 10 μ l war die Anreicherungsrate reduziert.

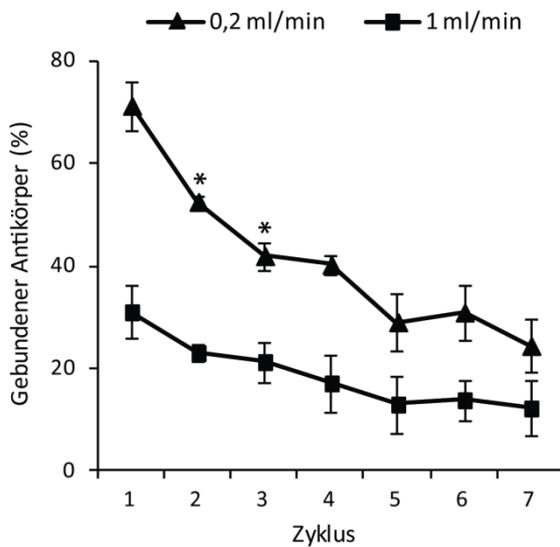


Abb. 21: Reduktion der endothelialen Anreicherung durch wiederholte Injektion. Prozentuale endotheliale Anreicherungsrate für 100 ng RPE-konjugierten anti-CD146 (ME-9F1) in Abhängigkeit des Zyklus nach Perfusion der isolierten Mausleber mit 0,2 bzw. 1 ml/min. Darstellung als Mittelwerte \pm SD; n = 3; signifikante Unterschiede zwischen aufeinanderfolgenden Werten: *p<0,05.

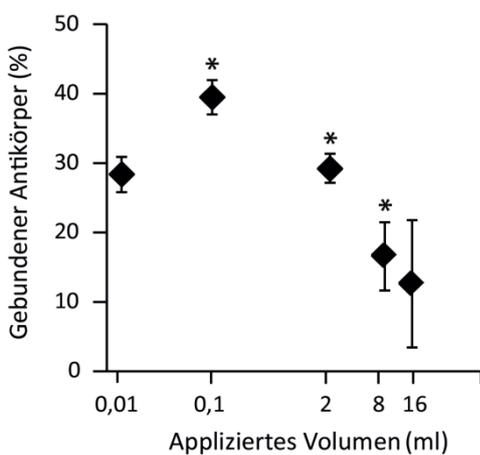


Abb. 22: Reduktion der endothelialen Anreicherung durch Langzeitinjektion. Prozentuale endotheliale Anreicherungsrate für 2 μ g RPE-konjugierten anti-CD146 (ME-9F1) in Abhängigkeit des applizierten Volumens nach Perfusion der isolierten Mausleber mit 1 ml/min. Darstellung als Mittelwerte \pm SD; n = 3; signifikante Unterschiede zwischen aufeinanderfolgenden Werten: *p<0,05.

3.2.5 EC_{50} der Antikörperbindung am histologischen Schnitt als Parameter für die Antikörperselektion zur Anwendung der endothelialen Anreicherung

Bei dem Vergleich der Ergebnisse der EC_{50} -Analyse für 15 min (siehe Abb. 13) sowie der endothelialen Anreicherungsrate bei der Perfusion mit 100 ng RPE-konjugiertem Antikörper und 1 ml/min (siehe Abb. 19A) konnte ein Zusammenhang der beiden Parameter festgestellt werden. Je höher der initial festgestellte EC_{50} -Wert, desto niedriger war die endotheliale Anreicherungsrate im Modell der isolierten Leberperfusion (Abb. 23). Die in Abschnitt 3.1.1 als fbAb deklarierten Antikörper wurden demzufolge auch am effizientesten am Endothel angereichert.

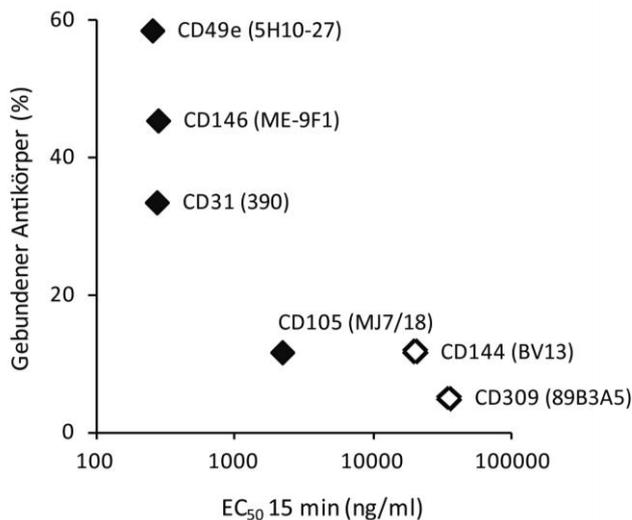


Abb. 23: Zusammenhang zwischen endothelialer Anreicherungsrate und EC_{50} . Prozentuale endotheliale Anreicherungsrate RPE-konjugierter Antikörper in Abhängigkeit der ermittelten EC_{50} -Werte in Lebergewebe nach 15 min. Die Mittelwerte sind hierfür ohne SD dargestellt. Offener Rhombus = geschätzter EC_{50} -Wert aufgrund fehlender Sättigung.

3.2.6 Negativer Zusammenhang zwischen lokaler Antikörperkonzentration und Masse des perfundierten Gewebes bei endothelialer Anreicherung

In einem weiteren Experiment wurde die lokale Antikörperanreicherung in Abhängigkeit der perfundierten Masse untersucht. Dazu wurde entweder die gesamte Mausleber oder nur ein kleines Segment (RMS) mit 100 ng RPE-konjugiertem anti-CD146 (ME-9F1) mit 0,2 ml/min/g perfundiert. Nach der Perfusion der geringen Gewebemasse des RMS ($0,21 \text{ g} \pm 0,03$) war die lokale Antikörperanreicherung (%ID/g), im Vergleich zur Perfusion der gesamten Leber ($1,32 \text{ g} \pm 0,14$; Abb. 24), signifikant erhöht. Dies zeigte sich auch durch das wesentlich stärkere Fluoreszenzsignal bei RMS-Perfusion in den *whole-mount*-Mikroskopieaufnahmen.

Die endotheliale Anreicherungsrate hingegen war bei der Perfusion von großer und kleiner Gewebemasse gleich (Abb. 24). Daher kann man von einem negativen Zusammenhang zwischen lokaler Antikörperanreicherung und der Masse des perfundierten Gewebes sprechen.

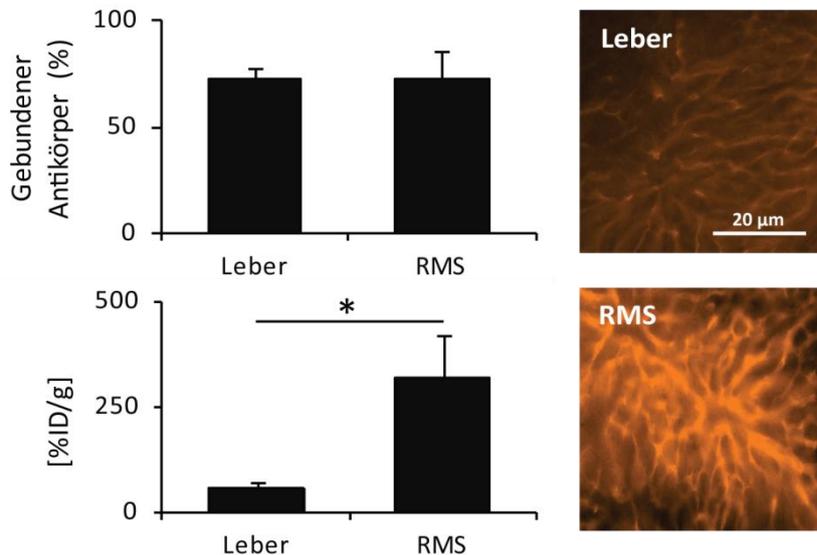


Abb. 24: Lokale Antikörperkonzentration in Abhängigkeit der Masse des perfundierten Gewebes. Prozentuale endotheliale Anreicherungsrate und %ID/g für 100 ng RPE-konjugierten anti-CD146 (ME-9F1) in Abhängigkeit des perfundierten Gewebes nach Perfusion des isolierten Gewebes mit 0,2 ml/min/g. Mittels *whole-mount*-Mikroskopie wurde die Endothelbindung (orange dargestellt) visualisiert. Die Abbildung zeigt repräsentative Aufnahmen. Darstellung als Mittelwerte \pm SD; n = 3; *p<0,05.

3.2.7 Nachweis der intratumoralen Antikörperakkumulierung mithilfe der endothelialen Anreicherung *in vivo*

Der arterielle Zugang über die *A. hepatica* gilt als spezifischer Zugang zum Tumorblutgefäßsystem des HCC und wird beispielsweise bei der TACE-Therapie angewandt (Liapi und Geschwind, 2007). Die i.a.-Injektion von ^{125}I -konjugiertem anti-CD146 (ME-9F1) (1 ng/g Körpergewicht) in das tumortragende RMS (0,21 g \pm 0,03) *in vivo* resultierte in einer sehr hohen lokalen Antikörperanreicherung im Tumorgewebe (125,8 %ID/g \pm 6,4; Abb. 25A). Die Antikörperanreicherung in normalen Organen war hingegen gering, mit Ausnahme der Lunge (56,9 %ID/g \pm 22,5). Auch die szintigrafische Bildgebung zeigte nach RMS-Perfusion einen hohen Kontrast des Tumors im Vergleich zu anderen Organen (Abb. 25B).

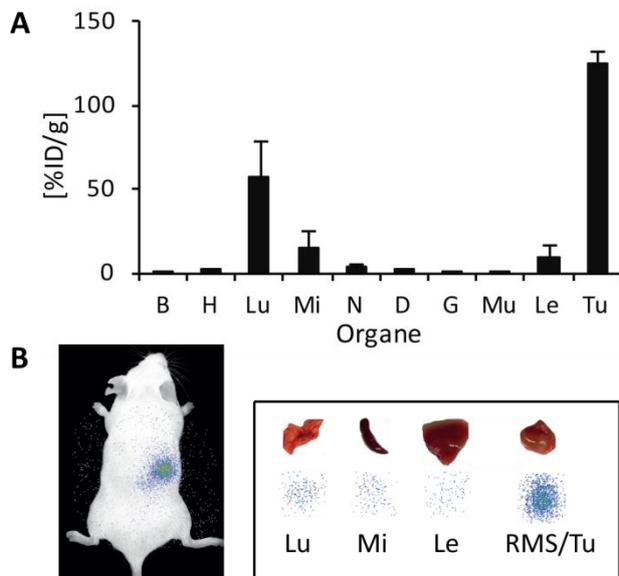


Abb. 25: Biodistribution von ^{125}I -konjugiertem anti-CD146 (ME-9F1) nach i.a.-Applikation *in vivo*. Tumortragende (RMS, Panc02) C57BL/6-Mäuse wurden mit 1 ng/g Körpergewicht ^{125}I -konjugiertem anti-CD146 (ME-9F1) i.a. perfundiert (lokoregionale Applikation). (A) Biodistribution des Antikörpers in den einzelnen Organen. (B) Szintigrafische Bildgebung repräsentativ für eine Maus. B = Blut, D = Darm, G = Gehirn, H = Herz, Le = Leber, Lu = Lunge, Mi = Milz, Mu = Muskel, N = Niere, RMS = rechtes mittleres Segment, Tu = Tumor; Darstellung als Mittelwerte \pm SD; n = 2.

3.3 Anwendbarkeit von Nanopartikeln für das Konzept der endothelialen Anreicherung – primärer und sekundärer Mechanismus

3.3.1 Effizienz der Nanopartikelbeschichtung und Dialysekontrolle

Zunächst wurde die Beschichtungseffizienz (gebundener Antikörper (ng) pro mg MNP) nach Beschichtung von NH_2 -MNP und PEG- NH_2 -MNP mit anti-CD146 (ME-9F1) verglichen. Dabei war die Beschichtung bei Verwendung der PEGylierten MNP-Variante mit 374 ng/mg nur ca. halb so effizient wie bei Verwendung der nicht PEGylierten Variante (701 ng/mg; Abb. 26A). Eine weitere Verschlechterung der Effizienz zeigte sich bei der Beschichtung PEGylierter MNP mithilfe der Fc-Fragment-Methode (145 ng/mg; Abb. 26A). Die Liposomenbeschichtung resultierte in einer Beschichtungseffizienz (gebundener Antikörper (ng) pro mg Lipid) von 6630-7970 ng/mg (Abb. 26B). Die Beschichtungseffizienz von DOX-ILP war unabhängig vom verwendeten Antikörper (Abb. 26B). Die nach Liposomenbeschichtung mitgeführte Dialysekontrolle (5-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zeigte, dass mit Dialyseende noch 24% des ungebundenen Antikörpers in der Dialysekassette vorhanden war. Die während der Beschichtungskontrolle

mitgeführte Dialysekontrolle (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) bestätigte eine effiziente Eliminierung ungebundenen Antikörpers aus der Dialysekassette (Abb. 27).

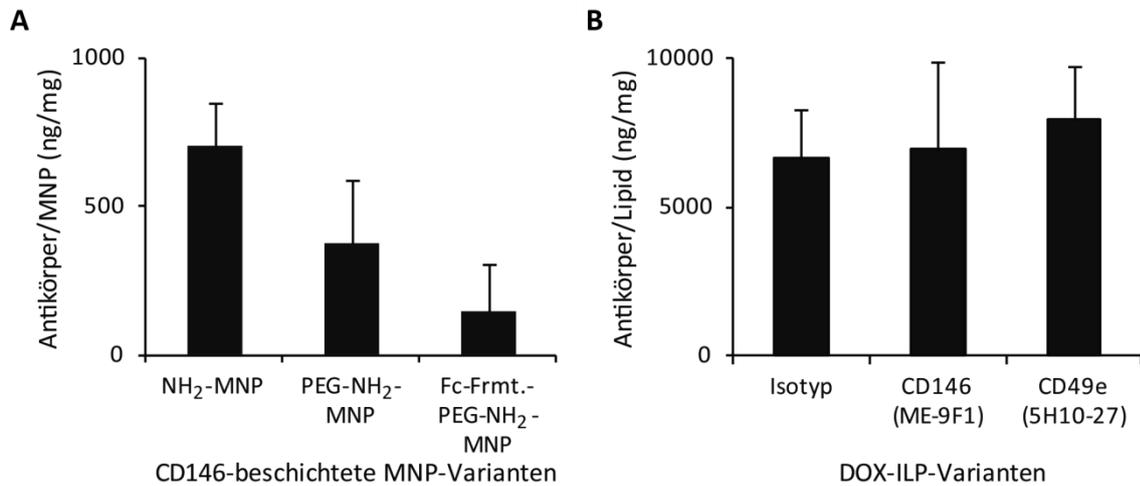


Abb. 26: Beschichtungseffizienz von MNP und Liposomen. (A) Effizienz der MNP-Beschichtung mit anti-CD146 (ME-9F1) in Abhängigkeit vom verwendeten MNP-Typ und der Beschichtungsmethode. (B) Effizienz der DOX-Liposomen-Beschichtung in Abhängigkeit vom verwendeten Antikörper. Fc-Frmt. = Fc-Fragment; Darstellung als Mittelwerte \pm SD; n = 6 für NH₂-MNP; n = 4 für PEG-NH₂-MNP; n = 5 für Fc-Fragment-PEG-NH₂-MNP; n = 7 für Isotyp-DOX-ILP; n = 10 für CD146-DOX-ILP; n = 6 für CD49e-DOX-ILP.

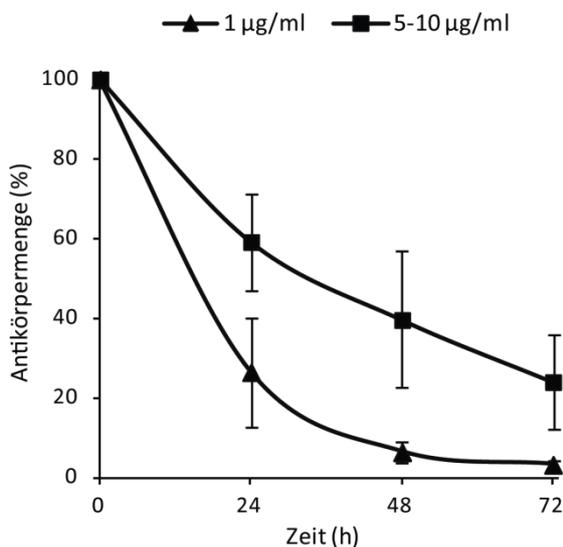


Abb. 27: Dialysekontrollen zur Liposomenbeschichtung. Nach der Liposomenbeschichtung durchgeführte Dialysekontrolle mit initialer Antikörperkonzentration von 5-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und parallel zur Beschichtungskontrolle durchgeführte Dialysekontrolle mit initialer Antikörperkonzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Dialysekontrolle beschreibt hier die Menge des in der Dialysekassette verbliebenen Alexa Fluor 488-konjugierten Antikörpers in Abhängigkeit von der Zeit. Darstellung als Mittelwerte \pm SD; n = 5 für 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$; n = 4 für 5-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Für histologische Analysen wurden zunächst beschichtete MNP verwendet, die notwendige Informationen über das Bindungsverhalten von Nanopartikeln in relativ kurzer Zeit liefern. Für die sich anschließenden Experimente wurde jedoch hauptsächlich mit ILP gearbeitet. Im Vergleich zu MNP haben sie ein höheres translationales Anwendungspotential für die intratumorale Substanzanreicherung bzw. Tumortherapie.

3.3.2 Bindung beschichteter Nanopartikel am Endothel substantiell schlechter als Antikörperbindung

Die Ergebnisse der EC_{50} -Analyse sowie der endothelialen Anreicherungsrate *ex vivo* haben anti-CD146 (ME-9F1) als einen von drei für die Nanopartikelanreicherung am Endothel vielversprechenden Antikörper herausgestellt. Für die Analysen der Nanopartikelbindung am histologischen Schnitt wurden zunächst beschichtete MNP verwendet. Dazu wurde Hep55.1C-Gewebe mit CD146-(Fc-Fragment)-(PEG)-NH₂-MNP bzw. unkonjugiertem anti-CD146 (ME-9F1) für 5 s, 15, 30 oder 60 min inkubiert. Die Visualisierung erfolgte mittels RPE-konjugiertem anti-rat IgG. Nach einer Inkubation von 5 s zeigte nur anti-CD146 (ME-9F1) eine detektierbare Endothelbindung, während alle untersuchten MNP-Varianten keine Bindung erkennen ließen (Abb. 28). Wurde die Expositionszeit des MNP-gebundenen Antikörpers mit dem endothelialen Antigen hingegen verlängert, ließ sich eine spezifische Endothelbindung für alle untersuchten MNP-Varianten nachweisen (Abb. 28). Das deutlichste Signal ließ sich dabei für CD146-Fc-Fragment-PEG-NH₂-MNP detektieren, die bereits nach 15-minütiger Inkubation eine deutliche und spezifische Endothelbindung erkennen ließen, wenn auch etwas geringer als nach anti-CD146 (ME-9F1)-Inkubation. CD146-NH₂-MNP zeigten ebenfalls bereits nach 15- und 30-minütiger Inkubation eine detektierbare Endothelbindung, jedoch mit deutlich schlechterem Signal als nach der Inkubation mit CD146-Fc-Fragment-PEG-NH₂-MNP. Mit CD146-PEG-NH₂-MNP wurden die schlechtesten Ergebnisse erzielt. Hier konnte eine spezifische Endothelbindung erst nach 60-minütiger Inkubation detektiert werden. Generell ist die Endothelbindung aller untersuchten MNP-Varianten substantiell schlechter als die des ungebundenen Antikörpers.

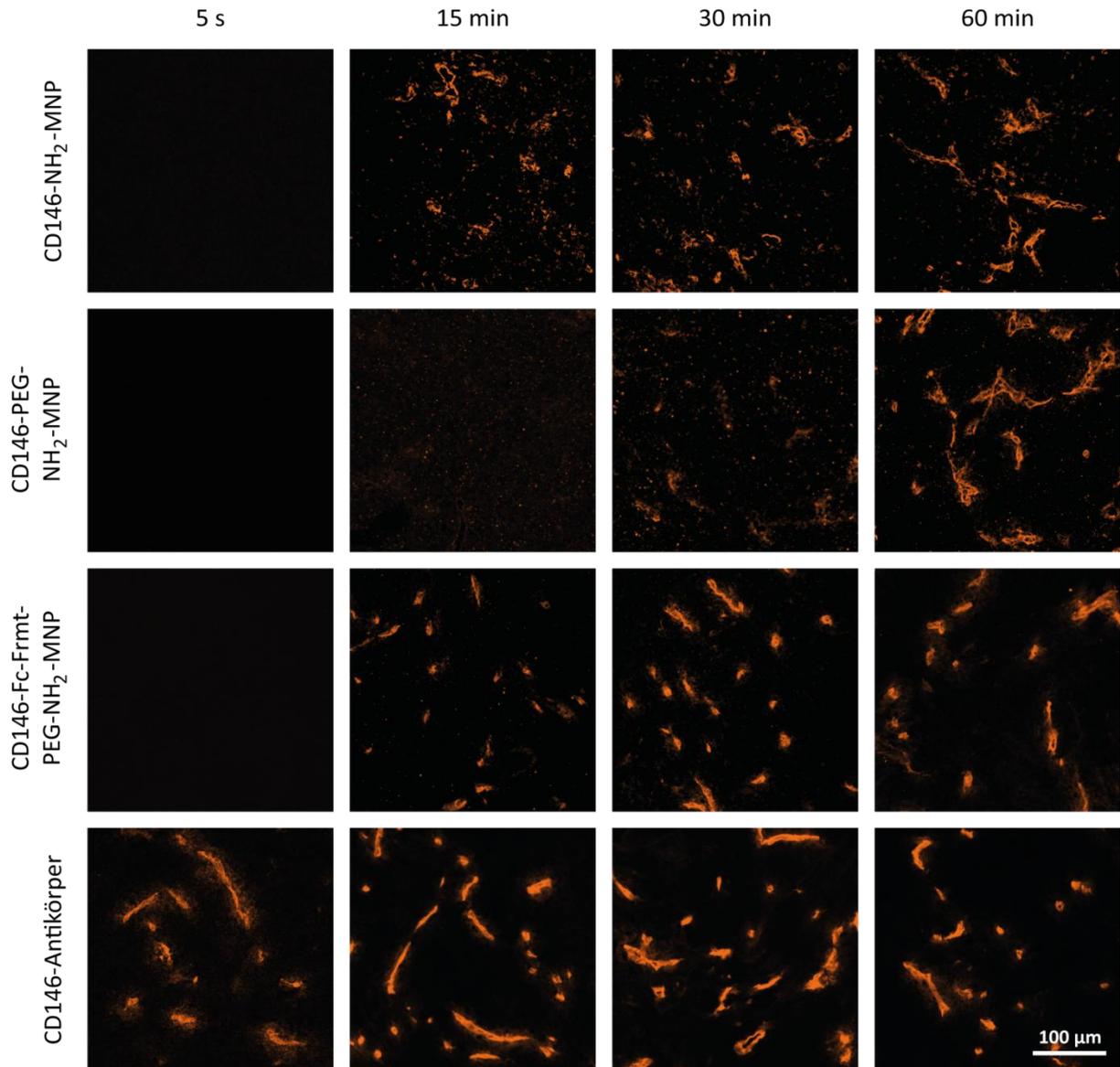


Abb. 28: Endothelbindung beschichteter MNP. Die Endothelbindung drei unterschiedlicher CD146-MNP-Varianten wurde mit der Endothelbindung von ungebundenem anti-CD146 (ME-9F1) verglichen. Dazu wurde Hep55.1C-Gewebe mit 0,5 µg/ml Antikörper inkubiert und mittels RPE-konjugiertem Sekundärantikörper (orange dargestellt) visualisiert. Die Abbildung zeigt repräsentative Aufnahmen.

3.3.3 Beeinträchtigung der Bindung beschichteter MNP durch Scherkraft des Flusses

Da bereits bekannt ist, dass Scherkräfte die Bindung beschichteter Nanopartikel beeinträchtigen können (Thomann *et al.*, 2015), sollte dies auch für die hier verwendeten MNP untersucht werden. Dazu wurde die Endothelbindung an Hep55.1C-Gewebe von CD146-NH₂-MNP, anti-CD146 (ME-9F1) sowie Isotyp-Antikörper nach 60-minütiger Inkubation ohne applizierte Scherkräfte (0 dyn/cm²) sowie bei einer Scherkraft von 0,5 bzw. 5 dyn/cm² verglichen (Abb. 29). Um die applizierten Scherkräfte während der

Inkubationszeit konstant zu halten, wurde ein Ibidi *sticky slide* (I^{0,4} Luer) auf dem histologischen Schnitt angebracht und mit einem Pumpsystem, wie in 2.2.7 beschrieben, verbunden. Die Visualisierung erfolgte mittels RPE-konjugiertem anti-rat IgG. Dabei ließ sich eine zusätzliche Beeinträchtigung der CD146-NH₂-MNP-Bindung am Endothel durch die applizierten Scherkräfte nachweisen, sowohl bei 0,5 dyn/cm² als auch bei 5 dyn/cm² (Abb. 29). Ein Unterschied zwischen 0,5 dyn/cm² und 5 dyn/cm² bezüglich der Bindungsbeeinträchtigung war anhand der histologischen Analyse nicht zu erkennen. Das Bindungsverhalten von ungebundenem anti-CD146 (ME-9F1) wurde durch die Scherkraft des Flusses hingegen nicht beeinträchtigt. Isotyp-Antikörper zeigte nach 60-minütiger Inkubation unabhängig von der vorliegenden Scherkraft keine Endothelbindung (Abb. 29).

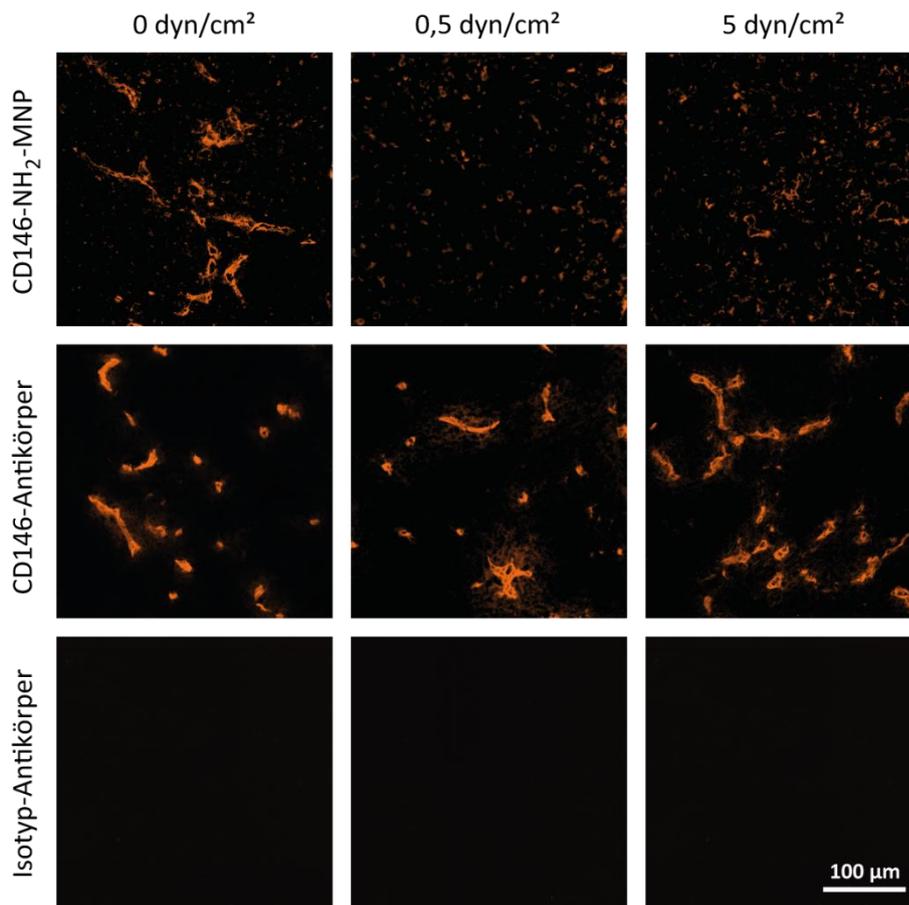


Abb. 29: Scherkraftabhängige Endothelbindung beschichteter MNP. Bindungsvermögen von MNP-gebundenem anti-CD146 (ME-9F1) sowie ungebundenen Antikörpern (0,5 µg/ml) an Hep55.1C-Gewebepräparaten nach 60-minütiger Inkubation in Abhängigkeit der applizierten Scherkraft. Die Visualisierung erfolgte über RPE-konjugierten Sekundärantikörper (orange dargestellt). Die Abbildung zeigt repräsentative Aufnahmen.

3.3.4 Charakterisierung beschichteter und unbeschichteter Liposomen

Bevor Experimente mit DOX-ILP durchgeführt wurden, wurde deren Größe und Partikelhomogenität einmalig überprüft (Tab. 8). Dabei konnte ein etwa doppelt so großer dynamischer Durchmesser von CD146-DOX-ILP im Vergleich zu DOX-Liposomen festgestellt werden. Mit einem dynamischen Durchmesser von 122,2 d.nm waren DOX-Liposomen etwas größer als vom Hersteller angegeben (80-100 nm). Der größere dynamische Durchmesser von CD146-DOX-ILP war durch die Beschichtung mit Streptavidin-konjugierten Antikörpern zu erklären. Beide Liposomenansätze hatten einen Polydispersionsindex von ca. 0,1 und wiesen daher hinsichtlich der Größenverteilung eine hohe Homogenität ohne Partikelagglomeration auf.

Tab. 8: Vergleich beschichteter und unbeschichteter Liposomen. Je eine DOX-Liposomen- und eine CD146-DOX-ILP-Probe wurden in drei Messungen à 15 Einzelmessungen mit einem Zetasizer analysiert. Pdl = Polydispersionsindex (0 = monodispers, 1 = polydispers), Z-Ave = dynamischer Durchmesser.

Partikel	Z-Ave (d.nm)	MW (d.nm)	SD (d.nm)	Pdl	Pdl MW	SD
DOX-Liposomen	124,9	122,2	2,49	0,082	0,085	0,009
	121,7			0,095		
	120,0			0,079		
CD146-DOX-ILP	213,6	212,7	1,15	0,123	0,117	0,023
	211,4			0,092		
	213,1			0,137		

3.3.5 Zytotoxizität von purem DOX und DOX-Liposomen auf Tumorzellen *in vitro*

Zur Vorbereitung von *in vivo*-Versuchen sollte der Einfluss von purem DOX (DOX-HCl) sowie liposomalem DOX (DOX-Liposomen und Caelyx) auf die Viabilität von Maus-Lebertumorzellen *in vitro* untersucht werden. Dazu wurde ein Resazurin-basierter Viabilitätsassay angewandt. Die Zytotoxizität von DOX wurde 24 und 48 h nach Applikation in zwei unterschiedlichen Zelllinien (Hep55.1C, Panc02) analysiert. Abb. 30 zeigt die prozentuale Zellviabilität in Abhängigkeit der verwendeten DOX-Konzentration, wobei die Zellviabilität bei Verwendung DOX-freien Mediums (0 µM) als 100% definiert wurde. Generell war die detektierte Zellviabilität bei allen Konzentrationen in beiden Zelllinien nach 48 h-Inkubation (Abb. 30B, D) geringer als nach 24 h (Abb. 30A, C). Desweiteren waren Hep55.1C-Zellen (Abb. 30C-D) sensibler gegenüber sowohl DOX-HCl als auch liposomalem

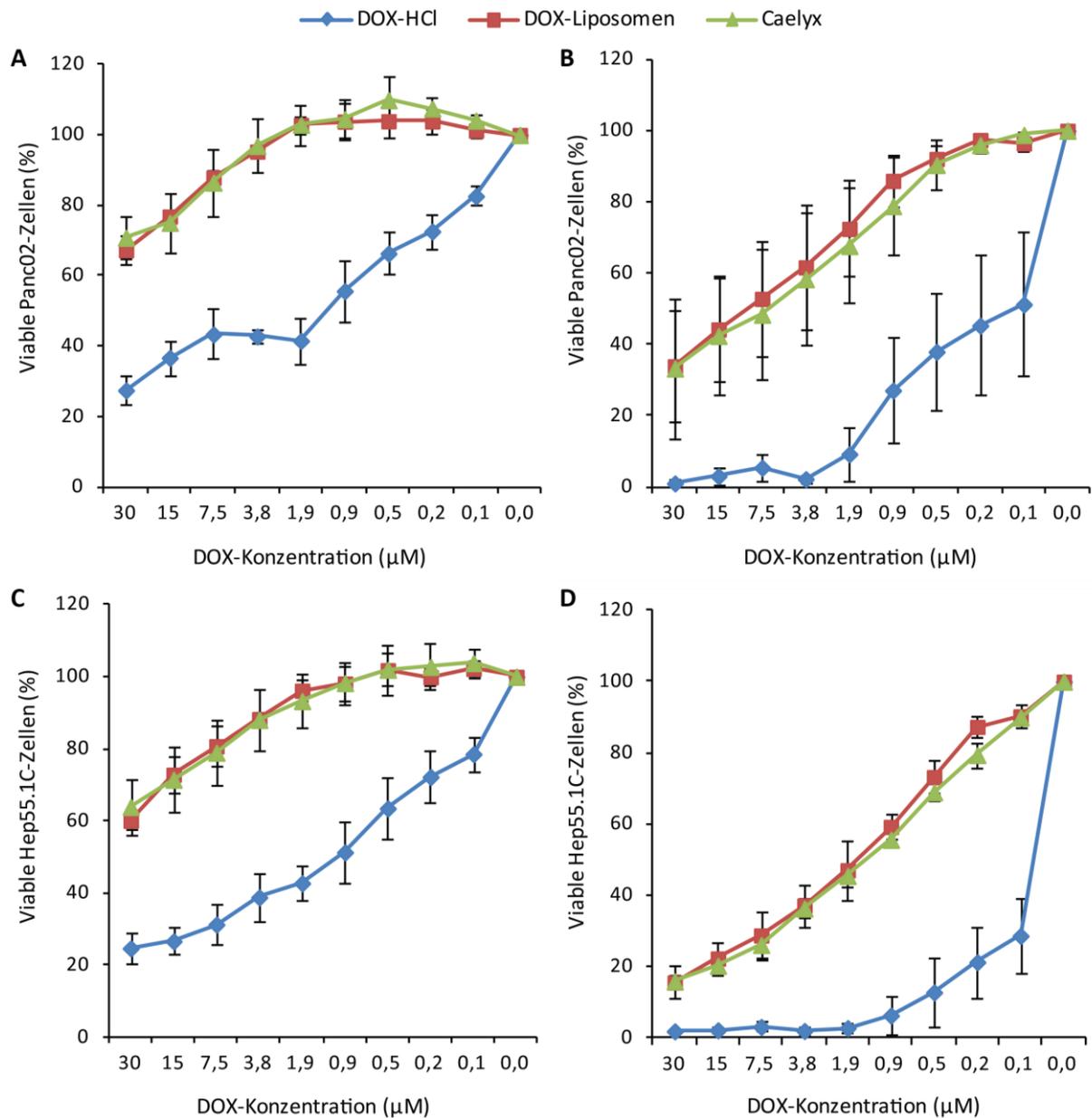


Abb. 30: Zytotoxizität von purem und liposomalem DOX auf Tumorzellen *in vitro*. Mithilfe des Viabilitätsassays wurde die prozentuale Zellviabilität muriner Panc02- (A-B) und Hep55.1C-Tumorzellen (C-D) nach 24 h (A, C) und 48 h (B, D) Inkubation mit DOX-HCl, DOX-Liposomen und Caelyx in Abhängigkeit der DOX-Konzentration untersucht. Die Zellviabilität bei 0 µM DOX wurde als 100% definiert. Darstellung als Mittelwerte \pm SD; n = 3.

DOX als Panc02-Zellen (Abb. 30A-B). In beiden Zelllinien und zu beiden Zeitpunkten erzielte DOX-HCl die stärkste Reduktion der Zellviabilität. Nach 48 h-Inkubation konnten nur noch <5% viable Zellen bei 3,8 µM (Panc02) bzw. 1,9 µM (Hep55.1C) detektiert werden. DOX-Liposomen und Caelyx zeigten hingegen jeweils in beiden Zelllinien und unabhängig von der Inkubationsdauer nahezu identischen Einfluss auf die Viabilität der behandelten Zellen. Selbst nach 48 h-Inkubation mit 30 µM DOX konnte liposomales DOX die Zellviabilität nur auf

33% (Panc02) bzw. 16% (Hep55.1C) reduzieren. Dennoch kann man v.a. für Hep55.1C-Zellen von einer deutlichen Reduktion der Zellviabilität durch liposomales DOX nach einer Inkubation von 48 h sprechen (Abb. 30D). Außerdem scheinen die für diese Arbeit verwendeten DOX-Liposomen in ihrer Wirkungsweise mit klinisch zugelassenem liposomalem DOX (Caelyx) vergleichbar zu sein. Der beobachtete Effekt könnte durch höhere DOX-Konzentrationen sowie spezifisch beschichtete DOX-ILP erhöht werden.

3.3.6 Hohe Effizienz der Anreicherung von CD49e-DOX-ILP im Zellsuspensionsmodell (primäre Bindung)

In den histologischen Analysen zur Dynamik der Antikörperbindung an Endothelzellen wurde gezeigt, dass der hier verwendete anti-CD49e (5H10-27) sowohl an Endothel- als auch an Hep55.1C-Tumorzellen bindet (siehe Abb. 10). Da keine ausreichende Menge CD49e-exprimierender Mausendothelzellen zur Verfügung stand, wurden für die Anreicherungs-experimente Hep55.1C-Tumorzellen verwendet. Abb. 31A zeigt, dass die prozentuale Bindung von anti-CD49e (5H10-27) in ungebundener oder gebundener Form (DOX-ILP) bei der Inkubation mit $0,5 \times 10^6$ Zellen deutlich geringer war, als bei der Inkubation mit 10×10^6 Zellen. Liposomal gebundener Isotyp-Antikörper zeigte bei der Inkubation mit $0,5 \times 10^6$ Zellen eine vergleichbar hohe prozentuale Bindung. Bei der Inkubation mit 10×10^6 Zellen hingegen wies er eine signifikant niedrigere prozentuale Bindung im Vergleich zu CD49e-DOX-ILP ($p < 0,05$) und CD49e-RPE ($p < 0,01$) auf. Desweiteren ließ sich zeigen, dass die Antikörperbindung pro Zelle vergleichbar hoch war, unabhängig davon, ob anti-CD49e (5H10-27) ungebunden oder in gebundener Form (DOX-ILP) vorlag (Abb. 31B). Isotyp-DOX-ILP wurden hingegen in deutlich geringerem Maße von Hep55.1C-Zellen gebunden als CD49e-DOX-ILP (signifikant bei der Inkubation mit 10×10^6 Zellen). Dies machte sich v.a. auch in der Menge gebundenen DOX pro Zelle bemerkbar, welche nach der Inkubation mit CD49e-DOX-ILP signifikant höher war als nach Isotyp-DOX-ILP-Inkubation (Abb. 31C). Auch die histologische Analyse der Hep55.1C-Bindung durch die verwendeten Antikörper-/ILP-Lösungen zeigte ein spezifisches Signal auf der Zelloberfläche nach der Inkubation mit CD49e-RPE und CD49e-DOX-ILP. Nach der Inkubation mit Isotyp-DOX-ILP war das detektierte Signal dagegen wesentlich schwächer und unspezifischer, nicht mit der Zelloberfläche assoziiert (Abb. 31D). Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen eine eindeutig höhere Anreicherung von liposomal gebundenem sowie ungebundenem

anti-CD49e (5H10-27) durch die Tumorzellsuspension im Vergleich zu liposomal gebundenem Isotyp-Antikörper, was die Hypothese der primären, spezifischen Hep55.1C-Bindung durch anti-CD49e (5H10-27) untermauert.

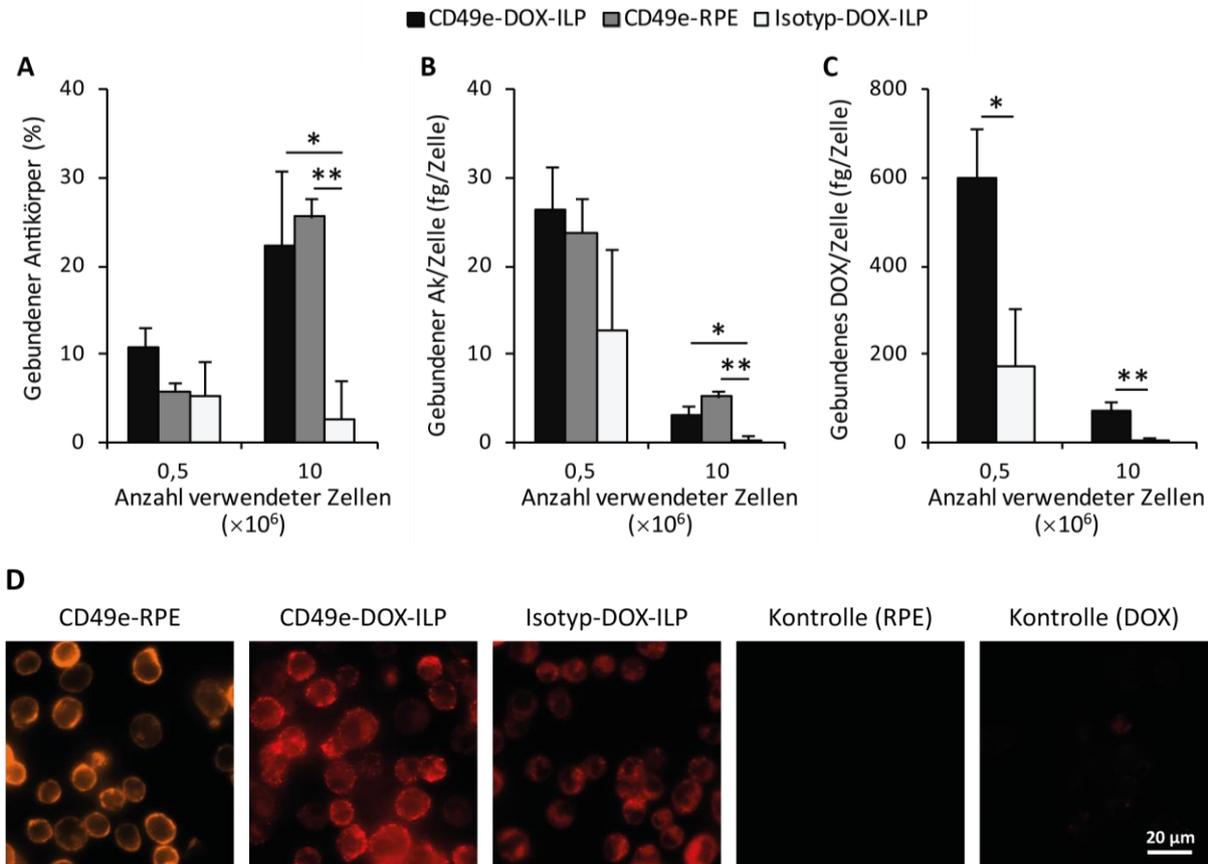


Abb. 31: Antikörper-/DOX-ILP-Bindung an Hep55.1C-Zellen *in vitro*. Unbeschichtete Hep55.1C-Zellen wurden mit 200 ng Antikörper/ml (liposomal gebunden oder ungebunden) 5 min bei 37 °C inkubiert und die prozentuale Antikörperbindung (A), die Menge gebundenen Antikörpers pro Zelle (B) sowie für DOX-ILP die gebundene DOX-Menge pro Zelle (C) in Abhängigkeit der verwendeten Zellzahl ermittelt. (D) zeigt die Bindung von RPE-konjugiertem anti-CD49e (5H10-27) sowie CD49e- und Isotyp-DOX-ILP an unbeschichteten Hep55.1C-Zellen mittels RPE- (orange dargestellt) bzw. DOX-Visualisierung (rot dargestellt). Die Abbildung zeigt repräsentative Aufnahmen. Ak = Antikörper; Darstellung als Mittelwerte \pm SD; n = 3; *p<0,05; **p<0,01.

3.3.7 Bindung von DOX-ILP an CD49e-beschichteten Tumorzellen (sekundäre Bindung)

Um den, wie in 2.2.6.3 (siehe Abb. 8) beschriebenen, sekundären Mechanismus der ILP-Anreicherung *in vitro* zu untersuchen, wurden Sekundärantikörper-DOX-ILP mit anti-CD49e (5H10-27)-beschichteten Hep55.1C-Zellen (CD49e-Hep55.1C) inkubiert. Dazu wurden drei unterschiedliche Klone eines anti-rat IgG2a-Antikörpers untersucht (Rg7/1.30, 2A8F4, MRG2a-83) und mit der Bindung von rat IgG2a-Isotyp-Antikörper verglichen. Die

Analysen wurden sowohl für RPE-konjugierte Antikörper als auch für die entsprechend beschichteten DOX-ILP durchgeführt. Abb. 32 zeigt die Ergebnisse der qualitativen Analyse. Die Inkubation mit MRG2a-83- und 2A8F4-Antikörper zeigte eine sehr gute, Oberflächenassoziierte Bindung an CD49e-Hep55.1C. Nach der Inkubation mit Isotyp- und Rg7/1.30-Antikörper hingegen war keine (vergleichbar mit Kontrolle) bzw. nur eine sehr schwache Zellbindung detektierbar. Bei 470 nm (Visualisierung von DOX) wiesen die CD49e-Hep55.1C eine schwache Hintergrundfluoreszenz auf. Die Inkubation mit Isotyp-DOX-ILP erzeugte ein leicht stärkeres, mit Rg7/1.30-DOX-ILP ein noch stärkeres Signal. Die Zellbindung schien aber unspezifisch, da nicht Oberflächenassoziiert. Für die Sekundärantikörperklone 2A8F4 und MRG2a-83 konnte hingegen eine Zellbindung, vergleichbar mit der Zellbindung von anti-CD49e (5H10-27)-RPE bzw. CD49e-DOX-ILP an unbeschichteten Hep55.1C, detektiert werden. Die detektierten MFI waren für MRG2a-83-DOX-ILP höher als für 2A8F4-DOX-ILP, weshalb für anschließende Experimente nur mit MRG2a-83 gearbeitet wurde.

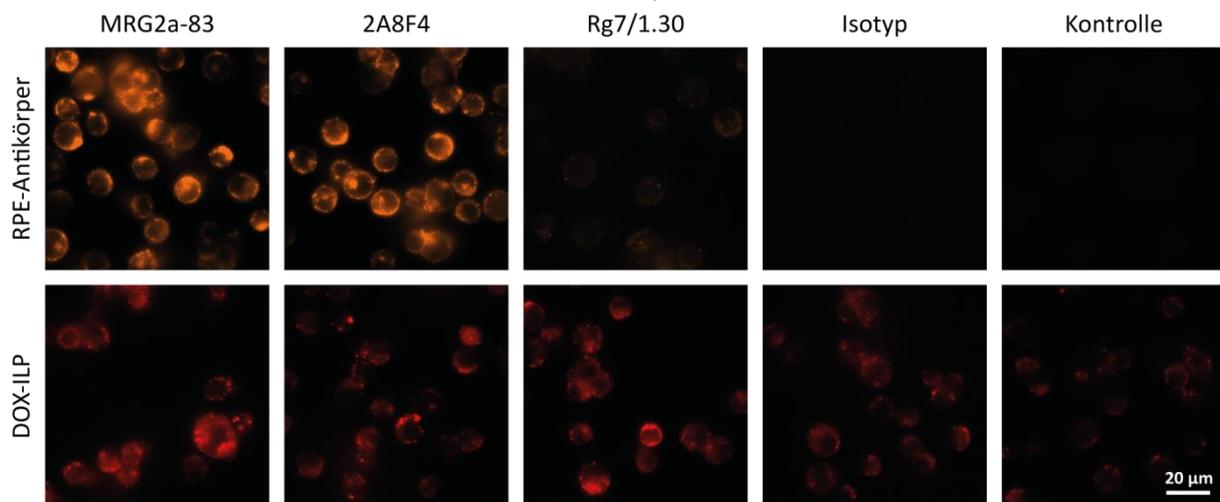


Abb. 32: Sekundärantikörper-/DOX-ILP-Bindung an CD49e-Hep55.1C-Zellen *in vitro*. $0,5 \times 10^6$ mit anti-CD49e (5H10-27)-beschichtete Hep55.1C-Zellen wurden mit 200 ng Antikörper/ml (liposomal gebunden oder ungebunden) 30 min bei 37 °C inkubiert. Dargestellt ist die Bindung drei unterschiedlicher Sekundär- sowie Isotyp-Antikörper (RPE-konjugiert oder DOX-ILP-assoziiert) an CD49e-Hep55.1C mittels RPE- (orange dargestellt) bzw. DOX-Visualisierung (rot dargestellt). Die Abbildung zeigt repräsentative Aufnahmen.

3.3.8 Zytotoxizität von DOX-ILP auf Tumorzellen *in vitro* (primäre und sekundäre Bindung)

Im Folgenden sollte der Einfluss von MRG2a-83-DOX-ILP und DOX-HCl auf die Viabilität von CD49e-Hep55.1 (sekundäre Bindung) sowie von CD49e- und Isotyp-DOX-ILP auf unbeschichtete Hep55.1C (primäre Bindung) *in vitro* untersucht werden. Dazu wurde ein Resazurin-basierter Viabilitätsassay für 30 min angewandt. Die Messung der Zellviabilität erfolgte für MRG2a-83-DOX-ILP und DOX-HCl 24, 48, 72 oder 96 h nach Behandlung mit DOX bzw. für CD49e- und Isotyp-DOX-ILP nach 48 oder 96 h. Abb. 33 und Abb. 34 zeigen die prozentuale Zellviabilität in Abhängigkeit der verwendeten DOX-Konzentration, wobei die Zellviabilität bei Verwendung DOX-freien Mediums (0 μ M) als 100% definiert wurde.

Der Unterschied zu den in 3.3.5 beschriebenen Zellviabilitätsversuchen lag in der deutlich kürzeren Inkubationszeit mit DOX (24/48 h bzw. 30 min). Je später der Zeitpunkt der Zellviabilitätsmessung war, desto geringer war die detektierte Zellviabilität (Abb. 33). Insbesondere der Messzeitpunkt nach 24 h erwies sich als zu früh, während die Messunterschiede nach 48, 72 und 96 h geringer waren. Dies galt sowohl für MRG2a-83-DOX-ILP (Abb. 33A) als auch für DOX-HCl (Abb. 33B). Zu allen Zeitpunkten erzielte DOX-HCl die stärkste Reduktion der Viabilität von CD49e-Hep55.1. Bei 59 μ M DOX-HCl konnten nach 24 h noch 20%, nach 48-96 h <1% viable Zellen detektiert werden. Bei 30 μ M waren nach 48 h noch ca. 5% der Zellen viabel, was sogar vergleichbar mit den Ergebnissen der 48 h-Inkubation (siehe Abb. 30D) ist. Die Reduktion der Zellviabilität durch sekundäre Bindung von DOX-ILP war hingegen wesentlich geringer, sodass selbst bei 59 μ M DOX noch 37-10% (Messung nach 48-96 h) viable Zellen detektierbar waren (Abb. 33A). Der Messzeitpunkt von 24 h erwies sich generell als zu kurz, um eine reduzierte Zellviabilität nachzuweisen.

Zusätzlich sollte die Reduktion der Zellviabilität durch liposomales DOX in Abhängigkeit des verwendeten Mechanismus untersucht werden. Dazu wurden die 48 und 96 h-Werte aus Abb. 33 (sekundärer Mechanismus) mit der Reduktion der Viabilität von Hep55.1C-Zellen durch CD49e- und Isotyp-DOX-ILP nach 30-minütiger Inkubation und Messung nach 48 h (Abb. 34A) bzw. 96 h (Abb. 34B) verglichen (primärer Mechanismus). DOX-HCl zeigte auch im Vergleich zu CD49e- und Isotyp-DOX-ILP eine wesentlich effizientere Reduktion der Zellviabilität. Überraschenderweise bewirkten Isotyp-DOX-ILP jedoch eine zu MRG2a-83- und CD49e-DOX-ILP vergleichbare Reduktion der Zellviabilität. Die Werte für CD49e-DOX-ILP lagen generell unter denen für Isotyp-DOX-ILP, waren jedoch statistisch nicht signifikant.

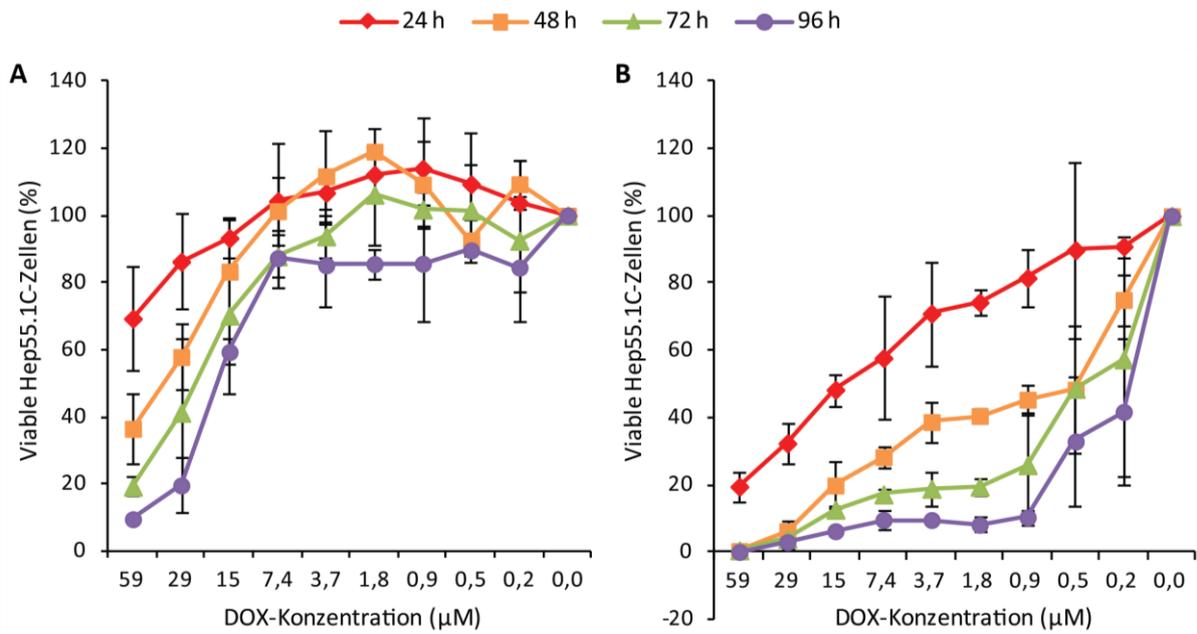


Abb. 33: Zytotoxizität von Sekundärantikörper-DOX-ILP und purem DOX-HCl auf Tumorzellen *in vitro* (sekundärer Mechanismus). Mithilfe des Viabilitätsassays wurde die prozentuale Zellviabilität muriner, mit anti-CD49e (5H10-27)-beschichteter Hep55.1C-Tumorzellen nach 30 min Inkubation mit MRG2a-83-DOX-ILP (A) und DOX-HCl (B) in Abhängigkeit der DOX-Konzentration untersucht. Die Zellviabilität bei 0 μM DOX wurde als 100% definiert. Darstellung als Mittelwerte ± SD; n = 3 für 24 und 48 h; n = 2 für 72 und 96 h.

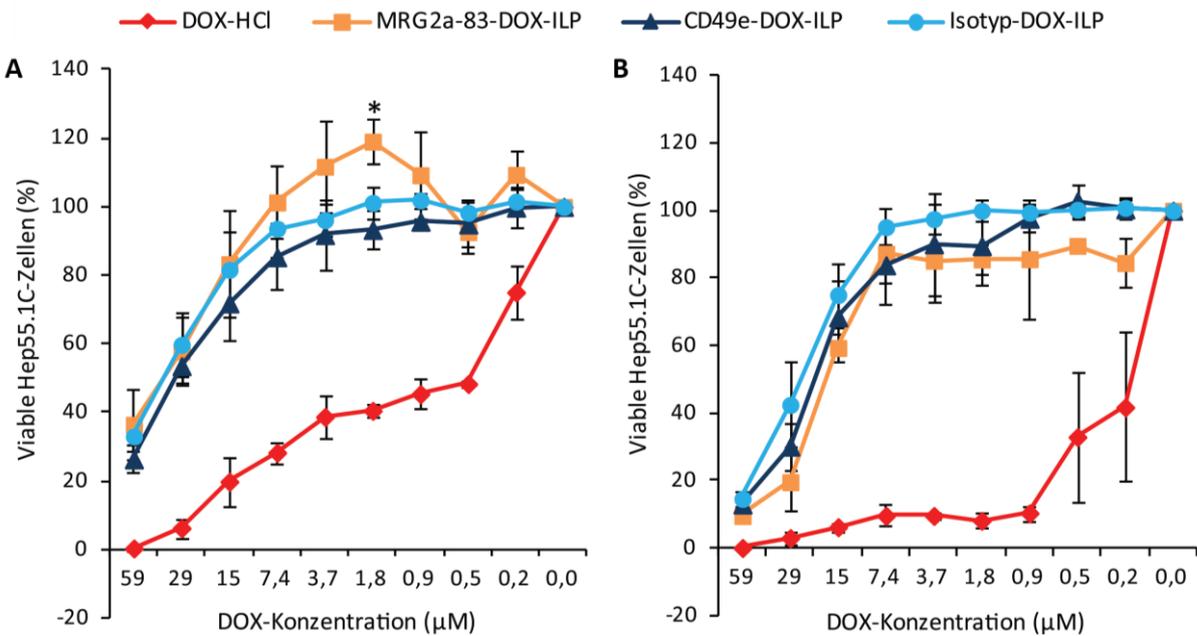


Abb. 34: Zytotoxizität von DOX-ILP und purem DOX-HCl auf Tumorzellen *in vitro* (primärer und sekundärer Mechanismus). Mithilfe des Viabilitätsassays wurde die prozentuale Zellviabilität muriner, mit anti-CD49e (5H10-27)-beschichteter bzw. unbeschichteter Hep55.1C-Tumorzellen nach 30 min Inkubation mit unterschiedlichen Substanzen in Abhängigkeit der DOX-Konzentration nach 48 h (A) bzw. 96 h (B) untersucht. Die Zellviabilität bei 0 μM DOX wurde als 100% definiert. Darstellung als Mittelwerte ± SD; n = 3 für 48 h-Werte; 96 h-Werte: n = 2 für DOX-HCl, MRG2a-83-DOX-ILP; n = 3 für CD49e-, Isotyp-DOX-ILP; *p<0,05.

MRG2a-83-DOX-ILP bewirkten nach 48 h eine teilweise statistisch signifikante Erhöhung der Zellviabilität im Vergleich zu Isotyp-DOX-ILP (Abb. 34A). Um eine Reduktion der Zellviabilität um ca. 50% zu erreichen, waren mindestens 29 μM DOX-ILP notwendig (48 h). Die Ergebnisse für die Zellviabilitätsmessung nach 96 h unterschieden sich nicht wesentlich von der Messung nach 48 h, waren aber generell niedriger (Abb. 34B).

3.3.9 Effizienz der endothelialen Anreicherung beschichteter Nanopartikel

3.3.9.1 Beschichtete MNP

Im Folgenden sollte mithilfe des Modells der isolierten Leberperfusion die Retention unterschiedlich beschichteter MNP während der ersten intravaskulären Passage quantitativ analysiert werden. Da in den Perfusionskammerexperimenten bereits gezeigt wurde, dass Scherkräfte das Bindungsvermögen beschichteter MNP massiv beeinträchtigt, wurde für die Perfusionen *ex vivo* eine Perfusionsgeschwindigkeit von 0,2 ml/min gewählt. Aufgrund der unterschiedlichen Beschichtungseffizienz zwischen den MNP-Varianten (siehe Abb. 26A) wurden beschichtete NH_2 -MNP verwendet. Die applizierte MNP-Menge wurde auf die Konzentration des zur Beschichtung verwendeten Antikörpers adjustiert, sodass 50 ng Antikörper appliziert wurden. Abb. 35 zeigt jedoch, dass die MNP unabhängig von der Endothelspezifität des zur Beschichtung verwendeten Antikörpers in nur sehr geringem Maße in der perfundierten Leber angereichert wurden. Teilweise wurden rechnerisch auch

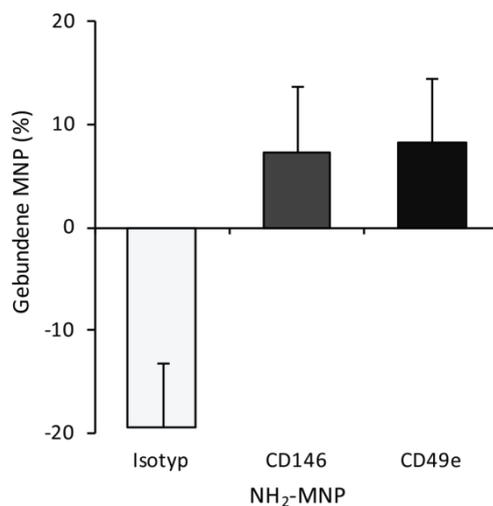


Abb. 35: Effizienz der endothelialen Anreicherung beschichteter MNP. Prozentuale endotheliale Anreicherungsrate für unterschiedlich beschichtete NH_2 -MNP nach Applikation von 50 ng Antikörper und Perfusion der isolierten Mauseleber mit 0,2 ml/min. Darstellung als Mittelwerte \pm SD; n = 3 für CD146; n = 2 für Isotyp und CD49e.

negative Werte erzielt. Die Effizienz der endothelialen Anreicherung endothelspezifischer MNP lag unter der der jeweiligen monoklonalen Antikörper (siehe Abb. 19). Aufgrund der sehr schlechten endothelialen Anreicherungseffizienz von beschichteten MNP wurde die Analyse mit dieser Nanopartikelart nicht fortgesetzt.

3.3.9.2 ILP

Die Retention unterschiedlich beschichteter ILP während der ersten intravaskulären Passage wurde ebenfalls mithilfe des Modells der isolierten Leberperfusion quantitativ analysiert. Dazu wurde isolierte Mausleber mit fbAb- sowie Isotyp-DOX-ILP bei 0,5 und 1 ml/min perfundiert. Die endotheliale Anreicherungsrate war dabei für alle DOX-ILP nach Perfusion mit 1 ml/min tendenziell geringer als mit 0,5 ml/min (siehe Abb. 36A). Desweiteren lag die Effizienz der endothelialen Anreicherung endothelspezifischer DOX-ILP generell unter der der jeweiligen monoklonalen Antikörper (siehe Abb. 19). Quantitativ war die prozentuale endotheliale Anreicherung von CD31- und CD146-DOX-ILP mit der von Isotyp-DOX-ILP vergleichbar (Abb. 36A). Die Analyse der Einzelwerte zeigte jedoch, dass hierfür vor allem deren große Streuung verantwortlich ist (Abb. 36B). CD49e-DOX-ILP erzielte die besten Ergebnisse. Bei Perfusion mit 1 ml/min war die Effizienz der endothelialen Anreicherung mit $10\% \pm 7$ ebenfalls vergleichsweise gering, was aber v.a. durch die große Streuung der Einzelwerte zustande kam (Abb. 36B). Reduzierte man die Perfusionsgeschwindigkeit um nur die Hälfte auf 0,5 ml/min konnte hingegen eine reproduzierbare und signifikant ($p < 0,01$) höhere endotheliale Anreicherungsrate von $26,2\% \pm 2,6$ für CD49e-DOX-ILP erreicht werden (Abb. 36). Isotyp-DOX-ILP hingegen wurden nur unspezifisch von der Leber aufgenommen, was sich auch in dem stark signifikanten ($p < 0,01$) Unterschied zur endothelialen Anreicherung von CD49e-DOX-ILP bei 0,5 ml/min widerspiegelte.

Zusätzlich zur beschriebenen quantitativen Auswertung der *ex vivo*-Perfusion mit DOX-ILP wurden alle perfundierten Leberpräparate einer PEG-Immunfluoreszenzfärbung unterzogen (siehe Abb. 37). Damit sollten in der Leber angereicherte DOX-ILP visualisiert werden und galt v.a. der Überprüfung, rechnerisch negativer Einzelwerte der Anreicherungseffizienz (siehe Abb. 36B). Interessanterweise konnte in allen Präparaten aller drei endothelspezifischen DOX-ILP eine endothelspezifische Bindung detektiert werden, auch in Präparaten, die mit einer rechnerisch negativen Anreicherungsrate assoziiert waren (Tab. 9). Die Signalstärke variierte hingegen zwischen den drei endothelspezifischen DOX-ILP und war

für CD31-DOX-ILP am geringsten, für CD49e-DOX-ILP am höchsten. Dagegen zeigte keines, der mit Isotyp-DOX-ILP perfundierten Leberpräparate eine endothelspezifische Anreicherung, aber alle Konglomerate. Konglomerate konnten generell in den meisten der perfundierten Leberpräparate detektiert werden (Tab. 9).

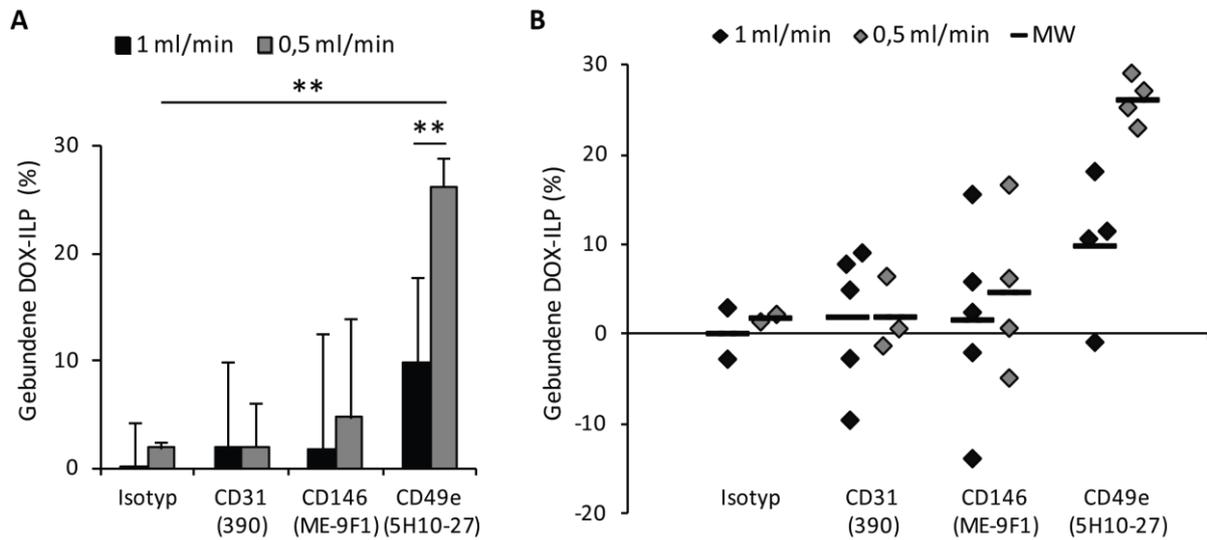


Abb. 36: Endotheliale Anreicherung von DOX-ILP. Prozentuale endotheliale Anreicherungsrate für unterschiedliche DOX-ILP nach Applikation von 200 ng Antikörper und Perfusion der isolierten Mausleber mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. (A) Darstellung als Mittelwerte \pm SD. (B) Darstellung der Einzelwerte. MW = Mittelwert; n = 2-5; **p<0,01.

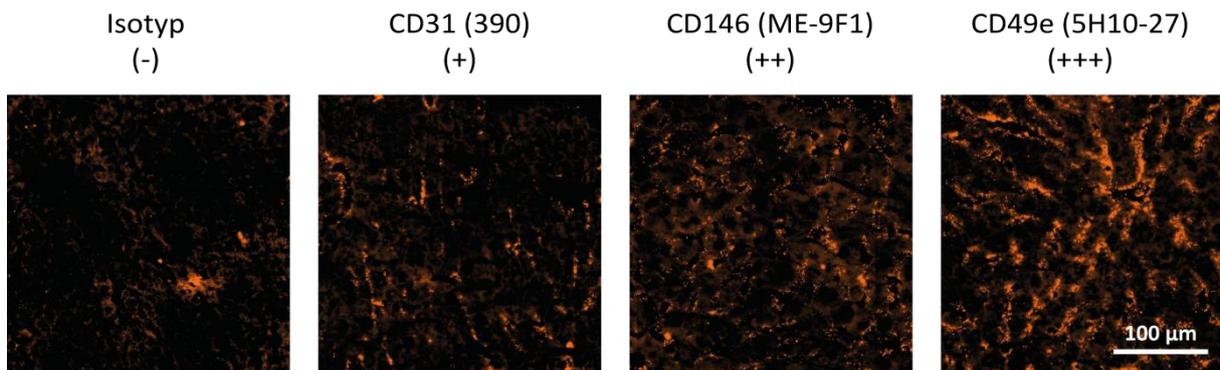


Abb. 37: Visualisierung der DOX-ILP-Endothelbindung. Darstellung der DOX-ILP-Endothelbindung (200 ng Antikörper) nach Perfusion der isolierten Mausleber bei 0,5 ml/min mittels PEG-Färbung über RPE-konjugierten Sekundärantikörper (orange dargestellt). Die Abbildung zeigt repräsentative Aufnahmen (ohne Konglomerat-Darstellung bei endothelspezifischen DOX-ILP); (- bis +++) = Signalstärke des endothelspezifischen PEG-Signals.

Tab. 9: Histologische Überprüfung der endothelspezifischen DOX-ILP-Anreicherung nach Perfusion *ex vivo*.
Für die vier unterschiedlichen DOX-ILP ist die Anzahl der perfundierten Leberpräparate mit bzw. ohne einem endothelspezifischen PEG-Signal, die Signalstärke sowie die Anzahl Konglomerat-haltiger Präparate dargestellt.

DOX-ILP (Anzahl insgesamt)	Endothelspezifisches PEG-Signal		Signalstärke	Konglomerate	
	Ja	Nein	(- bis +++)	Ja	Nein
Isotyp (4)	0	4	- (4)	4	0
CD31 (8)	8	0	+ (8)	7	1
CD146 (9)	9	0	++ (4); + (5)	7	2
CD49e (8)	8	0	+++ (4); ++ (4)	7	1

3.3.10 Lokoregionale Applikation von ILP zeigt erhöhte Anreicherung *ex vivo* und *in vivo* (primärer Mechanismus)

Als nächstes sollte die Anreicherung beschichteter Nanopartikel am Endothel *ex vivo* sowie *in vivo* in Abhängigkeit der Applikationsart untersucht werden. Dazu wurde mit unterschiedlich beschichteten DOX-ILP gearbeitet.

3.3.10.1 Applikation *ex vivo*

Zur Analyse der endothelialen DOX-ILP-Anreicherung sowie %ID/g nach Perfusion der gesamten, isolierten Mausleber wurden die Daten für Isotyp-, CD146- und CD49e-DOX-ILP aus Abb. 36 für 0,5 ml/min verwendet. Umgerechnet auf die Masse des perfundierten Gewebes ergab dies eine Perfusionsgeschwindigkeit von $0,35 \pm 0,04$ ml/min/g. Da, wie in 3.2.6 beschrieben, ein negativer Zusammenhang zwischen lokaler Antikörperanreicherung und der Masse des perfundierten Gewebes besteht, wurde anschließend untersucht, ob dies auch für DOX-ILP zutreffend ist. Dazu wurden nur zwei kleine Lebersegmente (RMS/RPS: $0,47 \pm 0,07$ g) mit endothelspezifischen und Isotyp-DOX-ILP bei $0,44 \pm 0,07$ ml/min/g (0,2 ml/min) perfundiert. Die prozentuale endotheliale Anreicherung von DOX-ILP war ebenfalls unabhängig von der perfundierten Gewebemasse. Der beobachtete signifikante Unterschied für CD49e-DOX-ILP (Abb. 38A) lässt sich durch die höhere Perfusionsgeschwindigkeit bei Segmentperfusion erklären. Die Analyse derselben Daten hinsichtlich %ID/g bestätigte den negativen Zusammenhang zwischen lokaler DOX-ILP-Anreicherung und der Masse des perfundierten Gewebes (Abb. 38B). Für CD49e-DOX-ILP war dieser signifikant.

Da es geringfügige Unterschiede in der Beschichtungseffizienz der unterschiedlich beschichteten DOX-ILP gab, aber eine vergleichbare Antikörpermenge (200 ng) appliziert wurde, ergaben sich Abweichungen bei der injizierten Lipid- und daher PEG-Ketten-Menge. Die Visualisierung der gebundenen DOX-ILP mittels PEG-Immunfluoreszenzfärbung galt daher ausschließlich der Bewertung der Homogenität und Endothelspezifität der DOX-ILP-Bindung. Bei Perfusion der gesamten Leber zeigte sich ein deutlich bzw. geringfügig höheres Fluoreszenzsignal nach Perfusion mit CD146- bzw. CD49e-DOX-ILP als mit Isotyp-DOX-ILP.

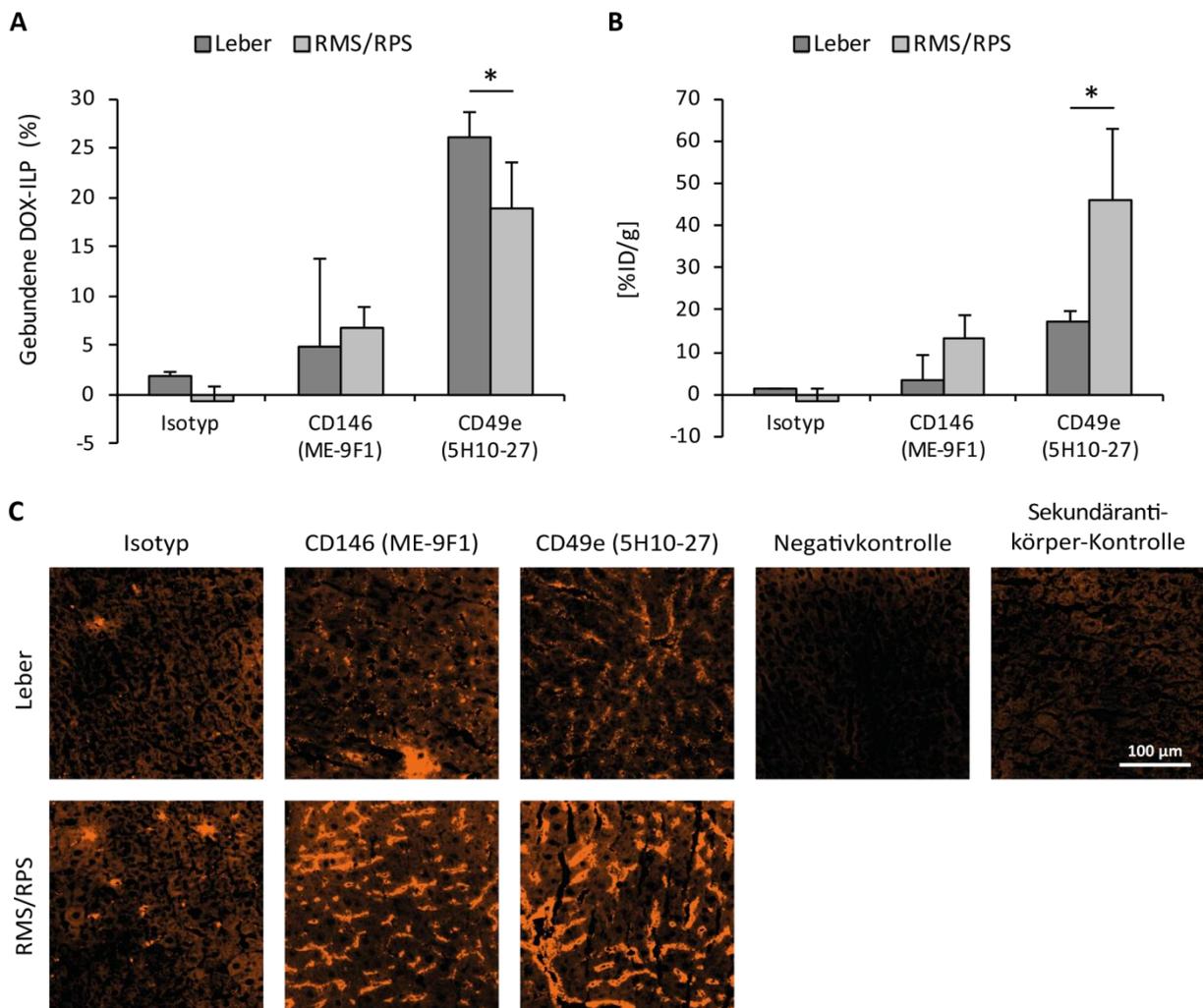


Abb. 38: Erhöhte ILP-Anreicherung nach lokoregionaler Applikation *ex vivo*. Isoliertes Mausebergewebe wurde mit unterschiedlichen DOX-ILP-Varianten (200 ng Antikörper) perfundiert. Perfusion der gesamten Mausleber bei $0,35 \pm 0,04$ ml/min/g, RMS/RPS-Perfusion bei $0,44 \pm 0,07$ ml/min/g. (A) Prozentuale endotheliale Anreicherung und (B) %ID/g von DOX-ILP in Abhängigkeit der perfundierten Gewebemasse und der DOX-ILP-Variante. (C) Die Visualisierung der Endothelbindung erfolgte mittels PEG-Färbung über RPE-konjugierten Sekundärantikörper (orange dargestellt). Die Abbildung zeigt repräsentative Aufnahmen. Darstellung als Mittelwerte \pm SD; n = 2 für Isotyp (Leber); n = 3 für Isotyp (RMS/RPS) und CD146 (RMS/RPS); n = 4 für CD146 (Leber) und CD49e (Leber, RMS/RPS); *p<0,05.

CD146- und CD49e-DOX-ILP zeigten v.a. eine endothelspezifische Anreicherung. Für alle DOX-ILP-Varianten wurde eine Konglomerat-ähnliche Akkumulation festgestellt. Generell schien die Anreicherung der DOX-ILP nach Perfusion der gesamten Leber aber inhomogen (Abb. 38C). Nach RMS/RPS-Perfusion konnte eine zum überwiegenden Anteil spezifische und sehr homogene Endothelanreicherung der CD146- und CD49e-DOX-ILP festgestellt werden (Abb. 38C). Dabei war das nach Perfusion mit CD49e-DOX-ILP detektierte Signal wesentlich stärker, als mit CD146-DOX-ILP. Isotyp-DOX-ILP hingegen wurden nur in geringem Maße Konglomerat-ähnlich im perfundierten Lebergewebe angereichert. Beide mitgeführten Kontrollen zeigten kein detektierbares Fluoreszenzsignal, wodurch eine spezifische Visualisierung der ILP-eigenen PEG-Ketten sichergestellt war (Abb. 38C).

3.3.10.2 Applikation *in vivo*

Um den Vorteil der lokoregionalen Applikation von ILP auch im Tumormodell untersuchen zu können, wurden CD146-DOX-ILP in tumortragenden (in LPS oder LAS, Hep55.1C) Mäusen i.a. oder i.v. appliziert. Zur Kontrolle wurden Isotyp-DOX-ILP ebenfalls i.a. appliziert und die ILP-Bindung anschließend mittels PEG-Färbung detektiert (Abb. 39). Interessanterweise zeigte sich nach i.a.-Isotyp-DOX-ILP-Applikation nur, die *ex vivo* ebenfalls detektierte, Konglomerat-ähnliche Anreicherung der ILP in der Leber. Im Tumor hingegen konnte keine Isotyp-DOX-ILP-Anreicherung detektiert werden. CD146-DOX-ILP zeigten bei beiden Applikationsarten endothelspezifische und vereinzelt Konglomerat-ähnliche Anreicherung in der Leber. Nach i.v.-Applikation von CD146-DOX-ILP konnte im Tumor nur an vereinzelt, vor allem im Randbereich liegenden Gefäßen eine Bindung detektiert werden. Die homogenste Endothelanreicherung im Tumor wurde hingegen nach i.a.-Applikation von CD146-DOX-ILP erzielt (Abb. 39). Damit konnte hinsichtlich der tumorspezifischen ILP-Anreicherung ein klarer Vorteil lokoregionaler Applikation endothelspezifischer DOX-ILP gegenüber systemischer Applikation gezeigt werden. Die histologische Analyse des Milzgewebes zeigte bei allen Applikationsarten eine unspezifische ILP-Anreicherung. Die Sekundärantikörper-Kontrolle war für alle drei Gewebetypen negativ.

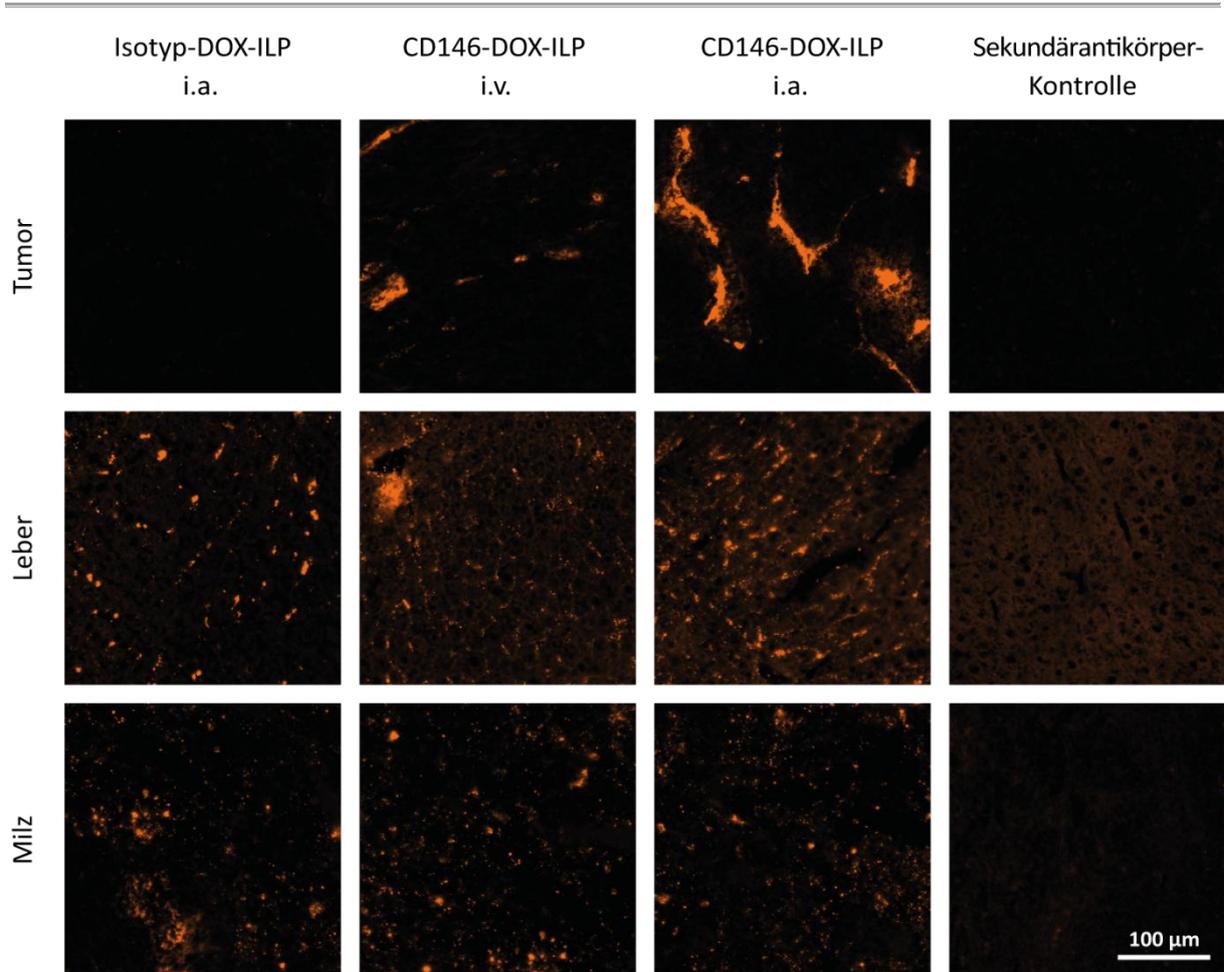


Abb. 39: Erhöhte ILP-Anreicherung im Tumor nach lokoregionaler Applikation *in vivo*. Endothelbindung von Isotyp- und anti-CD146 (ME-9F1)-DOX-ILP in Abhängigkeit der Applikationsart nach Applikation von 136 ng DOX/g \approx 8 ng Antikörper/g Körpergewicht *in vivo* in tumortragenden Mäusen (LPS oder LAS, Hep55.1C). Die Visualisierung der Endothelbindung erfolgte über RPE-konjugierten Sekundärantikörper (orange dargestellt). Für die Sekundärantikörper-Kontrolle wurde entsprechendes Gewebe nach CD146-DOX-ILP-i.a.-Applikation verwendet. Die Abbildung zeigt repräsentative Aufnahmen; n = 2.

4 DISKUSSION

4.1 Antikörperselektion anhand ihrer Bindungsdynamik

Für die nun folgende Diskussion der Ergebnisse zur Antikörperselektion aufgrund ihrer spezifischen Bindungsdynamik gilt zu beachten, dass hier nur Aussagen zu den untersuchten Antikörperklonen und daher nur zu den entsprechenden Epitopen getroffen werden können. Für z.B. in Brustkrebs überexprimierten HER2 existieren eine Vielzahl unterschiedlicher monoklonaler Antikörper, die gegen unterschiedliche Epitope des c-erbB-2-Moleküls gerichtet sind und sich in ihrer Sensitivität und Spezifität stark unterscheiden (Fetsch und Abati, 2007). Auch für die CD79a-Expression in akuter myeloischer Leukämie wurde gezeigt, dass allein die Wahl des Antikörperklons eine entscheidende Rolle bei der Bewertung der Antigenexpression im untersuchten Gewebe spielt (Bhargava *et al.*, 2007). Daher sollen hier getroffene Aussagen nicht als allgemein gültig für die untersuchten Endothelmarker verstanden werden. Bei der Verwendung monoklonaler Antikörper sind zwei Parameter von besonderer Bedeutung: Affinität und Avidität. Affinität beschreibt dabei die Bindungsstärke zwischen einem einzelnen Antigen und einem bestimmten Bereich des Antikörpers. Avidität hingegen ist die akkumulierte Stärke mehrerer Affinitäten, die sich aus vielen Bindungsinteraktionen ergibt und daher auch als funktionelle Affinität bezeichnet wird (Rudnick und Adams, 2009).

Um die Anreicherungsmechanismen endothelspezifischer Antikörper am Endothel zu untersuchen, wurden fbAb mithilfe qualitativer (Immunfluoreszenz) und quantitativer (EC_{50}) Analyse selektiert. Die EC_{50} ist dabei die Agonist-Konzentration, die für die halbmaximale Amplitude der Dosis-Wirkungs-Kurve verantwortlich ist (White, 1992). Die EC_{50} -Ergebnisse spiegeln die Ergebnisse der histologischen Analyse zur Bindungsdynamik unterschiedlicher endothelspezifischer Antikörper wider. Schnell bindende Antikörperklone zeigten erwartungsgemäß niedrige EC_{50} -Werte. Antikörperklone, die in der histologischen Analyse nach 5 s Inkubation noch keine detektierbare Endothelbindung zeigten, wiesen in der EC_{50} -Analyse hingegen deutlich höhere bzw. nicht ermittelbare Werte auf. Die Analyse zur maximalen Antikörperbindung von LSEC zeigte jedoch vergleichbar hohe Avidität für fbAb und nicht-fbAb. Unterschiede in der Bindungsdynamik sind daher vermutlich eher der stärkeren Affinität der fbAb zu ihren Antigenen zuzuschreiben. Zu beachten ist hierbei

jedoch auch, dass zelluläre Integrierung die Erreichbarkeit von Antigenen und somit die Antikörperbindung reduzieren kann (Levin *et al.*, 2008; Wobus *et al.*, 2004). Vor diesem Hintergrund reflektiert die Quantifizierung der Antigenbindung (EC_{50}) in histologischen Präparaten vermutlich sowohl die Affinität des Antikörpers als auch potentielle Veränderungen der Antigen-Erreichbarkeit im zellulären Kontext.

Desweiteren zeigten Antikörper, die denselben Endothelmarker binden, eine unterschiedliche Bindungsdynamik in Maus- und Humangewebe. Von den drei im Mausgewebe als fbAb deklarierten Antikörpern zeigten nur anti-CD49e-Klone eine schnelle Endothelbindung in beiden Gewebetypen: 5H10-27-Klon im Mausgewebe sowie Volociximab und NKI-SAM-1 in humanem Gewebe. Integrin- α_5 -Untereinheiten (CD49e) bilden ausschließlich mit Integrin- β_1 -Untereinheiten (CD29) einen nichtkovalenten, heterodimeren Rezeptor für Fibronectin (Hemler *et al.*, 1987; Ruoslahti, 1991), weshalb man die hier verwendeten CD49e-Klone auch als anti-Integrin- $\alpha_5\beta_1$ -Antikörper bezeichnen kann.

Volociximab, ebenfalls bekannt als M200, ist ein chimärer monoklonaler Antikörper, der Integrin- $\alpha_5\beta_1$ inhibiert und in diversen klinischen Studien zur Therapie solider Tumoren bereits getestet wurde (Ng *et al.*, 2010). Während der Tumorangiogenese wird Integrin- $\alpha_5\beta_1$ nicht nur verstärkt von Endothelzellen exprimiert, sondern ist gleichzeitig besser zugänglich während des Tumorwachstums im Vergleich zum normalen Blutgefäßsystem (Parsons-Wingerter *et al.*, 2005) und daher ein interessantes Target für die antiangiogene Tumorthherapie. Im Gegensatz zu anderen antiangiogenen Therapieansätzen mit Fokus auf VEGF-Inhibition mittels Bevacizumab beispielsweise, inhibiert Volociximab die Bindung von Integrin- $\alpha_5\beta_1$ zu Fibronectin (Ligand der extrazellulären Matrix) und fördert damit die Apoptose proliferierender Endothelzellen, unabhängig von Wachstumsfaktorstimulation (Bhaskar *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2000). In klinischen Studien wurde Volociximab generell gut toleriert (Bell-McGuinn *et al.*, 2011), zeigte jedoch maximal vorläufige Hinweise auf Effektivität in der Therapie von metastasierendem Melanom (Cranmer *et al.*, 2006), Nierenzellkarzinom (Figlin *et al.*, 2006) und Pankreaskarzinom (Valle *et al.*, 2006) oder in Kombination mit Carboplatin und Paclitaxel in der Therapie des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (Besse *et al.*, 2013). Bisher kam Volociximab daher nicht über klinische Phase II-Studien hinaus zum Einsatz.

Eine *in vitro*-Studie zeigte jedoch die Bedeutung von Integrin- $\alpha_5\beta_1$ für die Ansiedlung von Metastasen des Kolonkarzinoms in der Leber, was Inhibitoren dieses Moleküls, wie

Volociximab, eine mögliche Rolle in der therapeutischen Kontrolle solcher Metastasen zuspricht (Pelillo *et al.*, 2015). Eine experimentelle Studie zu Brustkrebs (*in vitro* und *in vivo*) lässt weiterhin vermuten, dass Volociximab vorteilhaft in der Therapie hypoxischer Tumoren oder bei erhöhter Integrin- α_5 -Expression sein kann (Ju *et al.*, 2017). HCC ist trotz guter Vaskularisierung mit einem O₂-Gehalt von nur 0,8% (Median) eine sehr hypoxische Tumorentität (McKeown, 2014). Vor allem bei unabhängiger multizentrischer oder multinodulärer Ausbildung, verbunden mit intrahepatischen Metastasen, ist dies der Fall (Schlageter *et al.*, 2014). Volociximab-Therapie scheint daher auch hierfür von potentielltem Nutzen. Währenddessen hat NKI-SAM-1 als Integrin- α_5 -Inhibitor (Orecchia *et al.*, 2003) derzeit keine Bedeutung in experimentellen oder klinischen Studien zur Therapie von Tumoren. Die hier gezeigte schnelle Epitopbindung durch anti-CD49e (NKI-SAM-1) weist jedoch auf ein möglicherweise vielversprechendes Zielepitop für Tumorendothel-Targeting im Menschen hin. Die für anti-CD49e im murinen Modell erhobenen Daten zeigen daher großes Translationspotential, um in ein klinisches Setting eingebracht zu werden.

In der Maus erwiesen sich auch anti-CD31 und anti-CD146 als geeignete fbAb, jedoch nicht in humanem Gewebe. Für den translationalen Aspekt der Ergebnisse dieser Arbeit ist dies insofern von Bedeutung, als dass die initial erhobenen Daten für anti-CD146 und anti-CD31 bzw. damit beschichteter Nanopartikel nicht direkt in den humanen Kontext übertragbar sind. Wie bereits erwähnt, wurden hier nur einzelne Antikörperklone untersucht. Möglicherweise hätte die Wahl anderer Klone für die Analyse der qualitativen Bindungsdynamik in humanem Gewebe daher andere Ergebnisse geliefert.

Für die drei fbAb zeigten die Analysen eine vom Gewebetyp unabhängige Bindungsdynamik. Da CD31, CD146 und CD49e, wie hier gezeigt, sowohl auf Leber- als auch auf HCC-Endothel exprimiert werden, ist dies ein zu erwartendes Ergebnis. Für den *ex vivo*-Perfusionsansatz zur Analyse der Anreicherungsmechanismen am Endothel ist dies vorteilhaft, da dieser ausschließlich in der Leber durchgeführt wurde. Daneben ist die panendotheliale Expression dieser Marker auch für die *in vivo*-Experimente in tumortragenden Mäusen sowie die Translation der Ergebnisse von großer Bedeutung. CD31 (PECAM-1) ist beispielsweise auf allen Zellen des vaskulären Kompartiments, v.a. auf dem Endothel, exprimiert (Woodfin *et al.*, 2007). Eine ubiquitäre Endothelexpression konnte auch für CD146 (Muc18) (Bardin *et al.*, 1996) gezeigt werden. Erfolgt keine vollständige Anreicherung des radioaktiv markierten oder DOX-Nanopartikel-assoziierten Antikörpers am Tumorendothel, so kann es auch zu

unerwünschter Akkumulierung an normalen Endothelien kommen. Die Integrin- $\alpha_5\beta_1$ -Expression (CD49e/CD29) erscheint dagegen jedoch heterogener. In adulten Mäusen (Parsons-Wingerter *et al.*, 2005), sowie im Menschen (Sincock *et al.*, 1997) zeigen eine Vielzahl normaler Zellen, darunter Epithelzellen des *Ductus pancreaticus* sowie glatte Muskulatur des Darms, Integrin- $\alpha_5\beta_1$ -Expression. Humane, normale Endothelien exprimieren ebenfalls Integrin- $\alpha_5\beta_1$, wobei Sincock *et al.* (1997) eine wesentlich stärkere Expression der β_1 -Kette (CD29) im Vergleich zum Dimer zeigen konnte. Dies deutet auf eine möglicherweise schlechtere Erreichbarkeit der α_5 -Kette (CD49e) hin, was in einer geringeren unerwünschten Antikörperanreicherung bei Tumorendothel-Targeting resultieren könnte. Die meisten murinen Blutgefäße exprimieren jedoch kein Integrin dieses Typs, mit Ausnahme hepatischer Sinusoide sowie hochendothelialer Lymphgefäßvenolen (Parsons-Wingerter *et al.*, 2005). Diese Beobachtung scheint generell vorteilhaft bezüglich des Einsatzes von anti-CD49e (5H10-27) für murines Tumorendothel-Targeting.

Konjugation mit verschiedenen, unterschiedlich großen Molekülen zeigte einen unterschiedlichen Einfluss auf die Bindungsdynamik des Antikörpers. Die Konjugation mit RPE (ca. 240 kDa (Glazer, 1982)), sowie Thiolgruppen (2-Iminothiolan·HCl, ca. 0,138 kDa (National Center for Biotechnology Information, 2018b)) beeinflusste die Bindungsdynamik des IgG-Moleküls (160 kDa (Fang *et al.*, 2011)) nur leicht. Konjugation mit Alexa Fluor 488 (0,547 kDa (Xiao und Hrabetova, 2009)), sowie Streptavidin (60 kDa (Scheuring *et al.*, 1999)) führte hingegen zu deutlicher Verschlechterung der IgG-Bindungsdynamik. Allein die Größe des konjugierten Moleküls scheint daher nicht der ausschlaggebende Faktor gewesen zu sein. Vielmehr spielen dabei sowohl die Art der Konjugation als auch die genauen Bindungsstellen der konjugierten Moleküle am IgG eine Rolle, da diese unter Umständen eine sterische Hinderung der Antigenbindungsstellen des IgG-Moleküls verursachen. Aufgrund ihrer Größe bindet ein IgG-Molekül in der Regel nur ein RPE-Molekül über eines der Fab-Fragmente, was jedoch nicht zur Beeinträchtigung der Antigenbindung führt (Chen *et al.*, 2004; Mahmoudian *et al.*, 2010). Die Bindung sehr kleiner Thiolgruppen verursachte ebenfalls keine sterische Hinderung. Eine Konjugation mit Alexa Fluor 488-Molekülen, die ebenfalls nur ein geringes Molekulargewicht besitzen, sowie mit mittelgroßen Streptavidin-Molekülen führte hingegen zu stärkerer Beeinträchtigung. Da die Modifikation von Immunglobulinen in der Regel über die Bindung freier Aminogruppen des Antikörpers realisiert wird (Mahmoudian *et al.*, 2010; Mokotoff *et al.*, 2001), kann es, v.a. bei

Konjugation mit mehreren Molekülen, zu einer sterischen Hinderung der Antigenbindungsstelle kommen, wie bei Alexa Fluor 488 und Streptavidin wahrscheinlich eingetreten. Weiterhin kann der Grad der Konjugation, also das Verhältnis von konjugierter Substanz zu Proteinmenge, die Bindungsstärke des Antikörpers beeinträchtigen (Vira *et al.*, 2010). Um die Antikörper-Funktionalität maximal und gleichzeitig die Menge unkonjugierter Antikörper in einer Probe minimal zu halten, ist es von Vorteil, dieses Verhältnis optimal zu wählen (Vira *et al.*, 2010). Dies wurde hier jedoch nicht untersucht bzw. war für kommerziell erworbene, konjugierte Antikörper nicht bekannt.

Sowohl qualitative als auch quantitative Analysen wurden mit RPE-konjugierten Antikörpern durchgeführt. Die Konjugation von anti-CD146 (ME-9F1) mit RPE resultierte zwar in Reduktion der Bindungsgeschwindigkeit, letztere blieb jedoch sehr hoch. Zudem zeigte der Vergleich von anti-CD146 und anti-CD105 in unkonjugierter und RPE-konjugierter Form, dass die Konjugation mit RPE einen unterschiedlich starken Einfluss auf das Bindungsverhalten der beiden Antikörper hat. Hierbei kann jedoch ebenfalls der Grad der Konjugation eine Rolle gespielt haben und ist unter Umständen auch Chargen-abhängig. Daher liegt die Vermutung nahe, dass dies auch auf andere der untersuchten Antikörperklone zutrifft und die Geschwindigkeit der Antigenbindung in Einzelfällen möglicherweise schlechter bewertet wurde, als sie tatsächlich ist. Für die translationale Bewertung der Antikörper wäre die ausschließliche Verwendung der unkonjugierten Form daher vorteilhafter gewesen. Da für das Modell der isolierten Leberperfusion jedoch die Verwendung RPE-konjugierter Antikörper erforderlich war, zeigt die Wahl ebendieser für die qualitative und quantitative Analyse in der Maus ihre Berechtigung.

4.2 Phänomen endothelialer Antikörperanreicherung: Mechanismen und klinisches Potential

Physiologische Barrieren im Tumorgewebe, wie erhöhter interstitieller Druck oder große Distanzen im Interstitium, stellen für das therapeutische Tumor-Targeting mit tumorzellspezifischen Antikörpern ein großes Hindernis dar (Minchinton und Tannock, 2006). Die Wahl des Tumorendothels als therapeutisches Ziel umgeht hingegen jene Diffusions-Problematik und liegt daher im Fokus dieser Studie. In der vorliegenden Arbeit konnte bei Applikation einer niedrigen Dosis eine nahezu komplette Retention selektierter

endothelspezifischer Antikörperklone während der ersten intravaskulären Passage gezeigt werden. Dieser Prozess wird hier „endotheliale Anreicherung“ genannt.

Bei niedriger Dosierung *ex vivo* und in unkonjugierter Form zeigten, im Gegensatz zu unspezifischem Antikörper, zwei endothelspezifische fbAb fast 90% endotheliale Anreicherung während der ersten intravaskulären Passage. *In vivo* würde dies effektiv den Eintritt des Antikörper(-Fragment)-assoziierten Therapeutikums in die systemische Zirkulation verhindern. Zudem war die Effizienz der endothelialen Anreicherung bei der Wahl unterschiedlicher Antikörperdosen gleichbleibend, zumindest solange eine Sättigung endothelialer Epitope noch nicht erreicht war. Im klinischen Setting würde das eine flexiblere Wahl der Antikörperdosis ermöglichen. Die Applikation hoher Dosen, wie in der Klinik üblich, resultierte hingegen in einer Sättigung der Endothelbindungsstellen und verschleiert die hohe Effizienz des beschriebenen Prozesses. Eine Sättigung endothelialer Epitope kann relativ schnell erreicht werden und liegt beispielsweise für anti-CD146 (ME-9F1) bei 2 µg/g in der Mausleber (Thomann *et al.*, 2014).

Eine weitere interessante Beobachtung war die substantielle Verbesserung der endothelialen Antikörperanreicherung nach Reduktion der Perfusionsgeschwindigkeit um 50%. Da Antikörper oder ihre Fragmente für bildgebende oder therapeutische Zwecke in der Regel konjugiert werden müssen, ist deren Bindungsdynamik unter Umständen beeinträchtigt, wie hier gezeigt werden konnte. Daher ist die beobachtete Verbesserung der endothelialen Anreicherung möglicherweise auch für die klinische Anwendung von Bedeutung. In radiologischen Untersuchungen wird eine Reduktion der Flussgeschwindigkeit bereits routinemäßig mittels intravaskulärer Ballondilatation angewandt (Madoff, 2016). Eine starke Reduktion der Perfusionsgeschwindigkeit auf 0,2 ml/min resultierte in der vorliegenden Arbeit in noch besseren Anreicherungsraten und führte dadurch zu besserer Detektierbarkeit, jedoch auch zu irregulärer Blutgefäßmarkierung. Dies könnte auf eine inhomogene Perfusion unterschiedlicher Gefäßareale durch stark reduzierten intravaskulären Druck hinweisen und könnte hinsichtlich der homogenen Verteilung des Antikörpers eher kontraproduktiv sein.

Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass wiederholte oder Langzeitinjektion zu substantiell verminderter Effizienz der endothelialen Antikörperanreicherung führte. Die fortschreitende Reduktion der Anreicherungsrate nach wiederholter Injektion kam vermutlich durch die schrittweise Verminderung der Anzahl freier Endothelbindungsstellen mit jedem Zyklus

zustande. Langzeitinjektion hingegen resultierte möglicherweise in einem lokalen Konzentrationsgradienten vom Zentrum zur Peripherie des Blutgefäßes durch eine schnelle Antikörperimmobilisierung am Endothel. Eine höhere Antikörperkonzentration hat daher möglicherweise zu einem stärkeren Konzentrationsgradienten geführt, was erwartungsgemäß zu schnellerer, lateraler Bewegung des Antikörpers und somit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für einen Antikörper-Endothelkontakt führen würde. Damit demonstrieren beide Experimente, dass das Injektionsregime eine wichtige Rolle für erfolgreiche endotheliale Anreicherung spielt, wobei eine maximale endotheliale Anreicherungsrate nach einmaliger Bolusinjektion erwartet werden kann. Betrug die geschätzte Zeit der Bolusinfusion jedoch weniger als 1 s (entspricht einer Infusion von 10 μ l), konnte der Antikörper vermutlich nicht ausreichend viele Mikrogefäße erreichen, was in einer geringeren Anreicherungsrate als bei Bolusinjektion von 100 μ l (\approx 6 s) resultierte. Dies reflektiert die minimal notwendige Zeit zur Füllung der Mikrogefäße in der Maus von 5-10 s, wie sowohl in der AG Ryschich (Winkler *et al.*, 2018) als auch von anderen Arbeitsgruppen (Faye *et al.*, 2011) gezeigt wurde. Aufgrund unterschiedlicher Herzfrequenz und Organvolumen im Vergleich zum Menschen muss dies als speziesspezifisches Merkmal verstanden werden.

Bei Einsatz von RPE-konjugiertem Isotyp-Antikörper *ex vivo* konnten teilweise rechnerisch auch negative Werte ermittelt werden. Dies liegt vermutlich an Unterschieden in der Fluoreszenz von Perfusat und Pufferlösung. Bei der Fluoreszenzmessung liefert das Perfusat ein geringfügig stärkeres Hintergrundsignal als der verwendete Puffer, was bei sehr geringer endothelialer Anreicherung von Isotyp-Antikörper in der Leber unter Umständen in negativen Werten resultiert hat.

Vaskuläres Immuntargeting von pulmonalen und zerebralen Gefäßen mithilfe von endothelspezifischen Antikörpern, wie beispielsweise anti-CD31 und anti-CD54, wurde bereits in diversen Studien in Nagetier- (Danielyan *et al.*, 2007; Danilov *et al.*, 2001; Shuvaev *et al.*, 2007) und Schweinemodellen (Scherpereel *et al.*, 2002) untersucht. Diese Studien konnten anhand isolierter Organperfusion sowie *in vivo*-Applikationen ein hohes Potential der lokoregionalen Applikation für die lokale Gewebeanreicherung von Antikörpern oder Antikörper-Arzneimittel-Konjugaten zeigen. Scherpereel *et al.* (2002) prognostizierten eine Relevanz von Applikationsparametern und vermuteten eine verbesserte lokale Antikörperanreicherung durch verlangsamte Infusion. Auch das hier vorgestellte Konzept der

endothelialen Anreicherung hat vor allem im Kontext lokoregionaler Applikation ein hohes Translationspotential. Konventionelle klinische Anwendungen nutzen die systemische Zirkulation des Körpers, um den Targeting-Antikörper zum Tumor(endothel) zu befördern (Bertrand und Leroux, 2012). Die damit einhergehende anhaltende Arzneimittel-Exposition des gesamten Körpers und mögliche unerwünschte Wirkungen zwingen dabei oft zur Reduktion der Arzneimitteldosis (Postel-Vinay *et al.*, 2014). Bei Tumorzell-Targeting wird die Wirkung des Arzneimittels desweiteren durch die endotheliale Barriere sowie das Stroma behindert (Minchinton und Tannock, 2006). Lokoregionale Applikation lässt per se eine erhöhte lokale Substanzanreicherung erwarten; normalerweise kommt es jedoch nur zu partieller Retention des applizierten Arzneimittels während der ersten intravaskulären Passage. In einer klinischen Studie konnte beispielsweise eine 3,75fach höhere Konzentration von Tumor-Targeting Peptiden im Tumorgewebe nach HAI, im Vergleich zu i.v.-Injektion, detektiert werden (Kratochwil *et al.*, 2010). Auch in der AG Ryschich (Strübing, 2015; Winkler *et al.*, 2018) konnte, wenn auch bei geringer Gesamtanreicherung, eine 2,9fach höhere Anreicherung von Isotyp-Antikörper im Tumorgewebe nach i.a.-, im Vergleich zu i.v.-Applikation, gezeigt werden. Die in der vorliegenden Arbeit, sowie von Strübing gezeigte, sehr hohe Anreicherung endothelspezifischer Antikörper am Tumorendothel *in vivo* verdeutlicht jedoch das Potential des vorgestellten Konzepts. Der Vergleich mit Strübings Daten bestätigt zudem den hier *ex vivo* beobachteten negativen Zusammenhang von perfundierter Gewebemasse und lokaler Antikörperkonzentration auch *in vivo*. Strübing erreichte nach Perfusion von Panc02-tumortragendem LAS/LPS mit 1 ng/g Körpergewicht ¹²⁵I-CD146 101 %ID/g im Tumor und peritumoraler Leber, wohingegen die hier durchgeführte Perfusion des kleineren tumortragenden RMS zu etwa 126 %ID/g im Tumorgewebe bzw. peritumoraler Leber führte. Dies indiziert eine höhere endotheliale Anreicherung des Antikörpers mit sinkender Masse des perfundierten Gewebes. Die Antikörperanreicherung in der Lunge konnte ebenfalls verringert werden (ca. 81 %ID/g nach LAS/LPS-Perfusion; ca. 57 %ID/g nach RMS-Perfusion), was bei der Arbeit mit Radioimmunkonjugaten von Vorteil ist. Für die Translation der diskutierten Ergebnisse erscheint dies insofern relevant, als dass eine höhere effektive Konzentration der Targeting-Substanz erwartet werden kann, wenn eine geringere Gewebemasse für die lokoregionale Applikation gewählt wird bzw. werden kann. Bei Perfusion von Hep55.1C-tumortragendem LAS/LPS mit 5 ng/g Körpergewicht ¹²⁵I-CD146 konnte Strübing hingegen nur eine

Konzentration von $<50\%ID/g$ in Tumor bzw. peritumoraler Leber erreichen. Da *ex vivo* gezeigt wurde, dass die endotheliale Anreicherung Antikörperdosis-unabhängig ist, könnte dies auf eventuelle Unterschiede in der Vaskularisierung zwischen den unterschiedlichen Tumormodellen hindeuten. Dies wäre auch für die Anwendung in der Klinik zu beachten.

Radioimmunkonjugate repräsentieren eine vielversprechende Anwendung sowohl für Bildgebung als auch für die Therapie. Antikörperkonjugation mit kleinen Isotopen wie Iod (ca. 0,254 kDa (National Center for Biotechnology Information, 2018a)) hat keinen Einfluss auf die Effizienz der endothelialen Anreicherung, wie in der AG Ryschich gezeigt werden konnte (Winkler *et al.*, 2018). Im Gegensatz zu chemotherapeutischen Substanzen ist bei Verwendung Radioisotop-basierter Analysen unter Umständen schon eine geringe Konzentration ausreichend, um den entsprechenden bildgebenden oder therapeutischen Effekt zu erzielen. Die Menge der notwendigen bzw. maximal zu applizierenden Dosis richtet sich dabei unter anderem nach dem Verhältnis von Tumor- zu Normalgewebe und kann anhand des gewählten Toleranzkriteriums mittels Dosimetrie bestimmt werden (Petitguillaume *et al.*, 2014). Darüber hinaus penetrieren die in bekannten lokoregionalen Methoden wie TACE und SIRT (Van de Wiele, 2012) verwendeten Mikrosphären aufgrund ihrer Größe keine Kapillaren ($<20\ \mu m$) und zeigen eine eher fleckenartige Verteilung im Tumorgewebe (Roberson, 1992; Anderson, 1991). Im Gegensatz zu SIRT wird bei Anwendung endothelialer Anreicherung eine homogenere und zentralere Verteilung der Targeting-Substanz im Tumor erwartet, da auch tiefer liegende, kleine Blutgefäße erreicht werden können. Das Prinzip endothelialer Anreicherung stellt daher möglicherweise eine gute Alternative oder Ergänzung zu den erwähnten bestehenden Methoden dar.

Anhand der Bioverteilungsdaten des ^{125}I -konjugierten Antikörpers ist zu erkennen, dass ein Teil der injizierten Antikörpermenge das Tumorgewebe passierte und erst in der Lunge angereichert wurde. Da die Masse der Mauslunge ($0,18\ g \pm 0,02$) mit der des RMS ($0,21\ g \pm 0,03$) vergleichbar ist, resultierte dies in einer detektierbaren $\%ID/g$. Die beobachtete Akkumulation des endothelspezifischen Antikörpers in der Lunge stellt ein allgemeines Problem des Targetings pan-endothelialer Marker dar. Dies liegt einerseits an der großen endothelialen Oberfläche in der Lunge (Myerson *et al.*, 2015). Andererseits spielen jedoch auch die anatomischen Verhältnisse mit der Pulmonalzirkulation als First-pass-Organ eine Rolle, sobald ein entsprechendes Target-Molekül in die systemische Zirkulation gelangt (Bertrand und Leroux, 2012). Das Toleranzkriterium der Lunge

hinsichtlich radioaktiver Belastung ist jedoch weniger restriktiv als das für nicht-tumorale Leber (Petitguillaume, 2014), weshalb niedrige Konzentrationen keinen limitierenden Faktor darstellen sollten. Hepatopulmonale Shunts, die unter Umständen zu Strahlentherapiebedingter Pneumonitis führen können (Salem *et al.*, 2008), müssen jedoch auch hier als mögliche Kontraindikation individuell berücksichtigt werden.

Desweiteren konnte ein Zusammenhang zwischen berechneter EC_{50} und Anreicherungsrate *ex vivo* festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass die Bestimmung der EC_{50} für die Antikörperbindung in histologischen Präparaten als prädiktiver Parameter für die Abschätzung der endothelialen Anreicherung bestimmter Antikörperklone genutzt werden kann.

Anti-CD49e haben sich in der vorliegenden Studie aufgrund ihrer Bindungsdynamik als vielversprechende Targeting-Antikörper für das Konzept der endothelialen Anreicherung herausgestellt. Parsons-Wingerter *et al.* (2005) konnte zudem in verschiedenen murinen Tumormodellen eine sehr gute luminale Erreichbarkeit des Integrin- $\alpha_5\beta_1$ zeigen, was in normalen Organen in der Regel nicht der Fall ist. Nach systemischer Applikation des auch hier verwendeten Klons 5H10-27 konnte außerdem keine Anreicherung auf dem Lungenendothel sowie keine pathologischen Veränderungen in Normalgewebe trotz starker Akkumulation in den Lebersinusoiden detektiert werden (Parsons-Wingerter *et al.*, 2005). Diese vorteilhafte Bioverteilung, bessere Erreichbarkeit sowie Überexpression im Tumorendothel könnte sich daher positiv auf die unerwünschte Akkumulierung an gesunden Endothelien bei Anwendung des Prinzips der endothelialen Anreicherung im murinen Modell auswirken. Für den hier verwendeten Klon 5H10-27 konnte jedoch nur die Inhibierung der Fibronectinbindung *in vitro* gezeigt werden, eine Funktionsinhibierung von Endothelzellen und Angiogenese hingegen weder *in vitro*, noch *in vivo* (Ruppert *et al.*, 1995; Schultz und Armant, 1995). Direkte antiangiogene Therapie im Mausmodell kann daher mit diesem Antikörperklon nicht erwartet werden. Inwieweit eine vorteilhafte luminale Integrin- $\alpha_5\beta_1$ -Erreichbarkeit auch in humanen Tumoren zu beobachten ist, bedarf weiterer Untersuchungen. In den erwähnten klinischen Studien wurde Volociximab, ebenfalls ein Integrin- $\alpha_5\beta_1$ -gerichteter Antikörper, in Konzentrationen von 10-15 mg/kg i.v. verabreicht. Wie in der vorliegenden Studie gezeigt, entspricht das einer Konzentration, die durch Suggestion einer ineffektiven Anreicherungsrate zur Maskierung des Potentials der endothelialen Anreicherung führt. Sollte Volociximab im humanen Setting in das Konzept der

endothelialen Anreicherung nach lokoregionaler Applikation einbezogen werden, müsste mit geringeren Dosen gearbeitet werden. Dabei wäre wichtig zu prognostizieren, ob auf diese Weise ein therapeutischer Effekt erwartet werden kann. Bei wahrscheinlicher, notwendiger Mehrfachinjektion des Antikörpers müsste die zum Epitoprecycling erforderliche Zeit berücksichtigt werden, um eine verminderte endotheliale Anreicherungsrate bei Folgeinjektionen zu verhindern. Sollte eine Therapie auf diese Weise nicht möglich sein, zeigt Integrin- $\alpha_5\beta_1$ dennoch ein hohes Potential für effektives Tumor-Targeting mittels radioaktiv markierter Antikörper. Möglicherweise könnten Volociximab oder alternative anti-CD49e-Antikörperklone somit eine neue Bedeutung in der Therapie lokoregional zugänglicher Tumoren zukommen.

Voraussetzung für eine erfolgreiche Therapie oder Bildgebung auf Grundlage des Prinzips der endothelialen Anreicherung ist ein geeigneter Zugang zum Tumor für die lokoregionale Substanz-Applikation, wie es im Falle des HCC über die *A. hepatica* gewährleistet ist. Während der Angiogenese möglicherweise entstandene Gefäßanomalien müssen allerdings im Vorfeld evaluiert werden, da diese unter Umständen zu Komplikationen während des operativen Eingriffs führen können (Todo *et al.*, 1987). Desweiteren muss berücksichtigt werden, dass genetische Anomalien der Tumorendothelzellen (Hida *et al.*, 2004; Streubel *et al.*, 2004) oder die Ausbildung von sogenannten Mosaik-Tumorgefäßen mit luminal exponierten Tumorzellen (Chang *et al.*, 2000) die Effizienz der endothelialen Anreicherung beeinträchtigen können. Die alleinige erhöhte lokale Konzentration eines Therapeutikums erlaubt außerdem keine Aussage über ein verbessertes Therapieergebnis (Kratochwil *et al.*, 2010) und muss zusätzlich in experimentellen *in vivo*-Modellen evaluiert werden.

4.3 Nanopartikelbeschichtung: chemische Aspekte und Effizienz

Zu Beginn der Experimente mit Nanopartikeln wurde deren Beschichtungseffizienz verglichen. Um die Ergebnisse in Bezug auf die Bindungsdynamik und die Anreicherungsmechanismen für Nanopartikel mit denen für Antikörper vergleichen zu können, erfolgte die Applikation von Nanopartikeln auf histologische Gewebepräparate oder zur Injektion *ex vivo* bzw. *in vivo* anhand der berechneten Antikörperkonzentration der Nanopartikel-Lösung. Desweiteren wurden sowohl für Immunfluoreszenzanalysen als auch für *ex vivo*-Perfusionen in der Regel 100 μ l der entsprechenden Substanz appliziert. War die Beschichtungseffizienz jedoch zu gering, wie beispielsweise bei CD146-Fc-Fragment-

PEG-NH₂-MNP, konnte dies nicht realisiert werden bzw. erforderte die Applikation einer geringeren Antikörperdosis.

Bei MNP ergab die Analyse der Beschichtungseffizienz zunächst ein schlechteres Ergebnis für die PEGylierte Variante. Laut Herstellerangaben haben sowohl NH₂-MNP als auch PEG-NH₂-MNP einen Durchmesser von 20 nm bzw. einen hydrodynamischen Durchmesser von 20-110 bzw. 100 nm. Auch sonst unterscheiden sich die beiden MNP-Varianten in ihren physikalischen Eigenschaften, wie Konzentration, Partikeltyp, Polydispersionsindex, Dichte und Eisenkonzentration nicht voneinander. Durch die Konjugation von PEG-Ketten auf die Oberfläche der MNP kriert man jedoch eine hydrophile Oberfläche (Li und Kao, 2003), was der entscheidende Unterschied zwischen diesen beiden MNP-Varianten ist. Zur Beschichtung mussten die MNP mehrere Waschschriffe mittels magnetischer Separierung unterlaufen, wodurch es zu Verlust von MNP kam. Bei allen drei MNP-Varianten waren die Verluste mit 70-85% hoch, aber vergleichbar. Die hydrophile Oberfläche der PEGylierten MNP hatte daher keinen entscheidenden Einfluss auf den Waschschriff-bedingten Partikelverlust. Beobachtete Unterschiede in der Beschichtungseffizienz sind demzufolge hauptsächlich durch verminderte Antikörperbindung an PEG-NH₂-MNP zu begründen. Die Aminogruppen sind bei der PEGylierten Variante laut Hersteller an den distalen Enden der PEG-Ketten angebracht, sodass diese, wie bei unPEGylierten MNP, für den thiolierten Antikörper frei zugänglich sein sollten. PEG-Ketten werden in der Nanotechnologie häufig verwendet, da sie zur Verlängerung der Plasmahalbwertszeit sowie Reduktion von renaler Clearance und proteolytischer Degradation der PEGylierten Substanz beitragen (Greenwald *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2012). Sie verbessern außerdem die Bindungseffektivität sterisch anspruchsvoller Biomoleküle (Chen *et al.*, 2005), wozu man Antikörper mit einer Größe von ca. 160 kDa (\approx 10-20 nm) zählen kann. Andererseits verhindern chemische Eigenschaften der PEG-Ketten eine dichte Beschichtung der Nanopartikel-Oberfläche (Sofia *et al.*, 1998). Dadurch standen bei der PEGylierten MNP-Variante möglicherweise weniger Aminogruppen für die Konjugation mit thioliertem Antikörper zur Verfügung als bei nicht PEGylierten MNP, was in verringerter Beschichtungseffizienz resultierte (siehe Abb. 6).

Die Beschichtung von PEG-NH₂-MNP mit anti-CD146 (ME-9F1) über einen zwischengeschalteten anti-Fc-Fragment-Antikörper führte zu weiterer Reduktion der Beschichtungseffizienz. Primärer Grund für diese Variante der Beschichtung war die vermutete suboptimale Orientierung des thiolierten, endothelspezifischen Antikörpers auf

der MNP-Oberfläche nach direkter Beschichtung. Die Verwendung von Traut's Reagenz dient der Inkorporierung von Thiolgruppen über Reaktion mit Lysin- oder N-Terminus-ständigen primären Aminogruppen des Proteins (Mokotoff *et al.*, 2001). Da Immunglobuline jedoch mehrere, über den gesamten Antikörper verteilte Aminogruppen besitzen, kann die Bindung zugefügter Thiolgruppen zu Funktionsbeeinträchtigung führen (Tramontano *et al.*, 1986). Desweiteren resultiert diese Art der Antikörper-Funktionalisierung in einer Vielzahl von Bindungsstellen für die MNP-Beschichtung. So kann es nach Konjugation der thiolierten Antikörper mit den Maleimid-funktionalisierten MNP zu unterschiedlicher Orientierung der Antikörper auf der MNP-Oberfläche kommen. Unter Umständen führt dies zu sterischer Behinderung der Antigenbindungsstellen und damit zu reduzierter Proteinaktivität (Sapsford *et al.*, 2013). Da die Ausrichtung der endothelspezifischen Antikörper mittels direkter Beschichtung nicht zu kontrollieren ist, kann es zu heterogener Proteinaktivität und damit uneinheitlicher Avidität kommen (Sapsford *et al.*, 2013), was als Limitation dieser Methode zu verstehen ist. Da die Beschichtung mittels anti-Fc-Fragment-Antikörper ein zweistufiger Prozess und daher mit mehr Waschschritten assoziiert ist, war der absolute Partikelverlust hierbei größer, sodass zum Zeitpunkt der Beschichtung mit anti-CD146 (ME-9F1) per se weniger MNP in der Lösung vorhanden waren. Außerdem war die absolute Anzahl der Bindungsstellen für den endothelspezifischen Antikörper bei zweistufiger Beschichtung möglicherweise geringer, da vielleicht nicht jeder, durch direkte Beschichtung gebundene, anti-Fc-Fragment-Antikörper aufgrund der sterischen Verhältnisse entsprechende endothelspezifische Antikörper binden konnte. Dies erklärt die beobachtete verminderte Beschichtungseffizienz von CD146-Fc-Fragment-PEG-NH₂-MNP (siehe Abb. 6).

Bei der histologischen Überprüfung der Endothelbindung beschichteter MNP in murinem HCC wurden die drei MNP-Varianten mit ungebundenem anti-CD146 (ME-9F1) verglichen. Dabei zeigten alle MNP-Varianten eine deutlich langsamere Endothelbindung als ungebundener Antikörper. CD146-Fc-Fragment-PEG-NH₂-MNP zeigte trotz ineffizientester Beschichtung die mit Abstand deutlichste Bindung, verglichen mit den anderen beiden MNP-Varianten. Dies lässt einerseits eine erfolgreiche zweistufige Beschichtung mit deutlich besser ausgerichteten anti-CD146 (ME-9F1) auf der MNP-Oberfläche vermuten. Dadurch freiliegende Fab-Fragmente führten zu effizienterem Endothel-Targeting der beschichteten MNP. Effizienteres immunspezifisches Targeting mittels MNP-Beschichtung über das Fc-Fragment des entsprechenden Antikörpers wurde bereits beschrieben (Rezaeipoor *et al.*,

2009) und kann hier bestätigt werden. Andererseits zeigen die Ergebnisse, dass die sterischen Verhältnisse im Nanopartikel-Endprodukt einen wesentlichen Einfluss auf das Bindungsverhalten beschichteter MNP haben. Bei der EC_{50} -Analyse wurde eine eventuelle sterische Behinderung der Antigenbindung nach willkürlicher Ausrichtung durch ungerichtete Bindung des endothelspezifischen Antikörpers auf der MNP-Oberfläche hingegen nicht beachtet. Die Immunfluoreszenzfärbung zeigte zusätzlich eine verminderte Endothelbindung für PEG-NH₂-MNP im Vergleich zu NH₂-MNP. Eine Erklärung ist die mögliche zusätzliche sterische Behinderung der Antigenbindung durch PEG-Ketten (Mu *et al.*, 2013). So wie PEG-Ketten durch sterische Hinderung die Opsonierung und folgende Phagozytose durch Zellen des MPS verhindern sollen (Kenausis *et al.*, 2000; Storm *et al.*, 1995), können v.a. lange Ketten und hohe Ketten-Dichte Nanopartikel-assoziierte Liganden davon abhalten, ihr Target zu binden (Hak *et al.*, 2012; Mori *et al.*, 1991). Zumindest letzteres könnte im Falle der hier verwendeten PEG-NH₂-MNP einen negativen Einfluss auf die Endothelbindung gehabt haben. Im Gegensatz zu ungebundener sowie Fc-Fragment-Variante, lag der endothelspezifische Antikörper bei direkt beschichteten MNP in thiolierter Form vor. Dieser Unterschied sollte allerdings kein Problem darstellen, da Thiolierung laut EC_{50} -Analyse keinen negativen Effekt auf das Bindungsverhalten des untersuchten Antikörpers hat.

Für die Beschichtung von Liposomen hat man sich der nicht-kovalenten Streptavidin-Biotin-Konjugationschemie bedient (Chaiet und Wolf, 1964), da diese eine gut etablierte Methode zur Funktionalisierung von Nanopartikeln mit Target-spezifischen Biomolekülen, z.B. Antikörpern, ist (Laitinen *et al.*, 2007; Sapsford *et al.*, 2013). Sie stellt außerdem ein universelles Instrument dar, mit dem man ein beliebiges Biotin-konjugiertes Molekül koppeln kann. Für den Einsatz *in vivo* ist allerdings zu beachten, dass Streptavidin ein exogenes, potentiell immunogenes Protein ist (Yumura *et al.*, 2013). Die multivalente Biotinbindung durch Streptavidin kann außerdem Konglomeratbildung zwischen beschichteten Nanopartikeln auslösen. Der sehr niedrige Polydispersionsindex der hier verwendeten ILP weist allerdings nicht auf durch Kreuzreaktionen hervorgerufene Partikelagglomeration hin. Die hier verwendeten Liposomen waren aufgrund der bereits beschriebenen Vorteile ebenfalls PEGyliert. PEGylierung ist bei der Verwendung von Liposomen jedoch auch aufgrund der stabilisierenden Wirkung auf die Lipiddoppelschicht für viele Anwendungen vorteilhaft (Gabizon, 2001). Die Verwendung des Lightning-Link

Streptavidin-Konjugation-Kits (Innova Biosciences) nutzt exponierte Aminogruppen des Antikörpers zur Anlagerung von Streptavidin-Molekülen. Da diese wesentlich größer sind als Thiolgruppen, führte die Konjugation zu Alteration des Antikörper-Bindungsverhaltens, möglicherweise aufgrund sterischer Hinderung der Antigenbindungsstelle. Bei der Beschichtung biotinylierter Liposomen kann es im Folgenden zu heterogener Orientierung des endothelspezifischen Antikörpers auf der ILP-Oberfläche kommen, was unter Umständen mit Unterschieden in der Avidität einhergeht (Sapsford *et al.*, 2013). Die nach Liposomenbeschichtung mitgeführte Dialysekontrolle lässt feststellen, dass mit Dialyseende noch ungebundener Antikörper in der Dialysekassette vorhanden war. Möglicherweise in der Liposomenprobe vorhandener ungebundener Antikörper könnte mit Liposom-gebundenem Antikörper um endotheliale Bindungsstellen konkurriert und unter Umständen die Effizienz der endothelialen ILP-Anreicherung reduziert haben. Eine Verlängerung der Dialysezeit bei Raumtemperatur wurde jedoch nicht vorgenommen, da sich dies unter Umständen negativ auf die Stabilität der Liposomen ausgewirkt hätte (Nakamura *et al.*, 2012). Vor dem experimentellen Einsatz der ILP musste außerdem die Beschichtungseffizienz bestimmt werden, was zu weiterer Verlängerung der Vorbereitungszeit geführt hat.

An dieser Stelle muss erwähnt werden, dass Immunglobuline trotz ihrer hohen Spezifität und guten Verfügbarkeit (Allen, 2002) als Liganden für die Herstellung von Targeting-Nanopartikeln einige Limitationen mit sich bringen. Ihre Größe führt einerseits zu wesentlicher Vergrößerung des hydrodynamischen Nanopartikel-Durchmessers (Jiang *et al.*, 2008). Für hier verwendete Liposomen führte die Beschichtung mit Antikörpern beispielsweise fast zur Verdopplung des Durchmessers der daraus resultierenden ILP. Andererseits erschwert die Verwendung großer Biomoleküle die effektive Oberflächenkonjugation der Nanopartikel (Jiang *et al.*, 2008). Das Vorhandensein des Fc-Fragments bringt *in vivo* ebenfalls Schwierigkeiten mit sich, sofern dieses durch suboptimale Positionierung des Antikörpers auf dem Nanopartikel auf dessen Oberfläche präsentiert wird. Ist dies der Fall, kommt es zu erleichterter Erkennung durch das MPS und damit zu sehr effektiver Nanopartikel-Eliminierung aus dem Blut (Weinberg *et al.*, 2005). Die relative Sensitivität von Immunglobulinen gegenüber Umwelteinflüssen, wie Temperatur, Salzkonzentrationen oder Enzymen, sowie ihre geringe Resistenz gegenüber organischen Lösungsmitteln bringt außerdem technische Herausforderungen für die Reproduzierbarkeit sowie limitierte Stabilität und Haltbarkeit mit sich (Bertrand *et al.*, 2014). Mittels

Fragmentierung von Immunglobulinen kann man beispielsweise Fab'- und F(ab')₂-Fragmente als Targeting-Einheiten für Nanopartikel gewinnen. Diese sind mit ca. 50 bzw. 100 kDa (Simard und Leroux, 2010) wesentlich kleiner als IgG. In experimentellen Studien wurden F(ab')₂-Fragmente trotz fehlendem Fc-Fragment jedoch vergleichsweise schnell aus der Blutzirkulation eliminiert (Nelson und Manning, 1980; Yano *et al.*, 1995). Die Verwendung von Fab'-Fragmenten zeigte im Mausmodell hingegen vergleichbare Zirkulationszeit von beschichteten und unbeschichteten Nanopartikeln (Cheng und Allen, 2008; Simard und Leroux, 2010). Bis jetzt wurden nur sehr wenige Antikörper-Fragment-beschichtete Nanopartikel in klinischen Studien validiert. Ein Beispiel sind PEGylierte DOX-Liposomen mit inkorporiertem Cetuximab-Fab'-Fragment zur Behandlung unterschiedlicher solider Tumoren (Mamot *et al.*, 2012). Alternativen bei der Wahl von Liganden zur Herstellung von Targeting-Nanopartikeln sind andere natürlich vorkommende bzw. synthetisch hergestellte Proteine, z.B. Transferrin (Choi *et al.*, 2010) bzw. Affibodys (Alexis *et al.*, 2008), Peptide, z.B. RGD-Peptide (Burke *et al.*, 2002) oder Endothelzellen-penetrierende Peptide (Roth *et al.*, 2012), Nukleinsäure-basierte Aptamere (Bagalkot *et al.*, 2006; Farokhzad *et al.*, 2006) oder kleinmolekulare Komponenten, z.B. Folsäure (Werner *et al.*, 2011) oder PSMA-bindendes ACUPA (Hrkach *et al.*, 2012). Alle erwähnten Alternativen bringen ihre Vor- und Nachteile mit sich und es bedarf weiterer experimenteller sowie klinischer Studien, bis die ersten funktionalisierten Nanopartikel kommerziell erhältlich sind (van der Meel *et al.*, 2013).

4.4 Scherkraftabhängige Nanopartikelbindung

Unterschiedliche Strömungsbedingungen im Tumor- und Lebergefäßsystem sind eine günstige Voraussetzung für die Nanopartikel-Anreicherung am Tumorendothel, da auf die Nanopartikel wirkende Scherkräfte deren Bindungsverhalten beeinflussen. Das biologische Prinzip der scherkraftabhängigen Adhäsion von Leukozyten (Ley *et al.*, 2007) kann hierfür auf die Nanopartikel-Adhäsion an das Tumorendothel übertragen werden. Aufgrund der abnormen Architektur, starken Verzweigung und größeren Gefäßdurchmesser sind die Scherkräfte in Tumorblutgefäßen heterogen. In vielen Arealen, v.a. in dilatierten Gefäßen, liegen diese jedoch unter denen, die man in der physiologischen Mikrozirkulation beobachtet. Durchschnittliche Scherkräfte für das Tumorgewebe anzugeben, ist schwierig und daher in der Literatur schwer zu finden (Jain, 1988). Für die Scherkräfte in den

Lebersinusoiden der Ratte gibt es hingegen mit ca. 6 dyn/cm² (Gock *et al.*, 2011) detaillierte Messungen.

Die strömungs- bzw. scherkraftabhängige Bindung beschichteter MNP am Mausleber- und Tumorendothel wurde zwar bereits gezeigt (Thomann *et al.*, 2015), sollte jedoch für die Bindung der hier hergestellten MNP am Tumorendothel überprüft werden. In einem Perfusionskammerexperiment wurden CD146-NH₂-MNP unterschiedlichen Scherkräften ausgesetzt, wobei 5 dyn/cm² physiologische Gegebenheiten widerspiegeln sollten. Scherkräfte von 0,5 dyn/cm² dienen der Simulation sehr geringer Flussgeschwindigkeit, wie sie in dilatierten Tumorblutgefäßen größtenteils zu erwarten ist. Als Ligand auf der MNP-Oberfläche wurde anti-CD146 (ME-9F1) gewählt, da CD146-Überexpression im verwendeten murinen HCC-Modell im Vorfeld gezeigt wurde (Thomann *et al.*, 2014). Aufgrund der schlechten Beschichtungseffizienz nach zweistufiger Beschichtung war es sehr schwierig, ein ausreichend großes Volumen der CD146-Fc-Fragment-PEG-NH₂-MNP-Lösung zu generieren. Daher wurden CD146-NH₂-MNP verwendet, obwohl diese unter statischen Bedingungen erst nach 30 min eine endothelspezifische Bindung erkennen ließen. Aufgrund der prognostizierten schlechteren MNP-Bindung unter Strömungsbedingungen wurde jedoch eine Inkubations- bzw. Perfusionszeit von 60 min gewählt. Erwartungsgemäß zeigte freier endothelspezifischer Antikörper scherkraftunabhängige Endothelbindung (Thomann *et al.*, 2015), während Isotyp-Antikörper keine Bindung am Endothel erkennen ließ. Die generell schlechtere Endothelbindung beschichteter MNP im Vergleich zu ungebundenem Antikörper wurde durch Applikation von Scherkräften so stark reduziert, dass keine Blutgefäßmarkierung detektierbar war. Der beschriebene negative Einfluss von Scherkräften unter Strömungsbedingungen auf die Bindung beschichteter Nanopartikel (Calderon *et al.*, 2009) konnte damit bestätigt werden. Durch mikroskopische Analyse konnte allerdings kein Unterschied in der MNP-Endothelbindung bei Applikation von niedrigen bzw. hohen Scherkräften gezeigt werden. Die nicht vorgenommene Normierung des durch die Perfusionskammer geflossenen Volumens ist dabei möglicherweise relevant. Die applizierten Wandscherkräfte von 0,5 bzw. 5 dyn/cm² entsprechen bei den hier verwendeten Perfusionskammern einer Geschwindigkeit von 0,48 bzw. 4,8 ml/min. In beiden Fällen wurde jedoch für 60 min perfundiert. Bei geringerer Perfusionsgeschwindigkeit haben daher, absolut gesehen, wesentlich weniger beschichtete MNP die CD146-Epitope des Endothels

passiert, weshalb ein direkter Vergleich der scherkraftabhängigen MNP-Bindung hier nicht möglich ist.

Beschichtete MNP bieten aufgrund ihres größeren hydrodynamischen Durchmessers eine größere Angriffsfläche als freier Antikörper und sind daher sensibler gegenüber Scherkräften. Die Konjugation eines Liganden auf die Nanopartikel-Oberfläche führt außerdem zu Verlust dessen Rotations- und Translationsfreiheit. Die Kopplung mehrerer Liganden auf der Nanopartikel-Oberfläche erhöht hingegen deren Valenz und damit die Avidität der neuen Entität (Wang *et al.*, 2010a). Die Ligandendichte auf der Nanopartikel-Oberfläche hat somit Einfluss auf die Avidität des Nanopartikels. Da die Größe des Liganden sowie des Nanopartikels dabei jedoch ebenfalls eine Rolle spielt (Elias *et al.*, 2013), muss das optimale Verhältnis für jede Anwendung individuell bestimmt werden. Für die hier verwendeten, mit thioliertem IgG funktionalisierten, 20 nm großen MNP hat Thomann *et al.* (2015) ein optimales Verhältnis von 20 µg/mg Partikel zeigen können. Dasselbe Verhältnis von eingesetzter Antikörper- zu Partikelmenge wurde daher auch für diese Studie verwendet. Für hoch-avide Nanopartikel konnte zudem gezeigt werden, dass die Adhärenz der endothelgebundenen Partikel selbst unter hohen Scherkräften von 30 dyn/cm² und langer Perfusionszeit von 180 min sehr stabil ist (Mukundakrishnan *et al.*, 2009). Die gewählte Perfusionszeit von 60 min sollte daher per se keinen limitierenden Faktor darstellen.

Die Größe und Form des Nanopartikels sind zwei weitere Faktoren, die bei deren Bindung an eine Oberfläche von großer Bedeutung sind. Runde, sehr kleine Nanopartikel weisen beispielsweise eine starke Oberflächenkrümmung auf, was die nachträgliche, homogene und dichte Konjugation mit Liganden beeinträchtigen kann (Ghitescu und Bendayan, 1990). Eine optimale Ligandendichte auf der Nanopartikel-Oberfläche beeinflusst, wie beschrieben, die Avidität und damit die erfolgreiche Bindung der funktionalisierten Nanopartikel. Mithilfe von Perfusionskammerexperimenten konnte zudem gezeigt werden, dass die maximale luminale Nanopartikelbindung bei einer bestimmten Scherkraftrate mittels Optimierung der Partikelgröße erreicht und computerbasiert berechnet werden kann (Boso *et al.*, 2011). Die Adhäsion am (Tumor-)Endothel wird weiterhin durch die Form des Nanopartikels beeinflusst. So zeigen münzförmige Nanopartikel im Perfusionskammerexperiment eine deutlich bessere Oberflächenadhäsion als stäbchen- oder kugelförmige Nanopartikel mit gleichem Volumen (Adriani *et al.*, 2012). Münzförmige Nanopartikel werden unter

konstanten laminaren Strömungsbedingungen erfolgreicher an die Gefäßwand gepresst und weisen eine größere Adhäsionsfläche auf als ihre stäbchen- und kugelförmigen Alternativen. Bei erfolgter luminaler Fixierung bietet ihr günstiges Verhältnis von Höhe zu Volumen den Scherkräften außerdem eine geringere Angriffsfläche. Die beobachteten Vorteile sind im Vergleich zwischen gleichgeformten Partikeln jedoch ebenfalls größenabhängig, wobei mittelgroße Partikel (1000×400 nm) die stärkste Oberflächenbindung erzielten (Adriani *et al.*, 2012). Die multifaktorielle Beeinflussung der Nanopartikelbindung am Tumorendothel kann mithilfe mathematischer Modellierung berücksichtigt und somit Nanopartikel mit vorteilhaften Eigenschaften konzipiert werden (Decuzzi und Ferrari, 2008). Bei der Bewertung der *in vitro*-Ergebnisse zur MNP-Endothelbindung unter Strömungsbedingungen muss jedoch berücksichtigt werden, dass das Tumorgefäßbett ein hoch komplexes Zirkulationssystem ist. Das Modell der laminaren Strömung wird diesem nur bedingt gerecht, da morphologische Besonderheiten wie variable Gefäßdurchmesser, starke Tendenz zur Gefäßverzweigung sowie pulsatiler Fluss zu einem verstärkt dysregulierten Strömungsbild beitragen können (Azzi *et al.*, 2013; Ryschich *et al.*, 2002). Diese Besonderheiten und andere Mechanismen, wie Partikelendozytose durch das MPS oder Einfluss zellulärer Blutbestandteile auf die Akkumulation der Nanopartikel in Endothelnähe, machen eine *in vivo*-Evaluation daher unumgänglich.

4.5 Zytotoxisches Potential eigener DOX-ILP

Um einen therapeutischen Effekt zu erzielen, muss die entsprechende Substanz so appliziert werden, dass sie den Ort der Erkrankung in einer effektiven Konzentration erreicht, bei möglichst minimaler unerwünschter Arzneimittelwirkung oder Alteration physiologischer Prozesse. Für die Therapie vieler solider Tumoren, unter anderem HCC, stellt das momentan noch eine große Herausforderung dar. Ein Grund ist der Einsatz therapeutischer Substanzen, die eine schädigende Wirkung auf allgemein schnell proliferierende Zellen haben, ohne dabei tumorspezifisch zu agieren (Fang *et al.*, 2011). Desweiteren sind die Pharmakokinetik und -dynamik vieler kleinmolekularer (Chemo-)Therapeutika für eine systemische Applikation äußerst ungünstig (Duncan, 2003). Eine Möglichkeit, dieses Problem zu adressieren, ist die Verwendung solcher Therapeutika in Form von Antikörper-Arzneimittel-Konjugaten oder mittels Inkorporierung in Nanopartikel. Für die Therapie solider Tumoren

stehen jedoch zum jetzigen Zeitpunkt nur einige wenige Nanopartikel-basierte Arzneimittel zur Verfügung (van der Meel *et al.*, 2017).

Ein limitierender Faktor bei der Verwendung von DOX-Liposomen ist beispielsweise, dass noch nicht komplett verstanden ist, auf welche Weise sie ihr geladenes Therapeutikum freisetzen und damit ihre antitumorale Wirkung entfalten. Eine Möglichkeit dafür ist die Phagozytose durch tumorassoziierte Makrophagen mit DOX-Freisetzung in den extravasalen Raum innerhalb des Tumors und anschließender Diffusion der freigesetzten Substanz in die Tumorzelle (Huang *et al.*, 1992). Die Endozytose des Liposoms durch die Tumorzelle mit folgender intrazellulärer, lysosomaler Degradierung ist ebenfalls möglich (Hillaireau und Couvreur, 2009). Liposomales DOX zeigt jedoch in jedem Fall erst nach Freisetzung des Chemotherapeutikums seine zytotoxische Wirkungsweise. Ein wesentlicher Nachteil bei der Verwendung von Liposomen in der hier eingesetzten Form ist daher die fehlende Kontrolle über die Substanzfreisetzung. So kann unter Umständen, trotz suffizienter Substanzakkumulation im Tumorbereich, eine unzureichende intrazelluläre Arzneimittelkonzentration zu einem nicht zufriedenstellenden therapeutischen Effekt führen (Zamboni, 2005). Aufgrund der wenigen kommerziell erhältlichen Nanopartikel-basierten Arzneimittel sollte in dieser Studie zur möglichen Etablierung funktionalisierter Nanopartikel auf eine bereits zugelassene Form zurückgegriffen werden. DOX-Liposomen wurden deshalb trotz der beschriebenen Limitationen hinsichtlich Form, Größe und fehlender Kontrolle der DOX-Freisetzung gewählt und kommerziell erworben.

Ogleich in dieser Studie Tumorendothel-Targeting beabsichtigt wird, ist die Wahrscheinlichkeit der unspezifischen Nanopartikel-Anreicherung mittels EPR-Effekt bei den hier ca. 200 nm großen DOX-ILP gegeben. Deshalb sowie aufgrund der limitierten Verfügbarkeit von Mausendothelzellen wurden für die Zellviabilitäts- und Anreicherungs-experimente Hep55.1C-Tumorzellen verwendet. Zunächst wurde das zytotoxische Potential von liposomalem sowie freiem DOX auf die hier verwendeten murinen Tumorzellen untersucht. Die Ergebnisse des Zellviabilitätsassays verdeutlichen dabei den beschriebenen zeitlich verzögerten zytotoxischen Effekt von liposomalem gegenüber freiem DOX. Dabei zeigten die für experimentelle Studien verwendeten DOX-Liposomen ein nahezu identisches Verhalten wie klinisch zugelassenes Caelyx. Desweiteren zeigten sich Hep55.1C-Zellen sensitiver gegenüber DOX als Panc02-Zellen. Einerseits führte dies zur Wahl von Hep55.1C-Zellen für weitere Experimente. Andererseits spiegelt diese Sensitivität gegenüber DOX die

humane Situation nur unzureichend wider, da die meisten Tumorzellen Resistenzen gegenüber vielen Chemotherapeutika zeigen, so auch HCC (Gottesman, 2002; Li *et al.*, 2007). Für freies DOX waren bei Applikation von 30 μM sowohl nach Inkubation für 48 h als auch für nur 30 min (48 h-Messung) nur 2 bzw. 6% viable Hep55.1C-Zellen detektierbar. Dies unterstützt die Vermutung, dass für den antitumoralen Effekt die absolute intrazelluläre Konzentration von DOX wichtiger ist als die zeitliche Exposition (El-Kareh und Secomb, 2005). Bei der Bewertung des hier durchgeführten Zellviabilitätsassays ist jedoch zu beachten, dass sich die Effizienz des Chemotherapeutikums aus dem komplexen Zusammenspiel von Diffusion im Gewebe, Freisetzung aus der Trägersubstanz, DNA-Bindung und Eliminierung aus dem Gewebe ergibt (Toley *et al.*, 2013). In einem Modell mit einschichtigem Zellrasen können jedoch nicht alle genannten Faktoren zusammenhängend berücksichtigt werden. Zur besseren *in vitro*-Evaluation von Chemotherapeutika eignet sich die Kombination aus mathematischer Modellierung und Mikroperfusionskammersystem, da somit die Zuführung und Eliminierung des Arzneimittels über Blutgefäße zum Tumorgewebe realistischer simuliert werden kann (Toley *et al.*, 2013).

Fluorimetrie-basierte Analysen validierten die gute Hep55.1C-Zellbindung von CD49e- bzw. MRG2a-83-DOX-ILP über primären bzw. sekundären Mechanismus und die gleichzeitig deutlich reduzierte Bindung der Isotyp-DOX-ILP. Dabei schienen CD49e- bzw. MRG2a-83-DOX-ILP hauptsächlich auf der Zelloberfläche gebunden, während nach Inkubation mit Isotyp-DOX-ILP nur ein schwaches, diffus wirkendes Signal detektierbar war. Die quantitative Analyse der Hep55.1C-Bindung erfolgte durch fluorimetrische Untersuchung des Überstands und nicht der Zellen selbst. Die Angaben zu gebundenem Antikörper bzw. DOX pro Zelle erfolgte also rein rechnerisch. Dennoch ist anhand der so erhobenen Daten eine klare Tendenz zu erkennen. Die quali- und quantitative Analyse lassen daher vermuten, dass Isotyp-DOX-ILP zwar zum Teil unspezifisch von Hep55.1C-Zellen gebunden wurden, die beobachtete verstärkte Bindung von CD49e- bzw. MRG2a-83-DOX-ILP hingegen über die spezifische Rezeptorbindung erfolgte. Die vielversprechenden *ex vivo*-Ergebnisse in der Leber sowie die gute Bindung an Tumorzellen macht CD49e als Zielmolekül für Tumor-Targeting daher besonders attraktiv. Die Sekundäantikörper-DOX-ILP zeigten eine mit dem Primäantikörper vergleichbar gute Bindung an Tumorzellen. Die Auswertung des Zellviabilitätsassays lässt jedoch keinen Vorteil der spezifisch beschichteten DOX-ILP gegenüber Isotyp-DOX-ILP in der Reduktion der Zellviabilität erkennen. Dies liegt

möglicherweise an einer aus der Summe spezifischer und unspezifischer Effekte resultierenden DOX-ILP-Zytotoxizität. Unspezifische Effekte sind dabei so stark, dass sie die spezifischen maskieren. Eine andere denkbare Erklärung ist die unzureichende Internalisierung der ansonsten gut gebundenen Partikel. Für Zellen des Kolonkarzinoms konnte beispielsweise *in vitro* eine größenabhängige Endozytierung von PEGylierten Liposomen (40,6-276,6 nm) nach 15- und 60-minütiger Inkubation bei 37 °C gezeigt werden, wobei große Liposomen signifikant schlechter aufgenommen wurden als kleine (Andar *et al.*, 2014). Desweiteren kann liposomal verabreichtes DOX erst nach Degradation der liposomalen Hülle wirken, wofür in der Regel die intrazelluläre lysosomale Aufnahme des Liposoms notwendig ist (Hillaireau und Couvreur, 2009). In Abhängigkeit der Liposomengröße werden jedoch unterschiedliche Signalwege der Endozytose aktiviert. Andar *et al.* (2014) konnten in ihrem Modell zeigen, dass bevorzugt kleinere Liposomen (40,6 und 72,3 nm) verstärkt lysosomal verarbeitet wurden, während größere Liposomen (97,8 nm) v.a. initial vermehrt im endosomalen Kompartiment detektierbar waren und auch nach 1 h nur geringere lysosomale Akkumulation zeigten, verglichen mit den kleineren Partikeln. Die Internalisierung von Liganden-beschichteten Liposomen erfolgt überwiegend über eine Clathrin-abhängige, Rezeptor-vermittelte Endozytose, was üblicherweise in lysosomaler Akkumulation resultiert (Bareford und Swaan, 2007; Mukherjee *et al.*, 1997). Zusätzlich zur Größe des Nanopartikels kann die Art des Zielmoleküls Einfluss auf den Signalweg und somit auf die Effizienz der Liposomen-Degradierung haben (Muro *et al.*, 2006). Für die Internalisierung von Integrin- $\alpha_v\beta_3$ - und $\alpha_v\beta_5$ -gerichteten Nanopartikeln konnte die Beteiligung des Clathrin-Signalwegs mit lysosomaler Degradierung des Partikels gezeigt werden (Kumar *et al.*, 2001; Muro, 2012). Da CD49e ebenfalls zu den Integrinen gehört, kann vermutet werden, dass die Endozytose der hier verwendeten CD49e-gerichteten DOX-ILP auf dieselbe Weise erfolgt. Interessanterweise kann jedoch sogar die Wahl des exakten Zielepitops entscheidend für den Grad der Internalisierung sowie lysosomalen Akkumulation sein. Ein Grund ist die mögliche sterische Hinderung durch zu nah an der Zellmembran oder in der Grenzfläche zu Nachbarproteinen positionierte Epitope (Balyasnikova *et al.*, 2002; Muro, 2012). Obwohl beispielsweise monoklonale anti-PECAM-1-Antikörper in freier Form ein bestimmtes Epitop erfolgreich binden können, ist es möglich, dass sie in konjugierter Form aufgrund der sterischen Verhältnisse nicht in der Lage sind, gebundene Nanopartikel zur Zelloberfläche zu lokalisieren (Garnacho *et al.*, 2008). Für

endothelial exprimiertes PECAM-1 konnte weiterhin gezeigt werden, dass nicht alle Epitope nach Bindung des Liganden in der Lage sind, Endozytose des Liganden-gebundenen Nanopartikels zu initiieren (Garnacho *et al.*, 2008). Weiterhin führte die Bindung „internalisierbarer“ Epitope zum Transport des internalisierten Nanopartikels in unterschiedliche intrazelluläre Kompartimente (Endosomen versus Lysosomen) (Garnacho *et al.*, 2008). Die Größenanforderungen an funktionalisierte Nanopartikel bezüglich deren Bindung ihres Zielmoleküls können demzufolge von denen zur erfolgreichen Internalisierung und lysosomaler Degradierung abweichen und sind gleichzeitig abhängig vom gewählten Zielmolekül. Ob die Bindung des 5H10-27-Epitops von auf Hep55.1C exprimiertem Integrin- $\alpha_5\beta_1$ zur Endozytose und anschließender lysosomaler Akkumulation des funktionalisierten Nanopartikels führt, kann anhand der hier durchgeführten Studie nicht beantwortet werden und erfordert daher weitere Experimente. Möglicherweise wurden von Hep55.1C-Zellen aufgenommene DOX-ILP nicht ausreichend lysosomal degradiert, wodurch DOX seine Wirkung nicht optimal entfalten konnte, zumindest nicht bei den hier untersuchten Konzentrationen und Zeitpunkten.

Die Bindung sowie das zytotoxische Potential von ILP an CD49e-exprimierende Zellen über den sekundären Mechanismus zu untersuchen, steht vor dem Hintergrund der vermuteten günstigeren Bioverteilung von Sekundärantikörper-ILP nach lokoregionaler Applikation *in vivo*. Unter der Annahme, dass ca. 90% des Primärantikörpers über endotheliale Anreicherung am Tumorendothel konzentriert werden, steht nur ein kleiner Teil zur Anreicherung an den Endothelien anderer Organe zur Verfügung. Werden im direkten Anschluss Sekundärantikörper-ILP i.a. appliziert, liegt der Hauptteil des sich im Organismus befindlichen Antigens (Primärantikörper) am Tumorendothel vor. Auch wenn eine unspezifische ILP-Aufnahme durch Zellen des MPS so nicht verhindert werden kann, kommt es theoretisch zu drastischer Minimierung der spezifischen ILP-Bindung an normalen Endothelien. Über den sekundären Mechanismus der DOX-ILP-Bindung war der zytotoxische Effekt nach 48 h-Messung jedoch noch geringer als über den primären Mechanismus oder nach Isotyp-DOX-ILP-Inkubation. Bei der Inkubation mit Sekundärantikörper-DOX-ILP konnte teilweise sogar Zellproliferation beobachtet werden. Nach 96 h-Messung war hingegen ein mit dem primären Mechanismus vergleichbarer zytotoxischer Effekt auf Hep55.1C-Zellen zu beobachten. Eine Erklärung ist eine möglicherweise verlangsamte Kinetik der Internalisierung mit zunehmender Partikelgröße, wie es zumindest für parenchymale Zellen

beobachtet werden konnte (Brewer *et al.*, 1998). Die beschriebene Komplexität des Internalisierungsprozesses in Abhängigkeit der Epitopbindung ist bei einem zwischengeschalteten Antikörper möglicherweise noch umfangreicher. Generell scheint der sekundäre Mechanismus der DOX-ILP-Bindung keinen Vorteil gegenüber dem primären Mechanismus hinsichtlich der Reduktion der Zellviabilität zu haben. Daher wurde davon abgesehen, die ILP-Anreicherung am Endothel anhand des sekundären Mechanismus weiter zu verfolgen.

4.6 Übertragbarkeit des Konzepts der endothelialen Anreicherung auf Nanopartikel

Im Folgenden wurde *ex vivo* untersucht, ob das Prinzip der endothelialen Anreicherung monoklonaler Antikörper auf endothelgerichtete Nanopartikel anwendbar ist, wofür quantitative Analysen nach isolierter Leberperfusion vorgenommen wurden. In den Immunfluoreszenzanalysen unter statischen sowie Strömungsbedingungen zeigten beschichtete MNP per se ein schlechteres Bindungsvermögen als freier Antikörper. Für die hier verwendeten funktionalisierten Nanopartikel waren daher generell geringere Anreicherungsraten als für freien Antikörper zu erwarten.

Die prozentuale endotheliale Anreicherung beschichteter MNP war trotz niedriger Perfusionsgeschwindigkeit sehr gering und wahrscheinlich hauptsächlich unspezifischer Natur, da nur geringe Unterschiede zwischen Isotyp- und spezifisch beschichteten MNP detektierbar waren. Da zudem hierfür unPEGylierte MNP verwendet wurden, scheint eine unspezifische Aufnahme durch Lebermakrophagen wahrscheinlicher als durch spezifische Endothelbindung. Teilweise konnten rechnerisch auch negative Werte ermittelt werden. Dies liegt vermutlich an Unterschieden in der Extinktion von Perfusat und Pufferlösung. Bei der Absorptionsmessung liefert das Perfusat ein geringfügig stärkeres Hintergrundsignal als der verwendete Puffer, was bei sehr geringer endothelialer Anreicherung von MNP in der Leber unter Umständen in negativen Werten resultiert hat.

Die prozentuale Anreicherung von Isotyp-, CD31- und CD146-DOX-ILP war vergleichbar niedrig und unabhängig von der applizierten Perfusionsgeschwindigkeit. Bei Betrachtung der Einzelwerte war v.a. die große Streuung auffällig, insbesondere für CD31- und CD146-DOX-ILP. Auch hier gab es rechnerisch teilweise negative Werte. Die prozentuale Anreicherung von CD49e-DOX-ILP war hingegen stark signifikant gegenüber Isotyp-DOX-ILP

sowie nach Reduktion der Perfusionsgeschwindigkeit von 1 auf 0,5 ml/min. Dies spiegelt die Perfusionsgeschwindigkeits-abhängige endotheliale Anreicherung monoklonaler Antikörper sowie die Scherkraft-abhängige Endothelbindung beschichteter MNP wider. Für die Quantifizierung von DOX mussten die ILP stark verdünnt und mit Triton X-100 aufgebrochen werden, was wahrscheinlich zu einem Sensitivitätsverlust der Methode geführt hat. Vermutlich konnte sehr geringe DOX-ILP-Anreicherung in der Leber daher nicht zuverlässig erfasst werden.

Bei der *ex vivo*-Perfusion mit DOX-ILP wurde zusätzlich die Endothelspezifität der Bindung immunfluorimetrisch überprüft. Dabei konnte interessanterweise für alle drei endothelspezifischen DOX-ILP-Varianten eine endothelspezifische Bindung detektiert werden. Isotyp-DOX-ILP wurden hingegen nur Konglomerat-ähnlich im perfundierten Gewebe angereichert. Dieses unspezifische Signal war zudem bei fast allen, mit endothelspezifischen DOX-ILP perfundierten Gewebeproben zu beobachten. Zu beachten ist hierbei, dass nur ein bis zwei Segmente histologisch überprüft wurden und daher keine Aussage zur Homogenität der DOX-ILP-Verteilung in der gesamten Leber gemacht werden kann.

Einerseits zeigen die Ergebnisse eine endothelspezifische Bindung der mit spezifischen Antikörpern funktionalisierten Liposomen. Andererseits ist die für alle ILP-Varianten beobachtete Konglomerat-ähnliche ILP-Anreicherung unspezifisch und hauptsächlich auf die Endozytose durch Lebermakrophagen zurückzuführen. Diese auch als Kupffer-Zellen bezeichneten Zellen sind neben Makrophagen in der Milz hauptsächlich an der Eliminierung von Liposomen aus der Zirkulation durch das MPS beteiligt (Roerdink *et al.*, 1981). PEGylierung, wie hier vorhanden, resultiert zwar in einer reduzierten Kupffer-Zell-Aufnahme, die Funktionalisierung der Liposomen mit Antikörpern führt jedoch sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu verstärkter Endozytose durch diese Zellen (Derksen *et al.*, 1987; Kamps *et al.*, 2000). Die Orientierung der Antikörper auf der ILP-Oberfläche spielt dabei ebenfalls eine Rolle, da exponierte Fc-Fragmente besser durch den auf Kupffer-Zellen exprimierten Fc-Rezeptor gebunden werden können. Selbst bei Fc-gebundenen Antikörpern kann jedoch eine Interaktion zwischen ILP und Makrophagen erfolgen, wobei in diesem Fall, abhängig von der Oberflächenladung der ILP, die auf Kupffer-Zellen stark exprimierten Scavenger-Rezeptoren eine größere Rolle spielen (Goldstein *et al.*, 1979; Koning *et al.*, 2002).

Desweiteren wurde überprüft, ob sich die lokoregionale Applikation von ILP positiv auf deren Anreicherungsverhalten am Endothel auswirkt. *Ex vivo* wurde dazu eine unterschiedliche Gewebemasse (gesamte Leber oder RMS/RPS) mit ILP perfundiert. Die quantitative Analyse der *ex vivo*-ILP-Applikation bestätigte, dass der für monoklonale Antikörper beobachtete negative Zusammenhang zwischen der Masse des perfundierten Gewebes und lokaler Anreicherung auch für die hier untersuchten DOX-ILP zutrifft. Insbesondere für CD49e-DOX-ILP konnte dies deutlich gezeigt werden. Die Immunfluoreszenzanalysen zeigten zudem eine deutlich stärkere und homogenere Endothelbindung der CD146- und CD49e-DOX-ILP bei der Perfusion der geringeren Gewebemasse. Da die Visualisierung der ILP-Bindung über die Liposomen-assoziierten PEG-Ketten mithilfe einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung erreicht wurde, wurden zwei Kontrollen mitgeführt. Einerseits sollte ausgeschlossen werden, dass anti-PEG-Antikörper an anderen Molekülen außer PEG bindet. Dazu wurde eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung an unbehandelter Mausleber durchgeführt (Negativkontrolle). Andererseits musste die spezifische anti-PEG-Antikörperbindung durch den RPE-konjugierten anti-mouse IgG3-Sekundärantikörper sichergestellt werden. Dazu wurde CD146-ILP-perfundierte Mausleber nur mit Sekundärantikörper inkubiert (Sekundärantikörper-Kontrolle). Beide Kontrollen zeigten kein detektierbares Fluoreszenzsignal, wodurch eine spezifische Visualisierung der ILP-eigenen PEG-Ketten sichergestellt war. Wichtig zu beachten ist außerdem, dass RMS/RPS mit etwas höherer Geschwindigkeit (bezüglich Gewebemasse) als die gesamte Leber perfundiert wurde. Die Perfusion einer geringeren Masse führte demzufolge trotz höherer Scherkräfte zu höherer %ID/g. Isotyp-ILP wurden hingegen auch hierbei nur unspezifisch aufgenommen.

Die immunfluorimetrische Analyse nach lokoregionaler Applikation *in vivo* zeigte ebenfalls eine unspezifische ILP-Aufnahme durch Kupffer-Zellen, sowohl für Isotyp- als auch für CD146-DOX-ILP und unabhängig von der Applikationsart. Auch in der Milz konnte die endothelunspezifische Anreicherung verwendeter ILP durch Makrophagen detektiert werden. Diese Beobachtung unterstreicht den nicht zu unterschätzenden Effekt der ILP-Eliminierung durch das MPS und verdeutlicht, dass PEGylierung nicht zur vollständigen Unterdrückung dieses unerwünschten Effekts führt (Hamad *et al.*, 2010). Subjektiv betrachtet war die unspezifische ILP-Aufnahme stärker für Isotyp-, als für CD146-DOX-ILP, wobei dieser Effekt nach einer i.v.-CD146-DOX-ILP-Applikation stärker, als nach i.a.-Gabe

repräsentiert war. Für CD146-DOX-ILP konnte jedoch ebenfalls, unabhängig von der Applikationsart, eine spezifische Endothelbindung in der Leber sowie im Tumor detektiert werden. Homogen war die Tumorendothelanreicherung allerdings nur nach i.a.-Applikation von CD146-DOX-ILP. Nach systemischer Applikation konnte eine Anreicherung endothelspezifischer ILP nur in vereinzelt, in der Peripherie des Tumors liegenden Gefäßen beobachtet werden. Einerseits verdeutlicht dies die bereits beschriebene Problematik der ubiquitären Endothelexpression von CD146, die beim Targeting von pan-endothelialen Markern *in vivo* generell berücksichtigt werden muss. Andererseits zeigt es, dass die lokoregionale i.a.-Applikation von TEM-gerichteten ILP deutliche Vorteile hinsichtlich deren Anreicherung am Tumorendothel hat. Bei systemischer Applikation ist die Wahrscheinlichkeit für TEM-gerichtete ILP, das hauptsächlich arteriell versorgte Tumorendothel zu erreichen, stark reduziert: sowohl aufgrund spezifischer Endothelbindung in anderen Organen als auch aufgrund der Eliminierung durch das MPS. Bei lokoregionaler Applikation hingegen sind diese beiden Faktoren zwar nicht eliminiert, aber reduziert. Die geringeren Scherkräfte sowie die erhöhte Expression des TEM und damit erhöhte Avidität im Tumormikrozirkulationssystem wirken sich dabei positiv auf die Nanopartikel-Anreicherung am Tumorendothel aus (Thomann *et al.*, 2015).

PEGylierung dient, wie erwähnt, primär der Verhinderung der unerwünschten Nanopartikel-Eliminierung durch das MPS und damit der Verlängerung der Plasmahalbwertszeit. Gerade dieser Effekt wirkt sich bei Tumor-Targeting unter Ausnutzung des EPR-Effekts durch eine längere Zirkulationszeit des Makromoleküls positiv auf den Therapieverlauf aus. Endothelbasiertes Tumor-Targeting ist jedoch (1) nicht auf den EPR-Effekt angewiesen und ermöglicht (2) den funktionalisierten Nanopartikeln direkten Zugang zum Zielmolekül. Die erwähnte mögliche sterische Hinderung der Antigenbindung durch Nanopartikel-assoziierte PEG-Ketten hat daher die Frage aufgeworfen, inwiefern PEGylierung in diesem Fall überhaupt sinnvoll ist. So wurden in der Ratte 90 nm große Aco-HSA-funktionalisierte Liposomen nach systemischer Applikation *in vivo* nach nur wenigen Minuten zu 90% von der Leber mittels Scavenger-Rezeptor-vermittelter Endozytose aufgenommen (Kamps *et al.*, 1997; Scherphof *et al.*, 1997). Zwei Drittel der endozytierten Liposomen konnten dabei in LSEC, ein Drittel in Kupffer-Zellen nachgewiesen werden. Die verbliebenen 10% der Liposomen waren in Milz-assoziierten Makrophagen nachweisbar. Die Kopplung von PEG-Ketten auf die Liposomen-Oberfläche führte hingegen zu verlängerter

Zirkulationszeit im Blut durch die Hinderung der Liposomen-Rezeptorbindung (Scherphof *et al.*, 1997). Die Verwendung nicht-PEGylierter, positiv geladener Liposomen hat sich sowohl in experimentellen (Schmitt-Sody *et al.*, 2003; Strieth *et al.*, 2008) als auch ersten klinischen Studien (Fasol *et al.*, 2012; Lohr *et al.*, 2012) zur Verabreichung antiangiogener Arzneimittel mittels Tumorendothel-Targeting als wirksam erwiesen. Die positive Oberflächenladung führt dabei zu verstärkter Interaktion von Nanopartikel und Tumorendothel und verhindert damit einerseits die Penetration der Liposomen in die Tiefe des Tumors sowie andererseits deren erneute Verteilung mittels systemischer Zirkulation (Bertrand *et al.*, 2014).

Bei der Beurteilung der Immunfluoreszenzanalyse sind jedoch zwei Faktoren zu berücksichtigen. Erstens erfolgte die Visualisierung der DOX-ILP über eine RPE-Markierung der Liposomassoziierten PEG-Ketten. Eine absolute Aussage über die Lokalisation des Antikörpers sowie von DOX kann daher nur indirekt getroffen werden. PEGylierte Liposomen sind jedoch stabile Entitäten und zeigen in der hier verwendeten Komposition nahezu keine Freisetzung von DOX während der Zirkulation im Blutkreislauf (Gabizon *et al.*, 2003). Da die DOX-ILP in den hier durchgeführten *ex vivo*- und *in vivo*-Experimenten nur maximal 15 min zirkuliert sind und das Gewebe umgehend schockgefroren wurde, kann eine Dislokation von DOX und PEG nahezu ausgeschlossen werden. Da die Bindung von Streptavidin und Biotin außerdem hoch affin (Wilchek *et al.*, 2006) sowie die Bindung von Streptavidin und Antikörper ebenfalls sehr stabil ist (Innova Biosciences), sollte auch hierfür keine Dislokation nach so kurzer Zeit zu erwarten sein.

Zweitens ist die Bindung der DOX-ILP von deren Aufnahme durch Endothelzellen in Tumor und Leber zu unterscheiden. Auch darüber kann letztendlich keine Aussage anhand der hier durchgeführten Immunfluoreszenzanalyse gemacht werden.

Die beobachtete ILP-Aufnahme durch Kupffer-Zellen spielt nicht nur bei Isotyp-ILP, sondern auch bei endothelspezifischen ILP eine entscheidende Rolle für die Anreicherung in der Leber und wirkt sich unter Umständen auf die quantitative Analyse aus. Für die Übertragbarkeit des Konzepts der endothelialen Anreicherung muss daher die spezifische Endothelbindung gegenüber der unspezifischen Eliminierung durch das MPS überwiegen. Die generell guten und homogenen Ergebnisse der endothelialen Anreicherung von CD49e-DOX-ILP bei reduzierter Perfusionsgeschwindigkeit lassen darauf schließen, dass dies für diese ILP-Variante der Fall ist. Vor dem Hintergrund, dass ein auf dem Tumorendothel überexprimierter Marker zu erhöhter Avidität führt, in dilatierten Gefäßen der

Tumormikrozirkulation geringere Flussraten und damit reduzierte Scherkräfte zu erwarten sind und sich lokoregionale i.a.-Applikation *in vivo* als vorteilhaft erwiesen hat, scheint CD49e ein vielversprechender Marker, der für die weitere translationale Verwendung validiert werden soll.

Zur Optimierung der hier angewandten Methode mit Fokus auf die Reduktion der ILP-Eliminierung durch LSEC-Bindung und Kupffer-Zell-Endozytose, ist die Wahl der Partikelgröße ein Ansatzpunkt. Tumor-Targeting mittels Ausnutzung des EPR-Effekts stellt andere Anforderungen an die Partikelgröße als Endothel-gerichtetes Tumor-Targeting. Polymere Mizellen <100 nm zeigten beispielsweise eine bessere, EPR-basierte Tumorrakkumulation als größere Liposomen (Sutton *et al.*, 2007). Kleinere Makromoleküle fördern außerdem die Diffusion durch das Stroma in Richtung Tumorzelle (Dreher *et al.*, 2006). Ist hingegen das Endothel des Tumors das Ziel der funktionalisierten Nanopartikel, haben sich Partikel im Submikrometerbereich als vorteilhafter herausgestellt (Lee *et al.*, 2013). Vasculäres Targeting erfordert, dass die funktionalisierten Nanopartikel aus dem gefäßzentralen, erythrozytenhaltigen Blutstrom austreten, um in der „zellfreien Schicht“ entlang der Gefäßwand akkumulieren und anschließend mit möglichst hoher Affinität an ihrer endothelialen Zielstruktur binden zu können (Atukorale *et al.*, 2017). Die Studienlage zum Einfluss der Partikelgröße bezüglich deren Tendenz, sich in Endothelnähe überhaupt erst lokalisieren zu können, ist sehr divers. Eine der Hauptlimitationen ist allerdings, dass viele der entsprechenden Studien *in vitro* in Pufferlösung durchgeführt wurden. Das Ausmaß lateraler Partikelmigration kann beispielsweise anhand von hydrodynamischen Kräften, in Abhängigkeit von Größe, Form, Dichte sowie vorliegenden Scherkräften, erklärt werden (Lee *et al.*, 2009). Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass Zusammenstöße von Partikeln unterschiedlicher Größe, Form oder Flexibilität deren Verhalten im Entmischungsprozess stark und v.a. unterschiedlich beeinflussen können (Kumar und Graham, 2012). Ein Indiz dafür ist beispielsweise die Beobachtung, dass sich steifere Leukozyten und Thrombozyten besser in Endothelnähe lokalisieren können, als flexiblere Erythrozyten (Fedosov *et al.*, 2012; Zhao und Shaqfeh, 2011). Somit kann das Vermögen partikulärer Bestandteile, wie Nanopartikel, in der „zellfreien Schicht“ des Gefäßes zu akkumulieren, durch heterogene Kollisionen mit Erythrozyten stark beeinflusst werden (Charoenphol *et al.*, 2010; Kumar und Graham, 2012). Die erwähnte Studie von Lee *et al.* (2013) wurde *in vivo* sowie computergestützt durchgeführt und die Ergebnisse mit der erhöhten Tendenz kleiner

Nanopartikel (≤ 100 nm), bevorzugt zwischen den Erythrozyten im Zentrum des Gefäßes eingeschlossen zu bleiben, begründet. Größere Partikel im Submikrometerbereich (500-1000 nm) werden durch Kollision mit Erythrozyten hingegen effektiver in die endothelnahe zellfreie Schicht gestoßen.

Generell muss der Zweck der Applikation funktionalisierter Nanopartikel berücksichtigt werden. Ist reine mikroskopische Bildgebung das Ziel, ist die effektive Partikelanreicherung am Endothel im experimentellen Setting unter Umständen schon ausreichend und die Verwendung von Mikrosphären vorteilhaft. Die Bindungseffizienz endothelgerichteter, therapeutischer Nanopartikel stellt jedoch ein Zusammenspiel dar aus (1) deren Vermögen, aus dem Blutstrom zum Endothel zu gelangen und zu binden, sowie (2) ausreichend lang zu binden, um ihr geladenes Therapeutikum freizusetzen oder von der gebundenen Endothelzelle internalisiert zu werden. Mikrosphären zeigen zwar Vorteile hinsichtlich (1), sind aufgrund ihrer Größe jedoch höheren Scherkräften ausgesetzt und zeigen daher eine verringerte Adhäsionseffizienz (Charoenphol *et al.*, 2010). Die Wahl größerer Partikel (>230 nm) konnte in der Ratte zumindest eine unerwünschte Endozytose durch LSEC unter physiologischen Bedingungen reduzieren, was jedoch eine erhöhte Kupffer-Zell-Aufnahme zur Folge hatte (Kamps *et al.*, 1997; Shiratori *et al.*, 1993). Möchte man einen Therapieeffekt durch Tumorendothelzell-Targeting bewirken, muss aber die Endozytose durch Endothelzellen im Tumor gewährleistet bleiben. Hierbei erfährt der bereits diskutierte Einfluss von Scherkräften auf das Bindungsvermögen multivalenter Nanopartikel eine neue Dimension. Für die Endozytose 200 nm großer, anti-CD31-gerichteter Nanopartikel konnte *in vitro* gezeigt werden, dass sich chronisch applizierte Scherkräfte negativ, akut applizierte hingegen positiv auf die Internalisierung über die CAM-vermittelte Endozytose der Partikel auswirkt (Han *et al.*, 2012). Dabei waren Nanopartikel mit hoher Avidität jedoch weniger sensibel. Dies ist eine wichtige Beobachtung, da sich die Effizienz der intrazellulären Verabreichung von Nanopartikel-assoziierten Therapeutika somit in verschiedenen Segmenten der Mikrozirkulation unterscheiden kann (Han *et al.*, 2012). Die Berücksichtigung der Mikromilieucharakteristika ist demnach bei der experimentellen Modellierung zur Evaluierung von Nanopartikel-basierten Modellen sehr wichtig. Die Wahl der optimalen Partikelgröße ist daher sehr komplex, stellt aber einen wichtigen Aspekt des Nanopartikel-basierten Targetings dar und ist deshalb in Abb. 40 zum besseren Verständnis dargestellt.

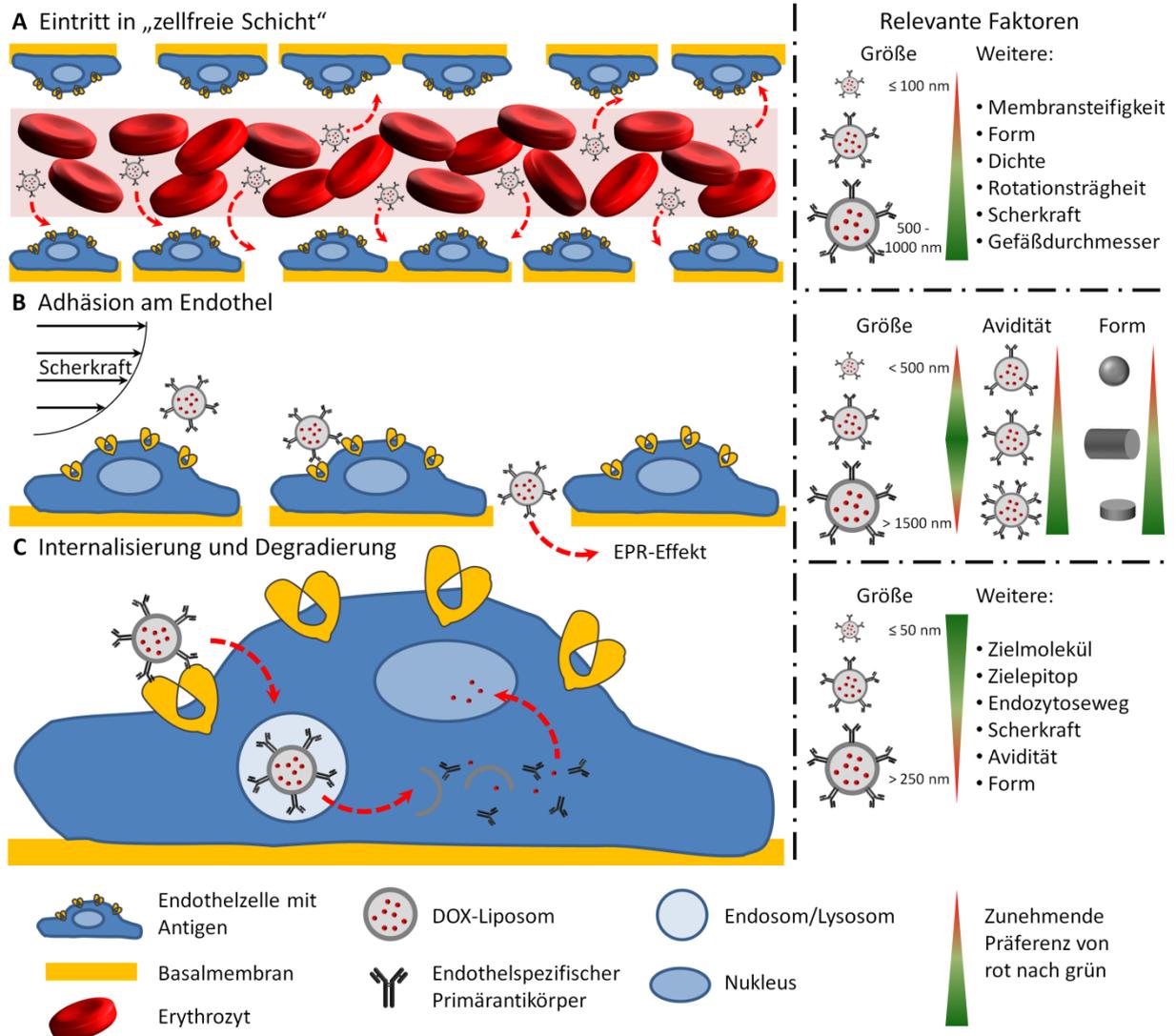


Abb. 40: Optimales Partikeldesign – eine komplexe Angelegenheit. Die Abbildung stellt die notwendigen Etappen für die endotheliale Anreicherung (A-B) sowie die therapeutische Applikation (A-C) am Beispiel endothelspezifischer DOX-ILP dar und geht dabei auf die, den jeweiligen Prozess beeinflussende, Faktoren ein. Größenangaben in (A) beziehen sich auf Mikrogefäße. Avidität (B-C) kann nicht nur durch die Ligandendichte, sondern auch durch die Ligandengröße sowie die Wahl mehrerer unterschiedlicher Liganden beeinflusst werden. Größenrelationen wurden in den Abbildungen nicht beachtet.

Ein weiterer möglicher Ansatz zur Reduzierung der unerwünschten Nanopartikel-Eliminierung durch das MPS ist direktes Kupffer-Zell-Targeting. Im Mausmodell reduzierte die, vor der Nanopartikel-Verabreichung durchgeführte, Gabe des Anti-Malariamittels Chloroquin effektiv die Endozytose harter und weicher Nanopartikel durch Kupffer-Zellen (Wolfram *et al.*, 2017). Gleichzeitig war eine erhöhte tumor- bzw. Zielorgan-spezifische Nanopartikel-Anreicherung zu beobachten. Da eine dauerhafte Kupffer-Zell-Inhibierung jedoch toxisch oder sogar tödlich sein (Li *et al.*, 2016) bzw. einen erheblich negativen Einfluss

auf das Immunsystem haben kann, ist es wichtig, diese nur vorübergehend durchzuführen (Wolfram *et al.*, 2017). Eine weitere Methode ist die Sättigung der phagozytotischen Aktivität des MPS mittels Verabreichung von unbeladenen Liposomen (0,3-3 μm) vor der Gabe der Arzneimittel-transportierenden Nanopartikel (25 nm) (Liu *et al.*, 2015). Für den Grad der Tumorakkumulierung und des therapeutischen Effekts nach Vorbehandlung von Kupfer-Zellen scheint jedoch sowohl die Größe der Nanopartikel (zur Vorbehandlung verwendete und therapeutische) als auch die Materialkomposition, das Applikationsregime sowie der Tumortyp entscheidend zu sein (Liu *et al.*, 2015; Tavares *et al.*, 2017). Interessanterweise zeigten Tavares *et al.* (2017) außerdem, dass trotz vollständiger Kupfer-Zell-Eliminierung eine Nanopartikel-Akkumulierung im Tumor von nur maximal 2% erreicht werden konnte. Dies lässt einen geringeren Stellenwert der Lebermakrophagen in der Nanopartikel-Eliminierung vermuten, als erwartet und unterstreicht die Wichtigkeit, ein besseres Verständnis der Beteiligung anderer Organe auf Organ-, Zell- und Molekularebene in diesem Kontext zu erlangen (Tavares *et al.*, 2017).

4.7 Therapeutisches Potential lokoregional applizierter DOX-ILP

Vor dem Hintergrund potenzieller Therapiestudien gilt es zu evaluieren, ob hier verwendete CD49e-DOX-ILP nach lokoregionaler i.a.-Applikation ein therapeutisches Potential haben. Dabei muss jedoch Tumorzell-Targeting von Tumorendothel-Targeting unterschieden werden. Für beide Varianten gibt es experimentelle Studien mit liposomalem DOX, ohne bzw. mit assoziierten Liganden. Aufgrund der Prozedur der lokoregionalen i.a.-Applikation ist für diesen Ansatz eine Einmal- gegenüber Mehrfachapplikation zu bevorzugen. Da die verwendeten Mäuse im Durchschnitt 25 g wiegen und man tierschutzrechtlich maximal 100 μl für eine Bolusinjektion verwenden darf, steht mit den hier verwendeten DOX-ILP (0,068 mg DOX/ml ILP-Lösung) bei einmaliger Applikation eine Dosis von 0,27 mg/kg Körpergewicht zur Verfügung. Bei dem Vergleich anderer tierexperimenteller Studien, in denen DOX-Liposomen für Tumor(endothel)-Targeting verwendet wurden, war das sehr heterogene Therapieregime auffällig. Studien mit einmaliger Injektion von DOX-Liposomen sind eher selten und in der Regel entweder mit lokoregionaler Applikation oder einer lokalen Maßnahme anderer Art (z.B. lokale Hyperthermie) assoziiert. In einem Kolonkarzinom-Modell mit Lebermetastasen führte die einmalige, lokoregionale Applikation von galactosylierten DOX-Liposomen (6 mg/kg; 130,5 nm) zu reduziertem Tumorwachstum

in der Leber sowie mesenterischen Lymphknoten, während systemische Applikation einen weniger starken Effekt hervorrief (Zhao *et al.*, 2013). Die lokoregionale Applikation erfolgte dabei mittels Injektion in die Milz zur Simulation der Pfortader-Perfusion. Das Ziel der Liposomen-Konjugation mit β -D-Galactose war die Bindung des von Hepatozyten exprimierten Asialoglykoprotein-Rezeptors (Zhao *et al.*, 2013). In einer anderen Studie führte die einmalige, intratumorale (Fibrosarkom, perkutan) Applikation von großen DOX-Liposomen (7,5 mg/kg; 1-10 μ m) zu deutlicher Reduktion des Tumolvolumens sowie verlängertem Überleben im Vergleich zu systemischer Applikation (Idani *et al.*, 2000). In beiden Studien wurde Tumorzell-Targeting betrieben und es konnte keine Schädigung von Organen des MPS detektiert werden. Die jeweils verwendete minimal effektive DOX-Dosis ist jedoch wesentlich höher, als die für diese Studie zur Verfügung stehende.

Experimentelle Studien zum Tumorendothel-Targeting mittels funktionalisierten DOX-Liposomen existieren ebenfalls. Dabei zeigten mit anti-VEGFR-2-Fab'-Fragment-funktionalisierte DOX-PEG-ILP in mehreren Tumormodellen eine erfolgreiche Reduktion der Tumorprogression nach systemischer Applikation anhand ihres antiangiogenen Effekts. Das Applikationsregime war jedoch sehr unterschiedlich. In einem Mausmodell mit subkutan applizierten murinen HCC-Zellen war ein antitumorigener Effekt nur in sehr kleinen Tumorkläsionen nachweisbar (10 \times 1 mg/kg; 130-170 nm) (Roth *et al.*, 2007). Die Autoren argumentierten dies damit, dass die Art der Reaktion des Endotheliums auf zytotoxische Substanzen dem Zusammenspiel von Endothelzellen und Perizyten zugeschrieben wird, wobei die Anzahl der Perizyten in murinen Tumorblutgefäßen mit dem Grad der Reifung und Differenzierung steigt (Gee *et al.*, 2003). Diese Art der antiangiogenen ILP-Therapie ist nach Meinung von Roth *et al.* (2007) daher vermutlich am effektivsten gegen kleine, neugebildete Mikrometastasen. In einer anderen Studie mit stark abweichendem Applikationsregime (4 \times 5 mg/kg; 100-200 nm) waren die beschriebene Effekte in gut vaskularisierten transgenen Mausmodellen des Mamma- sowie Pankreaskarzinoms jedoch, unabhängig von der TumorgroÙe, deutlich ausgeprägter als in einem weniger gut durchbluteten Kolonkarzinom-Xenograft-Modell (Wicki *et al.*, 2012). HCC ist ebenfalls ein gut vaskularisierter Tumor, weshalb eine antiangiogene Therapie mit endothelgerichteten DOX-ILP erfolgversprechend ist. Der Vergleich dieser Studien verdeutlicht, dass die optimale Wahl der applizierten DOX-Dosis individuell auf das Modell abgestimmt werden muss, wobei die Art der Applikation (systemisch versus lokoregional) sowie die Form der DOX-Liposomen-

Verabreichung (ohne versus mit Ligand) nur zwei einer Vielzahl verschiedener Parameter darstellen.

Da für Therapiestudien Tumorendothel-Targeting über Integrin- $\alpha_5\beta_1$ ein hohes Potential haben könnte, ist es interessant festzustellen, dass es für andere Integrine bereits erfolgversprechende Studien gibt. So wurde in einem murinen Kolonkarzinommodell (subkutane Zellinokulation) eine erfolgreiche Reduktion der Tumorprogression mit einmalig i.v. applizierten, RGD-funktionalisierten DOX-PEG-Liposomen (10 mg/kg; 100 nm) erreicht, obwohl eine zu den Kontrollgruppen vergleichbar hohe Substanzakkumulation im Tumorgewebe (ca. 6 %ID/g) detektierbar war (Schiffelers *et al.*, 2003). Tumorendothel-Targeting erfolgte hierbei über die Integrin- $\alpha_v\beta_3$ -Bindung. Hinsichtlich der Toxizität gegenüber normalen Organen wurde keine Angabe gemacht, obwohl RGD-Liposomen stärker in Leber und Milz akkumulierten, als die Liposomen der beiden Kontrollgruppen. Ein interessanter Aspekt ist, dass die verwendeten murinen Kolonkarzinomzellen nicht sensitiv gegenüber DOX sind, zumindest nach Einschätzung von Schiffelers *et al.* (2003), da nach 24-stündiger Inkubation mit 6,9 μM freiem DOX noch 50% viable Zellen detektiert werden konnten. Der beobachtete antitumorogene Effekt ist nach Meinung der Autoren daher sehr wahrscheinlich auf die Inhibierung der Tumorprogression durch die antiangiogene Wirkung der Integrin- $\alpha_v\beta_3$ -gerichteten Liposomen zurückzuführen. Bei den hier verwendeten Hep55.1C-Zellen war 50%ige Zellviabilität jedoch nach 24-stündiger Inkubation mit ca. 0,94 μM freiem DOX erreicht. Diese Tumorzellen sind demzufolge wesentlich sensitiver gegenüber diesem Chemotherapeutikum. Bei lokoregionaler i.a.-Applikation von CD49e-DOX-ILP kann daher trotz sehr geringer DOX-Konzentration unter Umständen ein therapeutischer Effekt beobachtet werden, v.a. unter dem Gesichtspunkt, dass das Tumor-Targeting in diesem Modell auf zwei Wegen stattfinden kann: (1) mittels Targeting der CD49e-exprimierenden, DOX-sensitiven Endothelzellen und (2) mittels unspezifischem EPR-Effekt und anschließendem Targeting der CD49e-exprimierenden, DOX-sensitiven Hep55.1C-Tumorzellen.

Eine Möglichkeit der Optimierung von Tumorendothel-Targeting zur Therapie solider Tumoren ist die Wahl größerer Nanopartikel mit Tumorendothel-spezifischen Liganden zur Reduktion des EPR-Effekts und gleichzeitig verbesserter Avidität zum Tumorendothel. In einer experimentellen Studie zur Therapie von DOX-resistentem Nierenzellkarzinom im Xenograft-Mausmodell nutzten Kibria *et al.* (2013) RGD-funktionalisierte DOX-PEG-

Liposomen für Tumorendothel-Targeting über Integrin- $\alpha_v\beta_3$. Dabei resultierte die systemische Injektion ($3 \times 1,5$ mg/kg) von 330 nm-DOX-Liposomen in einer signifikant besseren Tumolvolumen-Reduktion als die 120 nm große Variante sowie DOXIL (Kibria *et al.*, 2013). Diese Beobachtung begründen die Autoren mit einem wesentlich effizienteren antiangiogenen Effekt für 330 nm-Liposomen und folgender Apoptose von Angiogenese-abhängigen Tumorzellen. Für das Targeting DOX-sensitiver Tumorendothelzellen benötigt man außerdem geringere Mengen des Chemotherapeutikums als für das Targeting DOX-resistenter Tumorzellen (Kibria *et al.*, 2013).

Eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung des hier vorgestellten Konzepts ist die Erhöhung der Avidität von CD49e-DOX-ILP zum Tumorendothel, was sowohl für die Bindung als auch möglicherweise für die Internalisierung von Vorteil wäre. Dies kann beispielsweise durch die Herstellung von Nanopartikeln mit mehr als einem Ligandentyp erreicht werden, was zur Bindung mehrerer Rezeptoren oder sogar Zelltypen führen kann. Dreifachfunktionalisierte Nanopartikel (ICAM-1, PECAM-1, VCAM-1; ca. 250 nm) zeigten beispielsweise wesentlich verbessertes Targeting und Internalisierung über die Kombination unterschiedlicher Endozytose-Signalwege (Papademetriou *et al.*, 2014). Eine andere, bisher für PECAM-1 gezeigte Methode (CEPAL) nutzt die Bindung benachbarter Epitope desselben Antigens, was zur Änderung dessen Konformation und damit besserer Erreichbarkeit des zweiten Epitops führt (Chacko *et al.*, 2012). Für entsprechend funktionalisierte Nanopartikel (ca. 200 nm) führt dies zu wesentlich verbesserter Bindung und Internalisierung (Chacko *et al.*, 2015).

4.8 Klinische Relevanz der vorliegenden Studie

Der hier vorgestellte gefäßgerichtete Ansatz gilt primär der Substanzanreicherung am Tumorendothel. Unter Voraussetzung der lokoregionalen Applikation und in Abhängigkeit der Wahl des Targets zeigt das Prinzip der endothelialen Anreicherung somit Potential für (1) bildgebende Verfahren oder Therapie mittels Radioimmunkonjugaten und (2) antiangiogene Therapie mit monoklonalen Antikörpern oder funktionalisierten Nanopartikeln.

Die *in vivo*-Bioverteilungsstudie mit radioaktiv markiertem anti-CD146 zeigte die erfolgreiche Reduktion dessen Eintritts in die systemische Zirkulation. Die Kombination von lokoregionaler Applikation und Anwendung des Prinzips endothelialer Anreicherung könnte so die beschriebene Problematik unerwünschter Wirkungen beim Targeting panendothelialer

Marker mindern. Zudem hat endotheliale Anreicherung somit nicht nur Potential für die Therapie des intraarteriell zugänglichen HCC, sondern auch für primär arteriell versorgte Lebermetastasen (Breedis und Young, 1954) und möglicherweise sogar andere, lokoregional zugängliche Tumorentitäten. Dazu gehören beispielsweise das Nierenzellkarzinom (Guan *et al.*, 2013; Kocak *et al.*, 2001) sowie Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches, z.B. das Plattenepithelkarzinom der Zunge (Damascelli *et al.*, 2003; Mitsudo *et al.*, 2018).

Weiterhin könnte das Prinzip der endothelialen Anreicherung im Kontext von TACE relevant sein. Die beschriebene sekundäre Revaskularisierung des Tumors nach initialer Embolisierung könnte durch kombinierte Gabe von Chemotherapeutika (z.B. DOX) und antiangiogener Substanz (z.B. Volociximab, Sorafenib) verlangsamt werden (Pinter *et al.*, 2012). Die bei der Anwendung endothelialer Anreicherung zu erwartende homogenere und auch tiefer liegende, kleine Blutgefäße erreichende Verteilung der Targeting-Substanz wäre hierbei von Vorteil. Vor diesem Hintergrund stellt das vorgestellte Prinzip möglicherweise auch für SIRT eine gute Alternative oder Ergänzung dar.

In der vorliegenden Studie wurden verschiedene endothelspezifische Antikörperklone anhand ihrer Bindungsdynamik für die Analyse der Anreicherungsmechanismen am Endothel im Mausmodell selektiert. Um die Übertragbarkeit der Ergebnisse in die humane Situation zu gewährleisten, wurde ein Vergleich mit, gegen dieselben Endothelmarker gerichteten, humanen Antikörpern an HCC-Präparaten sowie humaner Leber durchgeführt. Das mit Abstand höchste Translationspotential der untersuchten Antikörperklone hinsichtlich Bindungsdynamik zeigten Volociximab sowie NKI-SAM-1, zwei anti-CD49e-Antikörperklone. Insbesondere vor dem Hintergrund, dass Volociximab ein in der Klinik bereits getesteter monoklonaler Antikörper ist, könnte diesem und anderen anti-CD49e-Antikörpern mithilfe des Konzepts der endothelialen Anreicherung neue Bedeutung zukommen. (1) Das antiangiogene Potential von anti-CD49e-Antikörpern könnte durch Optimierung des Dosisregimes und Applikationswegs effizienter ausgenutzt werden. (2) Anti-CD49e-Antikörper könnten als endothelspezifische Liganden für die Beschichtung von DOX-Liposomen verwendet werden. Gegen CD49e gerichtete, funktionalisierte Nanopartikel haben in der Klinik bis jetzt noch keine Anwendung erfahren. Die kombinierte Anreicherung therapeutisch wirksamer Partikel (DOX-Liposomen) und einer antiangiogenen Substanz (Integrin- $\alpha_5\beta_1$ -Inhibitor) scheint jedoch ein vielversprechender Therapieansatz. Ersteres erfordert die Partikelendozytose durch Tumorendothelzellen. Die Wahl eines

internalisierbaren Liganden ist daher entscheidend und kann vor Nanopartikeldesign überprüft werden (Xiao *et al.*, 2012). Da die meisten Tumorzellen multiple Resistenzen aufweisen, Endothelzellen hingegen in der Regel sensibel gegenüber Chemotherapeutika sind, weist das Prinzip der endothelialen Anreicherung ein hohes Potential für die Tumorthherapie auf. Eine erfolgreiche antiangiogene Wirkung erfordert außerdem einen inhibierenden Antikörper. Für den hier verwendeten Klon 5H10-27 trifft dies nicht zu (Parsons-Wingerter *et al.*, 2005). Trotz erfolgreicher endothelialer Anreicherung würde dieser Antikörper im Mausmodell daher keinen direkten antiangiogenen Effekt bewirken. Die Wahl eines anderen Antikörperklons wäre in diesem Fall erforderlich. Volociximab wirkt im Menschen hingegen mittels Rezeptorinhibierung antiangiogen (Ng *et al.*, 2010) und wäre ein möglicher erfolgversprechender Ligand. Eine erhöhte Expression sowie bessere luminale Erreichbarkeit des Markers in Tumorblutgefäßen, als in normalen würde den Erfolg der in (1) und (2) beschriebenen Szenarien begünstigen. Die zusätzliche Expression von CD49e auf HCC-Tumorzellen (Zhang *et al.*, 2015) hat unter Umständen einen positiven Effekt in Mosaik-Tumorgefäßen oder wenn entsprechend funktionalisierte Nanopartikel über den EPR-Effekt in das Tumorstroma gelangen.

Alternativ zum antiangiogenen Ansatz wäre hingegen die zusätzliche Fokussierung auf Therapeutika, die gefäßzerstörend wirken oder die Gerinnungskaskade im Tumor stören bzw. die Kombination dieser mit den oben genannten Ansätzen (Bieker *et al.*, 2009; Siemann *et al.*, 2017). Zahlreiche Systemansätze, wie Proteomik-Analyse, Phagen-Display-Bibliotheken oder großskalige, kombinatorische *High-throughput*-Nanopartikel-Synthese und -Auswahl, würden dabei das Screening nach neuen Target-Molekülen und -Vehikeln (Myerson *et al.*, 2015) erleichtern.

Schwierigkeiten bei der Übertragbarkeit experimenteller Studien mit Nanopartikeln in die Klinik sind beispielsweise die Verwendung immunstimulierender oder nicht mit der aktuellen Guten Herstellungspraxis im Einklang stehender Komponenten sowie Hürden bei der Implementierung wohldefinierter Chemie, Herstellung und Kontrollsysteme (Davis *et al.*, 2008). Die hier vorgenommene Wahl von Liposomen in einer Komposition, wie sie bereits in der Klinik zugelassen ist, ist für die Translation der Ergebnisse von Vorteil. Ob die Art der Beschichtung für die Anwendung im Menschen kompatibel ist, müsste hingegen genauer untersucht werden. Auch Unterschiede in der Hämodynamik sowie Plasmaproteinzusam-

mensetzung zwischen Maus und Mensch müssen bei der Translation der hier gewonnenen Ergebnisse berücksichtigt werden (Namdee *et al.*, 2015a; Namdee *et al.*, 2015b).

Die beschriebene fehlende Kontrolle der DOX-Freisetzung bei hier verwendeten Liposomen bringt möglicherweise Nachteile mit sich. Verwendung von DOX-Liposomen in modifizierter Form könnte diese umgehen. So untersucht eine aktuelle klinische Studie (OPTIMA Phase III-Studie – NCT02112656) das Potential des *Triggered-Release*-Mechanismus zur Therapie des HCC (van der Meel *et al.*, 2017). Die Wissenschaftler arbeiten dabei mit thermosensitiven DOX-Liposomen (ThermoDox), welche bei gezielter Applikation von RFA ihr geladenes Chemotherapeutikum im Tumor freisetzen sollen. Dieselben DOX-Liposomen werden in der TARDOX Phase I-Studie unter Verwendung von fokussiertem Ultraschall getestet (Lyon *et al.*, 2017).

Die Gesamtheit der hier präsentierten Ergebnisse hat somit Potential, zu effizienterem Tumor-Targeting und infolgedessen zu verbessertem progressionsfreiem Überleben oder therapiefreien Intervallen von Krebspatienten beizutragen.

4.9 Schlussfolgerung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Arbeit erstmals die Prinzipien der endothelialen Anreicherung nach lokoregionaler Applikation zur Erhöhung der lokalen Konzentration radioaktiv markierter Antikörper und Antikörper-beschichteter Nanopartikel in einem experimentellen *in vivo*-Modell analysiert hat.

Es wurden drei endothelspezifische Maus-Antikörperklone (CD49e (5H10-27), CD146 (ME-9F1), CD31 (390)) anhand ihrer günstigen Bindungsdynamik selektioniert und die Mechanismen der Antikörperanreicherung am Endothel *ex vivo* charakterisiert. Zudem wurde gezeigt, dass sich das Konzept und die Mechanismen der endothelialen Anreicherung auf beschichtete Nanopartikel übertragen lässt, unter der Voraussetzung, dass die Endothelanreicherung mittels spezifischer Antigenbindung über die unspezifische Eliminierung durch das MPS hinausgeht. Die vielversprechendsten Ergebnisse konnten dabei für anti-CD49e (5H10-27)-beschichtete Liposomen erzielt werden. Zudem haben untersuchte anti-CD49e-Antikörper das stärkste Translationspotential.

Das Konzept der endothelialen Anreicherung zeigt hohes Potential, einen nennenswerten Beitrag zum Targeting hepatischer Tumore liefern zu können, da die Substanzapplikation über die *A. hepatica* für diese Tumorlokalisation bereits zur klinischen Routine gehört.

Insbesondere die erhebliche Reduktion des Antikörper-Eintritts in die systemische Zirkulation kann zur Minimierung unerwünschter Wirkungen beitragen. Auch für andere, lokoregional zugängliche Tumoren ist das vorgestellte Konzept von potentieller Bedeutung. In diesem Kontext sollten neben CD49e weitere gegen humane TEM gerichtete, schnell bindende Antikörper selektioniert werden.

Durch die Optimierung der mit endothelspezifischen Antikörpern beschichteten ILP hinsichtlich Größe, Avidität und Doxorubicin Gehalt scheint zudem eine Therapiestudie im murinen HCC-Modell möglich. Beim Einsatz beschichteter Nanopartikel in der Klinik ist das Ziel der Anwendung hinsichtlich der Wahl optimaler Eigenschaften entscheidend, da die ausschließliche endotheliale Anreicherung vom therapeutischen Anspruch mit Nanopartikel-Internalisierung und -Degradierung zu unterscheiden ist.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Fragestellung

Die vorliegende Arbeit geht der Fragestellung nach, anhand welcher Mechanismen eine zielgerichtete, lokale Substanzanreicherung mithilfe von endothelspezifischen Antikörpern und Antikörper-beschichteten Nanopartikeln am Endothel der Leber sowie in experimentellen Lebertumoren erfolgt.

Ergebnisse

Endothelspezifische Antikörper werden durch eine unterschiedliche Dynamik der Endothelbindung charakterisiert. Anti-CD31-, anti-CD146- sowie anti-CD49e-Antikörper konnten als schnell bindende Antikörper im Mausmodell selektioniert werden. Dabei ist die quantitative Dynamik der Antikörperbindung unabhängig vom Gewebetyp, kann jedoch durch Konjugation des Antikörpers stark beeinträchtigt werden. Es konnte eine nahezu vollständige Retention dieser schnell bindenden Antikörper bei der ersten intravaskulären Passage *ex vivo* gezeigt werden. Die Effizienz der endothelialen Anreicherung ist zwar Antikörperdosis-unabhängig, wird jedoch durch die Perfusionsgeschwindigkeit beeinflusst und durch wiederholte oder Langzeitinjektion beeinträchtigt. Bei dem Prinzip der endothelialen Anreicherung besteht außerdem ein negativer Zusammenhang zwischen der Masse des perfundierten Gewebes und lokaler Antikörperkonzentration. Lokoregionale Applikation *in vivo* begünstigt zusätzlich eine hohe intratumorale Antikörperakkumulierung. Die Bindung der mit endothelspezifischen Antikörpern beschichteten magnetischen Nanopartikel und Liposomen am Endothel ist spezifisch, jedoch substantiell schlechter als die Antikörperbindung und wird zusätzlich durch Scherkräfte beeinträchtigt. Der zytotoxische Einfluss Doxorubicin-haltiger CD49e-Immunoliposomen auf murine Tumorzellen ist, trotz spezifischer Bindung und effizienter Anreicherung, nur bei hoher Konzentration nachweisbar. Die Perfusionsgeschwindigkeits-abhängige endotheliale Anreicherung, der negative Zusammenhang zwischen der Masse des perfundierten Gewebes und lokaler Anreicherung sowie der Vorteil lokoregionaler Applikation für die Tumorendothelanreicherung *in vivo* konnte auch für Immunoliposomen gezeigt werden.

Diskussion

Alle hier getroffenen Aussagen sind nur für die untersuchten Antikörperklone sichergestellt. Das stärkste Translationspotential haben dabei die untersuchten anti-CD49e-Antikörper. Mit Tumorendothel-Targeting können klassische physiologische Barrieren des Tumorzell-Targetings umgangen werden. Klinik-übliche, hohe Dosierung sowie Nichtbeachtung des Injektionsregimes von Antikörper(-Arzneimittel-Konjugate)n verschleiert die Effizienz der endothelialen Anreicherung. Die Berechnung der halbmaximalen effektiven Konzentration der Antikörperbindung am histologischen Schnitt könnte als Parameter für die Antikörperselektion zur Anwendung der endothelialen Anreicherung verwendet werden. Die Auswahl optimaler Eigenschaften für eine effiziente endotheliale Anreicherung Antikörperbeschichteter Nanopartikel ist komplex, da diese von multiplen Parametern beeinflusst wird. Zudem darf die unspezifische Eliminierung der Partikel durch das Mononukleäre Phagozytensystem oder den Effekt erhöhter Permeabilität und Retention *in vivo* nicht vernachlässigt werden. Die geringe zytotoxische Wirkung des hier verwendeten liposomalen Doxorubicins ist womöglich durch suboptimale Wahl der Dosis und des Messzeitpunkts sowie die Komplexität des beteiligten Endozytosemechanismus zu erklären.

Schlussfolgerungen

Das Prinzip der endothelialen Anreicherung ist ein vielversprechender Ansatz, um einen endothelspezifischen, schnell bindenden Antikörper nach lokoregionaler Applikation effizient am Tumorendothel anzureichern und dessen Eintritt in die systemische Zirkulation erheblich zu reduzieren. Dies ist insbesondere für das Tumor-Targeting mit Radioimmunkonjugaten von Bedeutung und stellt sowohl für Diagnose als auch möglicherweise für die gezielte Therapie lokoregional zugänglicher Tumoren, wie das Hepatozelluläre Karzinom, eine Chance dar. Neben CD49e sollten weitere gegen humane Tumorendothelmarker gerichtete, schnell bindende Antikörper selektioniert werden. Durch die Optimierung der Immunoliposomen bezüglich Größe, Doxorubicingehalt und Avidität scheint eine Therapiestudie im murinen Modell des Hepatozellulären Karzinoms möglich. Beim Einsatz beschichteter Nanopartikel in der Klinik ist das Ziel der Anwendung hinsichtlich der Wahl optimaler Eigenschaften entscheidend, da die ausschließliche endotheliale Anreicherung vom therapeutischen Anspruch mit Nanopartikel-Internalisierung und -Degradierung zu unterscheiden ist.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Adriani, G., de Tullio, M. D., Ferrari, M., Hussain, F., Pascazio, G., Liu, X. und Decuzzi, P. (2012). **The preferential targeting of the diseased microvasculature by disk-like particles**. *Biomaterials* 33, 5504-5513, doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.04.027.
- Aird, W. C. (2009). **Molecular heterogeneity of tumor endothelium**. *Cell Tissue Res* 335, 271-281, doi: 10.1007/s00441-008-0672-y.
- Alazawi, W., Cunningham, M., Dearden, J. und Foster, G. R. (2010). **Systematic review: outcome of compensated cirrhosis due to chronic hepatitis C infection**. *Aliment Pharmacol Ther* 32, 344-355, doi: 10.1111/j.1365-2036.2010.04370.x.
- Alexis, F., Basto, P., Levy-Nissenbaum, E., Radovic-Moreno, A. F., Zhang, L., Pridgen, E., Wang, A. Z., Marein, S. L., Westerhof, K., Molnar, L. K. und Farokhzad, O. C. (2008). **HER-2-targeted nanoparticle-affibody bioconjugates for cancer therapy**. *ChemMedChem* 3, 1839-1843, doi: 10.1002/cmdc.200800122.
- Allemani, C., Weir, H. K., Carreira, H., Harewood, R., Spika, D., Wang, X. S., Bannon, F., Ahn, J. V., Johnson, C. J., Bonaventure, A., Marcos-Gragera, R., Stiller, C., Azevedo e Silva, G., Chen, W. Q., Ogunbiyi, O. J., Rachet, B., Soeberg, M. J., You, H., Matsuda, T., Bielska-Lasota, M., Storm, H., Tucker, T. C., Coleman, M. P. und Group, C. W. (2015). **Global surveillance of cancer survival 1995-2009: analysis of individual data for 25,676,887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2)**. *Lancet* 385, 977-1010, doi: 10.1016/S0140-6736(14)62038-9.
- Allen, T. M. (2002). **Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy**. *Nat Rev Cancer* 2, 750-763, doi: 10.1038/nrc903.
- Allen, T. M., Hansen, C., Martin, F., Redemann, C. und Yau-Young, A. (1991). **Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo**. *Biochim Biophys Acta* 1066, 29-36.
- Andar, A. U., Hood, R. R., Vreeland, W. N., Devoe, D. L. und Swaan, P. W. (2014). **Microfluidic preparation of liposomes to determine particle size influence on cellular uptake mechanisms**. *Pharm Res* 31, 401-413, doi: 10.1007/s11095-013-1171-8.
- Ansari, D. und Andersson, R. (2012). **Radiofrequency ablation or percutaneous ethanol injection for the treatment of liver tumors**. *World J Gastroenterol* 18, 1003-1008, doi: 10.3748/wjg.v18.i10.1003.
- Aprile, G., Ferrari, L., Cremolini, C., Bergamo, F., Fontanella, C., Battaglin, F., Rihawi, K., Lonardi, S., Loupakis, F. und Scartozzi, M. (2016). **Ramucirumab for the treatment of gastric cancers, colorectal adenocarcinomas, and other gastrointestinal malignancies**. *Expert Rev Clin Pharmacol* 9, 877-885, doi: 10.1080/17512433.2016.1182861.
- Atukorale, P. U., Covarrubias, G., Bauer, L. und Karathanasis, E. (2017). **Vascular targeting of nanoparticles for molecular imaging of diseased endothelium**. *Adv Drug Deliv Rev* 113, 141-156, doi: 10.1016/j.addr.2016.09.006.

- Azizi, A., Naguib, N. N., Mbalisike, E., Farshid, P., Emami, A. H. und Vogl, T. J. (2011). **Liver metastases of pancreatic cancer: role of repetitive transarterial chemoembolization (TACE) on tumor response and survival.** *Pancreas* 40, 1271-1275, doi: 10.1097/MPA.0b013e318220e5b9.
- Azzi, S., Hebda, J. K. und Gavard, J. (2013). **Vascular permeability and drug delivery in cancers.** *Front Oncol* 3, 211, doi: 10.3389/fonc.2013.00211.
- Bagalkot, V., Farokhzad, O. C., Langer, R. und Jon, S. (2006). **An aptamer-doxorubicin physical conjugate as a novel targeted drug-delivery platform.** *Angew Chem Int Ed Engl* 45, 8149-8152, doi: 10.1002/anie.200602251.
- Baluk, P., Morikawa, S., Haskell, A., Mancuso, M. und McDonald, D. M. (2003). **Abnormalities of basement membrane on blood vessels and endothelial sprouts in tumors.** *Am J Pathol* 163, 1801-1815, doi: 10.1016/S0002-9440(10)63540-7.
- Balyasnikova, I. V., Karran, E. H., Albrecht, R. F., 2nd und Danilov, S. M. (2002). **Epitope-specific antibody-induced cleavage of angiotensin-converting enzyme from the cell surface.** *Biochem J* 362, 585-595.
- Bardin, N., Frances, V., Lesaule, G., Horschowski, N., George, F. und Sampol, J. (1996). **Identification of the S-Endo 1 endothelial-associated antigen.** *Biochem Biophys Res Commun* 218, 210-216, doi: 10.1006/bbrc.1996.0037.
- Bareford, L. M. und Swaan, P. W. (2007). **Endocytic mechanisms for targeted drug delivery.** *Adv Drug Deliv Rev* 59, 748-758, doi: 10.1016/j.addr.2007.06.008.
- Barenholz, Y. (2012). **Doxil(R)--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned.** *J Control Release* 160, 117-134, doi: 10.1016/j.jconrel.2012.03.020.
- Bartlett, D. W., Su, H., Hildebrandt, I. J., Weber, W. A. und Davis, M. E. (2007). **Impact of tumor-specific targeting on the biodistribution and efficacy of siRNA nanoparticles measured by multimodality in vivo imaging.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 15549-15554, doi: 10.1073/pnas.0707461104.
- Baselga, J., Cortes, J., Kim, S. B., Im, S. A., Hegg, R., Im, Y. H., Roman, L., Pedrini, J. L., Pienkowski, T., Knott, A., Clark, E., Benyunes, M. C., Ross, G., Swain, S. M. und Group, C. S. (2012). **Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer.** *N Engl J Med* 366, 109-119, doi: 10.1056/NEJMoa1113216.
- Baxter, N. N., Fischer, H. D., Richardson, D. P., Urbach, D. R., Bell, C. M., Rochon, P., Brade, A. und Earle, C. C. (2018). **A Population-Based Study of Complications After Colorectal Surgery in Patients Who Have Received Bevacizumab.** *Dis Colon Rectum* 61, 306-313, doi: 10.1097/DCR.0000000000000966.
- Beck, A. und Reichert, J. M. (2014). **Antibody-drug conjugates: present and future.** *MAbs* 6, 15-17, doi: 10.4161/mabs.27436.
- Bell-McGuinn, K. M., Matthews, C. M., Ho, S. N., Barve, M., Gilbert, L., Penson, R. T., Lengyel, E., Palaparthi, R., Gilder, K., Vassos, A., McAuliffe, W., Weymer, S., Barton, J. und Schilder, R. J. (2011). **A phase II, single-arm study of the anti-alpha5beta1 integrin antibody volociximab as monotherapy in patients with platinum-resistant advanced epithelial ovarian or primary peritoneal cancer.** *Gynecol Oncol* 121, 273-279, doi: 10.1016/j.ygyno.2010.12.362.

- Bellon, E., Gebauer, F., Tachezy, M., Izbicki, J. R. und Bockhorn, M. (2016). **Pancreatic cancer and liver metastases: state of the art.** *Updates Surg* 68, 247-251, doi: 10.1007/s13304-016-0407-7.
- Benetti, A., Berenzi, A., Gambarotti, M., Garrafa, E., Gelati, M., Dessy, E., Portolani, N., Piardi, T., Giulini, S. M., Caruso, A., Invernici, G., Parati, E. A., Nicosia, R. und Alessandri, G. (2008). **Transforming growth factor-beta1 and CD105 promote the migration of hepatocellular carcinoma-derived endothelium.** *Cancer Res* 68, 8626-8634, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1218.
- Bertrand, N. und Leroux, J. C. (2012). **The journey of a drug-carrier in the body: an anatomophysiological perspective.** *J Control Release* 161, 152-163, doi: 10.1016/j.jconrel.2011.09.098.
- Bertrand, N., Wu, J., Xu, X., Kamaly, N. und Farokhzad, O. C. (2014). **Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology.** *Adv Drug Deliv Rev* 66, 2-25, doi: 10.1016/j.addr.2013.11.009.
- Besse, B., Tsao, L. C., Chao, D. T., Fang, Y., Soria, J. C., Almokadem, S. und Belani, C. P. (2013). **Phase Ib safety and pharmacokinetic study of volociximab, an anti-alpha5beta1 integrin antibody, in combination with carboplatin and paclitaxel in advanced non-small-cell lung cancer.** *Ann Oncol* 24, 90-96, doi: 10.1093/annonc/mds281.
- Bhargava, P., Kallakury, B. V., Ross, J. S., Azumi, N. und Bagg, A. (2007). **CD79a is heterogeneously expressed in neoplastic and normal myeloid precursors and megakaryocytes in an antibody clone-dependent manner.** *Am J Clin Pathol* 128, 306-313, doi: 10.1309/UXC DG9PWN7G89Y54.
- Bhaskar, V., Fox, M., Breinberg, D., Wong, M. H., Wales, P. E., Rhodes, S., DuBridg e, R. B. und Ramakrishnan, V. (2008). **Volociximab, a chimeric integrin alpha5beta1 antibody, inhibits the growth of VX2 tumors in rabbits.** *Invest New Drugs* 26, 7-12, doi: 10.1007/s10637-007-9078-z.
- Bieker, R., Kessler, T., Schwoppe, C., Padro, T., Persigehl, T., Bremer, C., Dreischaluck, J., Kolkme yer, A., Heindel, W., Mesters, R. M. und Berdel, W. E. (2009). **Infarction of tumor vessels by NGR-peptide-directed targeting of tissue factor: experimental results and first-in-man experience.** *Blood* 113, 5019-5027, doi: 10.1182/blood-2008-04-150318.
- Bishayee, A. und Darvesh, A. S. (2012). **Angiogenesis in hepatocellular carcinoma: a potential target for chemoprevention and therapy.** *Curr Cancer Drug Targets* 12, 1095-1118.
- Boso, D. P., Lee, S. Y., Ferrari, M., Schrefler, B. A. und Decuzzi, P. (2011). **Optimizing particle size for targeting diseased microvasculature: from experiments to artificial neural networks.** *Int J Nanomedicine* 6, 1517-1526, doi: 10.2147/IJN.S20283.
- Bouchahda, M., Levi, F., Adam, R. und Rougier, P. (2011). **Modern insights into hepatic arterial infusion for liver metastases from colorectal cancer.** *Eur J Cancer* 47, 2681-2690, doi: 10.1016/j.ejca.2011.06.037.
- Braet, F. und Wisse, E. (2002). **Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review.** *Comp Hepatol* 1, 1.

- Breedis, C. und Young, G. (1954). **The blood supply of neoplasms in the liver.** *Am J Pathol* 30, 969-977.
- Breier, G., Grosser, M. und Rezaei, M. (2014). **Endothelial cadherins in cancer.** *Cell Tissue Res* 355, 523-527, doi: 10.1007/s00441-014-1851-7.
- Brewer, J. M., Tetley, L., Richmond, J., Liew, F. Y. und Alexander, J. (1998). **Lipid vesicle size determines the Th1 or Th2 response to entrapped antigen.** *J Immunol* 161, 4000-4007.
- Bruix, J., Sherman, M. und American Association for the Study of Liver, D. (2011). **Management of hepatocellular carcinoma: an update.** *Hepatology* 53, 1020-1022, doi: 10.1002/hep.24199.
- Bruix, J., Sherman, M. und Practice Guidelines Committee, A. A. f. t. S. o. L. D. (2005). **Management of hepatocellular carcinoma.** *Hepatology* 42, 1208-1236, doi: 10.1002/hep.20933.
- Burke, P. A., DeNardo, S. J., Miers, L. A., Lamborn, K. R., Matzku, S. und DeNardo, G. L. (2002). **Cilengitide targeting of alpha(v)beta(3) integrin receptor synergizes with radioimmunotherapy to increase efficacy and apoptosis in breast cancer xenografts.** *Cancer Res* 62, 4263-4272.
- Burrel, M., Reig, M., Forner, A., Barrufet, M., de Lope, C. R., Tremosini, S., Ayuso, C., Llovet, J. M., Real, M. I. und Bruix, J. (2012). **Survival of patients with hepatocellular carcinoma treated by transarterial chemoembolisation (TACE) using Drug Eluting Beads. Implications for clinical practice and trial design.** *J Hepatol* 56, 1330-1335, doi: 10.1016/j.jhep.2012.01.008.
- Cabrera, R. und Nelson, D. R. (2010). **Review article: the management of hepatocellular carcinoma.** *Aliment Pharmacol Ther* 31, 461-476, doi: 10.1111/j.1365-2036.2009.04200.x.
- Calderon, A. J., Muzykantov, V., Muro, S. und Eckmann, D. M. (2009). **Flow dynamics, binding and detachment of spherical carriers targeted to ICAM-1 on endothelial cells.** *Biorheology* 46, 323-341, doi: 10.3233/BIR-2009-0544.
- Cesca, M., Bizzaro, F., Zucchetti, M. und Giavazzi, R. (2013). **Tumor delivery of chemotherapy combined with inhibitors of angiogenesis and vascular targeting agents.** *Front Oncol* 3, 259, doi: 10.3389/fonc.2013.00259.
- Chacko, A. M., Han, J., Greineder, C. F., Zern, B. J., Mikitsh, J. L., Nayak, M., Menon, D., Johnston, I. H., Poncz, M., Eckmann, D. M., Davies, P. F. und Muzykantov, V. R. (2015). **Collaborative Enhancement of Endothelial Targeting of Nanocarriers by Modulating Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1/CD31 Epitope Engagement.** *ACS Nano* 9, 6785-6793, doi: 10.1021/nn505672x.
- Chacko, A. M., Nayak, M., Greineder, C. F., Delisser, H. M. und Muzykantov, V. R. (2012). **Collaborative enhancement of antibody binding to distinct PECAM-1 epitopes modulates endothelial targeting.** *PLoS One* 7, e34958, doi: 10.1371/journal.pone.0034958.
- Chaiet, L. und Wolf, F. J. (1964). **The Properties of Streptavidin, a Biotin-Binding Protein Produced by Streptomyces.** *Arch Biochem Biophys* 106, 1-5.
- Chang, Y. S., di Tomaso, E., McDonald, D. M., Jones, R., Jain, R. K. und Munn, L. L. (2000). **Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14608-14613, doi: 10.1073/pnas.97.26.14608.

- Charoenphol, P., Huang, R. B. und Eniola-Adefeso, O. (2010). **Potential role of size and hemodynamics in the efficacy of vascular-targeted spherical drug carriers.** *Biomaterials* 31, 1392-1402, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.11.007.
- Chen, H., Chen, Y., Sheardown, H. und Brook, M. A. (2005). **Immobilization of heparin on a silicone surface through a heterobifunctional PEG spacer.** *Biomaterials* 26, 7418-7424, doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.05.053.
- Chen, J. G., Parkin, D. M., Chen, Q. G., Lu, J. H., Shen, Q. J., Zhang, B. C. und Zhu, Y. R. (2003). **Screening for liver cancer: results of a randomised controlled trial in Qidong, China.** *J Med Screen* 10, 204-209, doi: 10.1258/096914103771773320.
- Chen, Y., Cai, J., Xu, Q. und Chen, Z. W. (2004). **Atomic force bio-analytics of polymerization and aggregation of phycoerythrin-conjugated immunoglobulin G molecules.** *Mol Immunol* 41, 1247-1252, doi: 10.1016/j.molimm.2004.05.012.
- Cheng, W. W. und Allen, T. M. (2008). **Targeted delivery of anti-CD19 liposomal doxorubicin in B-cell lymphoma: a comparison of whole monoclonal antibody, Fab' fragments and single chain Fv.** *J Control Release* 126, 50-58, doi: 10.1016/j.jconrel.2007.11.005.
- Chieh, J. J., Huang, K. W., Lee, Y. D., Horng, H. E., Yang, H. C. und Hong, C. Y. (2012). **In vivo screening of hepatocellular carcinoma using AC susceptibility of anti-alpha fetoprotein-activated magnetic nanoparticles.** *PLoS One* 7, e46756, doi: 10.1371/journal.pone.0046756.
- Childs, A., O'Beirne, J. und Meyer, T. (2013). **Status of hepatocellular cancer in Europe.** *Chin Clin Oncol* 2, 44, doi: 10.3978/j.issn.2304-3865.2013.09.04.
- Choi, C. H., Alabi, C. A., Webster, P. und Davis, M. E. (2010). **Mechanism of active targeting in solid tumors with transferrin-containing gold nanoparticles.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 1235-1240, doi: 10.1073/pnas.0914140107.
- Chu, J. S., Ge, F. J., Zhang, B., Wang, Y., Silvestris, N., Liu, L. J., Zhao, C. H., Lin, L., Brunetti, A. E., Fu, Y. L., Wang, J., Paradiso, A. und Xu, J. M. (2013). **Expression and prognostic value of VEGFR-2, PDGFR-beta, and c-Met in advanced hepatocellular carcinoma.** *J Exp Clin Cancer Res* 32, 16, doi: 10.1186/1756-9966-32-16.
- Cobleigh, M. A., Vogel, C. L., Tripathy, D., Robert, N. J., Scholl, S., Fehrenbacher, L., Wolter, J. M., Paton, V., Shak, S., Lieberman, G. und Slamon, D. J. (1999). **Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease.** *J Clin Oncol* 17, 2639-2648.
- Conroy, T., Desseigne, F., Ychou, M., Bouche, O., Guimbaud, R., Becouarn, Y., Adenis, A., Raoul, J. L., Gourgou-Bourgade, S., de la Fouchardiere, C., Bennouna, J., Bachet, J. B., Khemissa-Akouz, F., Pere-Verge, D., Delbaldo, C., Assenat, E., Chauffert, B., Michel, P., Montoto-Grillot, C., Ducreux, M., Groupe Tumeurs Digestives of, U. und Intergroup, P. (2011). **FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer.** *N Engl J Med* 364, 1817-1825, doi: 10.1056/NEJMoa1011923.
- Corbett, T. H., Roberts, B. J., Leopold, W. R., Peckham, J. C., Wilkoff, L. J., Griswold, D. P., Jr. und Schabel, F. M., Jr. (1984). **Induction and chemotherapeutic response of two transplantable ductal adenocarcinomas of the pancreas in C57BL/6 mice.** *Cancer Res* 44, 717-726.

- Cortesi, E., Capussotti, L., Di Tora, P., Mannella, E., Casaldi, V., Civalleri, D., Morandi, G. B., Da Pian, P., Padovani, A., Callopoli, A. und et al. (1994). **Bolus vs. continuous hepatic arterial infusion of cisplatin plus intravenous 5-fluorouracil chemotherapy for unresectable colorectal metastases.** *Dis Colon Rectum* 37, S138-143.
- Cranmer, L. D., Bedikian, A. Y., Ribas, A., O'Day, S., Forero-Torres, A., Yazji, S. und Kirkwood, J. M. (2006). **Phase II study of volociximab (M200), an alpha 5 beta 1 anti-integrin antibody in metastatic melanoma.** *Journal of Clinical Oncology* 24, 455s-455s.
- D'Angelica, M. I., Correa-Gallego, C., Paty, P. B., Cercek, A., Gewirtz, A. N., Chou, J. F., Capanu, M., Kingham, T. P., Fong, Y., DeMatteo, R. P., Allen, P. J., Jarnagin, W. R. und Kemeny, N. (2015). **Phase II trial of hepatic artery infusional and systemic chemotherapy for patients with unresectable hepatic metastases from colorectal cancer: conversion to resection and long-term outcomes.** *Ann Surg* 261, 353-360, doi: 10.1097/SLA.0000000000000614.
- Damascelli, B., Patelli, G. L., Lanocita, R., Di Tolla, G., Frigerio, L. F., Marchiano, A., Garbagnati, F., Spreafico, C., Ticha, V., Gladin, C. R., Palazzi, M., Crippa, F., Oldini, C., Calo, S., Bonaccorsi, A., Mattavelli, F., Costa, L., Mariani, L. und Cantu, G. (2003). **A novel intraarterial chemotherapy using paclitaxel in albumin nanoparticles to treat advanced squamous cell carcinoma of the tongue: preliminary findings.** *AJR Am J Roentgenol* 181, 253-260, doi: 10.2214/ajr.181.1.1810253.
- Danielyan, K., Ding, B. S., Gottstein, C., Cines, D. B. und Muzykantov, V. R. (2007). **Delivery of anti-platelet-endothelial cell adhesion molecule single-chain variable fragment-urokinase fusion protein to the cerebral vasculature lyses arterial clots and attenuates postischemic brain edema.** *J Pharmacol Exp Ther* 321, 947-952, doi: 10.1124/jpet.107.120535.
- Danilov, S. M., Gavriljuk, V. D., Franke, F. E., Pauls, K., Harshaw, D. W., McDonald, T. D., Miletich, D. J. und Muzykantov, V. R. (2001). **Lung uptake of antibodies to endothelial antigens: key determinants of vascular immunotargeting.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280, L1335-1347, doi: 10.1152/ajplung.2001.280.6.L1335.
- Davies, P. F. (1995). **Flow-mediated endothelial mechanotransduction.** *Physiol Rev* 75, 519-560.
- Davis, M. E., Chen, Z. G. und Shin, D. M. (2008). **Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer.** *Nat Rev Drug Discov* 7, 771-782, doi: 10.1038/nrd2614.
- de Baere, T., Arai, Y., Lencioni, R., Geschwind, J. F., Rilling, W., Salem, R., Matsui, O. und Soulen, M. C. (2016). **Treatment of Liver Tumors with Lipiodol TACE: Technical Recommendations from Experts Opinion.** *Cardiovasc Intervent Radiol* 39, 334-343, doi: 10.1007/s00270-015-1208-y.
- de Lope, C. R., Tremosini, S., Forner, A., Reig, M. und Bruix, J. (2012). **Management of HCC.** *J Hepatol* 56 Suppl 1, S75-87, doi: 10.1016/S0168-8278(12)60009-9.
- de Ridder, J., de Wilt, J. H., Simmer, F., Overbeek, L., Lemmens, V. und Nagtegaal, I. (2016). **Incidence and origin of histologically confirmed liver metastases: an explorative case-study of 23,154 patients.** *Oncotarget* 7, 55368-55376, doi: 10.18632/oncotarget.10552.
- Decuzzi, P. und Ferrari, M. (2008). **Design maps for nanoparticles targeting the diseased microvasculature.** *Biomaterials* 29, 377-384, doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.09.025.

- Derksen, J. T., Morselt, H. W. und Scherphof, G. L. (1987). **Processing of different liposome markers after in vitro uptake of immunoglobulin-coated liposomes by rat liver macrophages.** *Biochim Biophys Acta* 931, 33-40.
- Dezso, K., Bugyik, E., Papp, V., Laszlo, V., Dome, B., Tovari, J., Timar, J., Nagy, P. und Paku, S. (2009). **Development of arterial blood supply in experimental liver metastases.** *Am J Pathol* 175, 835-843, doi: 10.2353/ajpath.2009.090095.
- Do Minh, D., Chapiro, J., Gorodetski, B., Huang, Q., Liu, C., Smolka, S., Savic, L. J., Wainstejn, D., Lin, M., Schlachter, T., Gebauer, B. und Geschwind, J. F. (2017). **Intra-arterial therapy of neuroendocrine tumour liver metastases: comparing conventional TACE, drug-eluting beads TACE and yttrium-90 radioembolisation as treatment options using a propensity score analysis model.** *Eur Radiol* 27, 4995-5005, doi: 10.1007/s00330-017-4856-2.
- Doyle, M. B., Vachharajani, N., Maynard, E., Shenoy, S., Anderson, C., Wellen, J. R., Lowell, J. A. und Chapman, W. C. (2012). **Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: long-term results suggest excellent outcomes.** *J Am Coll Surg* 215, 19-28; discussion 28-30, doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2012.02.022.
- Dreher, M. R., Liu, W., Michelich, C. R., Dewhirst, M. W., Yuan, F. und Chilkoti, A. (2006). **Tumor vascular permeability, accumulation, and penetration of macromolecular drug carriers.** *J Natl Cancer Inst* 98, 335-344, doi: 10.1093/jnci/djj070.
- Duncan, R. (2003). **The dawning era of polymer therapeutics.** *Nat Rev Drug Discov* 2, 347-360, doi: 10.1038/nrd1088.
- El-Kareh, A. W. und Secomb, T. W. (2005). **Two-mechanism peak concentration model for cellular pharmacodynamics of Doxorubicin.** *Neoplasia* 7, 705-713.
- El-Khoueiry, A. (2017). **The Promise of Immunotherapy in the Treatment of Hepatocellular Carcinoma.** *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 37, 311-317, doi: 10.14694/EDBK_175230.
- El-Khoueiry, A. B., Sangro, B., Yau, T., Crocenzi, T. S., Kudo, M., Hsu, C., Kim, T. Y., Choo, S. P., Trojan, J., Welling, T. H. R., Meyer, T., Kang, Y. K., Yeo, W., Chopra, A., Anderson, J., Dela Cruz, C., Lang, L., Neely, J., Tang, H., Dastani, H. B. und Melero, I. (2017). **Nivolumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma (CheckMate 040): an open-label, non-comparative, phase 1/2 dose escalation and expansion trial.** *Lancet* 389, 2492-2502, doi: 10.1016/S0140-6736(17)31046-2.
- El-Serag, H. B. und Rudolph, K. L. (2007). **Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis.** *Gastroenterology* 132, 2557-2576, doi: 10.1053/j.gastro.2007.04.061.
- ElBayoumi, T. A. und Torchilin, V. P. (2009). **Tumor-targeted nanomedicines: enhanced antitumor efficacy in vivo of doxorubicin-loaded, long-circulating liposomes modified with cancer-specific monoclonal antibody.** *Clin Cancer Res* 15, 1973-1980, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2392.
- Elias, D. R., Poloukhine, A., Popik, V. und Tsourkas, A. (2013). **Effect of ligand density, receptor density, and nanoparticle size on cell targeting.** *Nanomedicine* 9, 194-201, doi: 10.1016/j.nano.2012.05.015.

- Fang, J., Nakamura, H. und Maeda, H. (2011). **The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect.** *Adv Drug Deliv Rev* 63, 136-151, doi: 10.1016/j.addr.2010.04.009.
- Farokhzad, O. C., Cheng, J., Teply, B. A., Sherifi, I., Jon, S., Kantoff, P. W., Richie, J. P. und Langer, R. (2006). **Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 6315-6320, doi: 10.1073/pnas.0601755103.
- Fasol, U., Frost, A., Buchert, M., Arends, J., Fiedler, U., Scharr, D., Scheuenpflug, J. und Mross, K. (2012). **Vascular and pharmacokinetic effects of EndoTAG-1 in patients with advanced cancer and liver metastasis.** *Ann Oncol* 23, 1030-1036, doi: 10.1093/annonc/mdr300.
- Faye, N., Fournier, L., Balvay, D., Taillieu, F., Cuenod, C., Siauve, N. und Clement, O. (2011). **Dynamic contrast enhanced optical imaging of capillary leakage.** *Technol Cancer Res Treat* 10, 49-57, doi: 10.7785/tcrt.2012.500179.
- Fedosov, D. A., Fornleitner, J. und Gompper, G. (2012). **Margination of white blood cells in microcapillary flow.** *Phys Rev Lett* 108, 028104, doi: 10.1103/PhysRevLett.108.028104.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D. und Bray, F. (2015). **Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012.** *Int J Cancer* 136, E359-386, doi: 10.1002/ijc.29210.
- Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J. W., Comber, H., Forman, D. und Bray, F. (2013). **Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012.** *Eur J Cancer* 49, 1374-1403, doi: 10.1016/j.ejca.2012.12.027.
- Fetsch, P. A. und Abati, A. (2007). **The effects of antibody clone and pretreatment method on the results of HER2 immunostaining in cytologic samples of metastatic breast cancer: A query and a review of the literature.** *Diagn Cytopathol* 35, 319-328, doi: 10.1002/dc.20638.
- Fidelman, N. und Kerlan, R. K., Jr. (2015). **Transarterial Chemoembolization and (90)Y Radioembolization for Hepatocellular Carcinoma: Review of Current Applications Beyond Intermediate-Stage Disease.** *AJR Am J Roentgenol* 205, 742-752, doi: 10.2214/AJR.15.14802.
- Figlin, R. A., Kondagunta, G. V., Yazji, S., Motzer, R. J. und Bukowski, R. M. (2006). **Phase II study of volociximab (M200), an alpha 5 beta 1 anti-integrin antibody in refractory metastatic clear cell renal cell cancer (RCC).** *Journal of Clinical Oncology* 24, 225s-225s.
- Folkman, J. (2007). **Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery?** *Nat Rev Drug Discov* 6, 273-286, doi: 10.1038/nrd2115.
- Forner, A., Llovet, J. M. und Bruix, J. (2012). **Hepatocellular carcinoma.** *The Lancet* 379, 1245-1255, doi: 10.1016/s0140-6736(11)61347-0.
- Frachon, S., Gouysse, G., Dumortier, J., Couvelard, A., Nejari, M., Mion, F., Berger, F., Paliard, P., Boillot, O. und Scoazec, J. Y. (2001). **Endothelial cell marker expression in dysplastic lesions of the liver: an immunohistochemical study.** *J Hepatol* 34, 850-857.
- Fukumura, D., Yuan, F., Monsky, W. L., Chen, Y. und Jain, R. K. (1997). **Effect of host microenvironment on the microcirculation of human colon adenocarcinoma.** *Am J Pathol* 151, 679-688.

- Gabizon, A., Shmeeda, H. und Barenholz, Y. (2003). **Pharmacokinetics of pegylated liposomal Doxorubicin: review of animal and human studies.** *Clin Pharmacokinet* 42, 419-436, doi: 10.2165/00003088-200342050-00002.
- Gabizon, A. A. (2001). **Stealth liposomes and tumor targeting: one step further in the quest for the magic bullet.** *Clin Cancer Res* 7, 223-225.
- Gabizon, A. A., Shmeeda, H. und Zalipsky, S. (2006). **Pros and cons of the liposome platform in cancer drug targeting.** *J Liposome Res* 16, 175-183, doi: 10.1080/08982100600848769.
- Gao, J., Yu, Y., Zhang, Y., Song, J., Chen, H., Li, W., Qian, W., Deng, L., Kou, G., Chen, J. und Guo, Y. (2012). **EGFR-specific PEGylated immunoliposomes for active siRNA delivery in hepatocellular carcinoma.** *Biomaterials* 33, 270-282, doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.09.035.
- Garnacho, C., Albelda, S. M., Muzykantov, V. R. und Muro, S. (2008). **Differential intra-endothelial delivery of polymer nanocarriers targeted to distinct PECAM-1 epitopes.** *J Control Release* 130, 226-233, doi: 10.1016/j.jconrel.2008.06.007.
- Gee, M. S., Procopio, W. N., Makonnen, S., Feldman, M. D., Yeilding, N. M. und Lee, W. M. (2003). **Tumor vessel development and maturation impose limits on the effectiveness of anti-vascular therapy.** *Am J Pathol* 162, 183-193, doi: 10.1016/S0002-9440(10)63809-6.
- Geraud, C., Mogler, C., Runge, A., Evdokimov, K., Lu, S., Schledzewski, K., Arnold, B., Hammerling, G., Koch, P. S., Breuhahn, K., Longerich, T., Marx, A., Weiss, C., Damm, F., Schmieder, A., Schirmacher, P., Augustin, H. G. und Goerdt, S. (2013). **Endothelial transdifferentiation in hepatocellular carcinoma: loss of Stabilin-2 expression in peri-tumourous liver correlates with increased survival.** *Liver Int* 33, 1428-1440, doi: 10.1111/liv.12262.
- Gewirtz, D. A. (1999). **A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin.** *Biochem Pharmacol* 57, 727-741.
- Ghitescu, L. und Bendayan, M. (1990). **Immunolabeling efficiency of protein A-gold complexes.** *J Histochem Cytochem* 38, 1523-1530, doi: 10.1177/38.11.2212613.
- Giantonio, B. J., Catalano, P. J., Meropol, N. J., O'Dwyer, P. J., Mitchell, E. P., Alberts, S. R., Schwartz, M. A., Benson, A. B., 3rd und Eastern Cooperative Oncology Group Study, E. (2007). **Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200.** *J Clin Oncol* 25, 1539-1544, doi: 10.1200/JCO.2006.09.6305.
- Gill, M. R., Falzone, N., Du, Y. und Vallis, K. A. (2017). **Targeted radionuclide therapy in combined-modality regimens.** *Lancet Oncol* 18, e414-e423, doi: 10.1016/S1470-2045(17)30379-0.
- Glazer, A. N. (1982). **Phycobilisomes: structure and dynamics.** *Annu Rev Microbiol* 36, 173-198, doi: 10.1146/annurev.mi.36.100182.001133.
- Gock, M., Eipel, C., Linnebacher, M., Klar, E. und Vollmar, B. (2011). **Impact of portal branch ligation on tissue regeneration, microcirculatory response and microarchitecture in portal blood-deprived and undeprived liver tissue.** *Microvasc Res* 81, 274-280, doi: 10.1016/j.mvr.2011.03.005.

- Goi, T., Naruse, T., Kimura, Y., Fujimoto, D., Morikawa, M., Koneri, K. und Yamaguchi, A. (2015). **Hepatic artery infusion therapy is effective for chemotherapy-resistant liver metastatic colorectal cancer.** *World J Surg Oncol* 13, 296, doi: 10.1186/s12957-015-0704-5.
- Goldstein, J. L., Ho, Y. K., Basu, S. K. und Brown, M. S. (1979). **Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 333-337.
- Gottesman, M. M. (2002). **Mechanisms of cancer drug resistance.** *Annu Rev Med* 53, 615-627, doi: 10.1146/annurev.med.53.082901.103929.
- Greenwald, R. B., Choe, Y. H., McGuire, J. und Conover, C. D. (2003). **Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates.** *Adv Drug Deliv Rev* 55, 217-250.
- Gregoriadis, G. (2008). **Liposome research in drug delivery: the early days.** *J Drug Target* 16, 520-524, doi: 10.1080/10611860802228350.
- Guan, W. H., Han, Y., Zhang, X., Chen, D. S., Gao, Z. W. und Feng, X. S. (2013). **Multiple renal arteries with renal cell carcinoma: preoperative evaluation using computed tomography angiography prior to laparoscopic nephrectomy.** *J Int Med Res* 41, 1705-1715, doi: 10.1177/0300060513491883.
- Guney, I. B. (2017). **HCC Locoregional Therapies: Yttrium-90 (Y-90) Selective Internal Radiation Therapy (SIRT).** *J Gastrointest Cancer*, doi: 10.1007/s12029-017-9973-2.
- Hackert, T. und Buchler, M. W. (2013). **Pancreatic cancer: advances in treatment, results and limitations.** *Dig Dis* 31, 51-56, doi: 10.1159/000347178.
- Hak, S., Helgesen, E., Hektoen, H. H., Huuse, E. M., Jarzyna, P. A., Mulder, W. J., Haraldseth, O. und Davies Cde, L. (2012). **The effect of nanoparticle polyethylene glycol surface density on ligand-directed tumor targeting studied in vivo by dual modality imaging.** *ACS Nano* 6, 5648-5658, doi: 10.1021/nn301630n.
- Hamad, I., Al-Hanbali, O., Hunter, A. C., Rutt, K. J., Andresen, T. L. und Moghimi, S. M. (2010). **Distinct polymer architecture mediates switching of complement activation pathways at the nanosphere-serum interface: implications for stealth nanoparticle engineering.** *ACS Nano* 4, 6629-6638, doi: 10.1021/nn101990a.
- Han, J., Zern, B. J., Shuvaev, V. V., Davies, P. F., Muro, S. und Muzykantov, V. (2012). **Acute and chronic shear stress differently regulate endothelial internalization of nanocarriers targeted to platelet-endothelial cell adhesion molecule-1.** *ACS Nano* 6, 8824-8836, doi: 10.1021/nn302687n.
- He, M. K., Le, Y., Li, Q. J., Yu, Z. S., Li, S. H., Wei, W., Guo, R. P. und Shi, M. (2017). **Hepatic artery infusion chemotherapy using mFOLFOX versus transarterial chemoembolization for massive unresectable hepatocellular carcinoma: a prospective non-randomized study.** *Chin J Cancer* 36, 83, doi: 10.1186/s40880-017-0251-2.
- Hemler, M. E., Huang, C. und Schwarz, L. (1987). **The VLA protein family. Characterization of five distinct cell surface heterodimers each with a common 130,000 molecular weight beta subunit.** *J Biol Chem* 262, 3300-3309.

- Hida, K., Hida, Y., Amin, D. N., Flint, A. F., Panigrahy, D., Morton, C. C. und Klagsbrun, M. (2004). **Tumor-associated endothelial cells with cytogenetic abnormalities**. *Cancer Res* 64, 8249-8255, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1567.
- Hillaireau, H. und Couvreur, P. (2009). **Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery**. *Cell Mol Life Sci* 66, 2873-2896, doi: 10.1007/s00018-009-0053-z.
- Hrkach, J., Von Hoff, D., Mukkaram Ali, M., Andrianova, E., Auer, J., Campbell, T., De Witt, D., Figa, M., Figueiredo, M., Horhota, A., Low, S., McDonnell, K., Peeke, E., Retnarajan, B., Sabnis, A., Schnipper, E., Song, J. J., Song, Y. H., Summa, J., Tompsett, D., Troiano, G., Van Geen Hoven, T., Wright, J., LoRusso, P., Kantoff, P. W., Bander, N. H., Sweeney, C., Farokhzad, O. C., Langer, R. und Zale, S. (2012). **Preclinical development and clinical translation of a PSMA-targeted docetaxel nanoparticle with a differentiated pharmacological profile**. *Sci Transl Med* 4, 128ra139, doi: 10.1126/scitranslmed.3003651.
- Hsu, F. T., Liu, H. S., Ali, A. A. A., Tsai, P. H., Kao, Y. C., Lu, C. F., Huang, H. S. und Chen, C. Y. (2018). **Assessing the Selective Therapeutic Efficacy of Superparamagnetic Erlotinib Nanoparticles in Lung Cancer by Using Quantitative Magnetic Resonance Imaging and a Nuclear Factor Kappa-B Reporter Gene System**. *Nanomedicine*, doi: 10.1016/j.nano.2018.01.010.
- Huang, K., Zhou, Q., Wang, R., Cheng, D. und Ma, Y. (2014). **Doxorubicin-eluting beads versus conventional transarterial chemoembolization for the treatment of hepatocellular carcinoma**. *J Gastroenterol Hepatol* 29, 920-925, doi: 10.1111/jgh.12439.
- Huang, S. K., Mayhew, E., Gilani, S., Lasic, D. D., Martin, F. J. und Papahadjopoulos, D. (1992). **Pharmacokinetics and therapeutics of sterically stabilized liposomes in mice bearing C-26 colon carcinoma**. *Cancer Res* 52, 6774-6781.
- Huo, T.-I. (2011). **Locoregional Therapy**. In: *Encyclopedia of Cancer*, Hrsg. Schwab, M., Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S. 2072-2073.
- Idani, H., Matsuoka, J., Yasuda, T., Kobayashi, K. und Tanaka, N. (2000). **Intra-tumoral injection of doxorubicin (adriamycin) encapsulated in liposome inhibits tumor growth, prolongs survival time and is not associated with local or systemic side effects**. *Int J Cancer* 88, 645-651.
- Ishikawa, T. (2009). **Future perspectives on the treatment of hepatocellular carcinoma with cisplatin**. *World J Hepatol* 1, 8-16, doi: 10.4254/wjh.v1.i1.8.
- Jain, R. K. (1988). **Determinants of tumor blood flow: a review**. *Cancer Res* 48, 2641-2658.
- Jain, R. K. (1990). **Physiological barriers to delivery of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors**. *Cancer Res* 50, 814s-819s.
- Jiang, G., Zhang, L., Zhu, Q., Bai, D., Zhang, C. und Wang, X. (2016). **CD146 promotes metastasis and predicts poor prognosis of hepatocellular carcinoma**. *J Exp Clin Cancer Res* 35, 38, doi: 10.1186/s13046-016-0313-3.
- Jiang, T., Zhuang, J., Duan, H., Luo, Y., Zeng, Q., Fan, K., Yan, H., Lu, D., Ye, Z., Hao, J., Feng, J., Yang, D. und Yan, X. (2012). **CD146 is a coreceptor for VEGFR-2 in tumor angiogenesis**. *Blood* 120, 2330-2339, doi: 10.1182/blood-2012-01-406108.

- Jiang, W., Kim, B. Y., Rutka, J. T. und Chan, W. C. (2008). **Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent.** *Nat Nanotechnol* 3, 145-150, doi: 10.1038/nnano.2008.30.
- Ju, J. A., Godet, I., Ye, I. C., Byun, J., Jayatilaka, H., Lee, S. J., Xiang, L., Samanta, D., Lee, M. H., Wu, P. H., Wirtz, D., Semenza, G. L. und Gilkes, D. M. (2017). **Hypoxia Selectively Enhances Integrin alpha5beta1 Receptor Expression in Breast Cancer to Promote Metastasis.** *Mol Cancer Res* 15, 723-734, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-16-0338.
- Kamps, J. A., Koning, G. A., Velinova, M. J., Morselt, H. W., Wilkens, M., Gorter, A., Donga, J. und Scherphof, G. L. (2000). **Uptake of long-circulating immunoliposomes, directed against colon adenocarcinoma cells, by liver metastases of colon cancer.** *J Drug Target* 8, 235-245, doi: 10.3109/10611860008997902.
- Kamps, J. A., Morselt, H. W., Swart, P. J., Meijer, D. K. und Scherphof, G. L. (1997). **Massive targeting of liposomes, surface-modified with anionized albumins, to hepatic endothelial cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11681-11685.
- Kasai, K., Ushio, A., Kasai, Y., Sawara, K., Miyamoto, Y., Oikawa, K., Takikawa, Y. und Suzuki, K. (2013). **Therapeutic efficacy of transarterial chemo-embolization with a fine-powder formulation of cisplatin for hepatocellular carcinoma.** *World J Gastroenterol* 19, 2242-2248, doi: 10.3748/wjg.v19.i14.2242.
- Ke, A. W., Shi, G. M., Zhou, J., Wu, F. Z., Ding, Z. B., Hu, M. Y., Xu, Y., Song, Z. J., Wang, Z. J., Wu, J. C., Bai, D. S., Li, J. C., Liu, K. D. und Fan, J. (2009). **Role of overexpression of CD151 and/or c-Met in predicting prognosis of hepatocellular carcinoma.** *Hepatology* 49, 491-503, doi: 10.1002/hep.22639.
- Kelley, W. J., Safari, H., Lopez-Cazares, G. und Eniola-Adefeso, O. (2016). **Vascular-targeted nanocarriers: design considerations and strategies for successful treatment of atherosclerosis and other vascular diseases.** *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 8, 909-926, doi: 10.1002/wnan.1414.
- Kenausis, G. L., Vöros, J., Elbert, D. L., Huang, N., Hofer, R., Ruiz-Taylor, L., Textor, M., Hubbell, J. A. und Spencer, N. D. (2000). **Poly(L-lysine)-g-Poly(ethylene glycol) Layers on Metal Oxide Surfaces: Attachment Mechanism and Effects of Polymer Architecture on Resistance to Protein Adsorption.** *J Phys Chem* 104, 3298-3309, doi: 10.1021/jp993359m.
- Kibria, G., Hatakeyama, H., Ohga, N., Hida, K. und Harashima, H. (2013). **The effect of liposomal size on the targeted delivery of doxorubicin to Integrin alphavbeta3-expressing tumor endothelial cells.** *Biomaterials* 34, 5617-5627, doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.03.094.
- Kim, M., Fisher, D. T., Powers, C. A., Gabriel, E. M., Korman, A. M., Sexton, S., Gudkov, A. V. und Skitzki, J. J. (2017). **Novel mouse models of hepatic artery infusion.** *J Surg Res* 219, 25-32, doi: 10.1016/j.jss.2017.05.083.
- Kim, S., Bell, K., Mousa, S. A. und Varner, J. A. (2000). **Regulation of angiogenesis in vivo by ligation of integrin alpha5beta1 with the central cell-binding domain of fibronectin.** *Am J Pathol* 156, 1345-1362.

- Kirpotin, D. B., Drummond, D. C., Shao, Y., Shalaby, M. R., Hong, K., Nielsen, U. B., Marks, J. D., Benz, C. C. und Park, J. W. (2006). **Antibody targeting of long-circulating lipidic nanoparticles does not increase tumor localization but does increase internalization in animal models.** *Cancer Res* 66, 6732-6740, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4199.
- Kiyomiya, K., Matsuo, S. und Kurebe, M. (2001). **Mechanism of specific nuclear transport of adriamycin: the mode of nuclear translocation of adriamycin-proteasome complex.** *Cancer Res* 61, 2467-2471.
- Kocak, M., Sudakoff, G. S., Erickson, S., Begun, F. und Datta, M. (2001). **Using MR angiography for surgical planning in pelvic kidney renal cell carcinoma.** *AJR Am J Roentgenol* 177, 659-660, doi: 10.2214/ajr.177.3.1770659.
- Koning, G. A., Kamps, J. A. und Scherphof, G. L. (2002). **Interference of macrophages with immunotargeting of liposomes.** *J Liposome Res* 12, 107-119, doi: 10.1081/LPR-120004782.
- Kratochwil, C., Giesel, F. L., Bruchertseifer, F., Mier, W., Apostolidis, C., Boll, R., Murphy, K., Haberkorn, U. und Morgenstern, A. (2014). **(2)(1)(3)Bi-DOTATOC receptor-targeted alpha-radionuclide therapy induces remission in neuroendocrine tumours refractory to beta radiation: a first-in-human experience.** *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 41, 2106-2119, doi: 10.1007/s00259-014-2857-9.
- Kratochwil, C., Giesel, F. L., Lopez-Benitez, R., Schimpfky, N., Kunze, K., Eisenhut, M., Kauczor, H. U. und Haberkorn, U. (2010). **Intraindividual comparison of selective arterial versus venous 68Ga-DOTATOC PET/CT in patients with gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors.** *Clin Cancer Res* 16, 2899-2905, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0004.
- Kress, S., Konig, J., Schweizer, J., Lohrke, H., Bauer-Hofmann, R. und Schwarz, M. (1992). **p53 mutations are absent from carcinogen-induced mouse liver tumors but occur in cell lines established from these tumors.** *Mol Carcinog* 6, 148-158.
- Kroschinsky, F., Stolzel, F., von Bonin, S., Beutel, G., Kochanek, M., Kiehl, M., Schellongowski, P., Intensive Care in, H. und Oncological Patients Collaborative, G. (2017). **New drugs, new toxicities: severe side effects of modern targeted and immunotherapy of cancer and their management.** *Crit Care* 21, 89, doi: 10.1186/s13054-017-1678-1.
- Kuan, H. Y., Smith, D. E., Ensmiger, W. D., Knol, J. A., DeRemer, S. J., Yang, Z. und Stetson, P. L. (1996). **Regional pharmacokinetics of 5-bromo-2'-deoxyuridine and 5-fluorouracil in dogs: hepatic arterial versus portal venous infusions.** *Cancer Res* 56, 4724-4727.
- Kudo, M., Finn, R. S., Qin, S., Han, K. H., Ikeda, K., Piscaglia, F., Baron, A., Park, J. W., Han, G., Jassem, J., Blanc, J. F., Vogel, A., Komov, D., Evans, T. R. J., Lopez, C., Dutcus, C., Guo, M., Saito, K., Kraljevic, S., Tamai, T., Ren, M. und Cheng, A. L. (2018). **Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial.** *Lancet* 391, 1163-1173, doi: 10.1016/S0140-6736(18)30207-1.
- Kumar, A. und Graham, M. D. (2012). **Mechanism of margination in confined flows of blood and other multicomponent suspensions.** *Phys Rev Lett* 109, 108102, doi: 10.1103/PhysRevLett.109.108102.

- Kumar, C. C., Malkowski, M., Yin, Z., Tanghetti, E., Yaremko, B., Nechuta, T., Varner, J., Liu, M., Smith, E. M., Neustadt, B., Presta, M. und Armstrong, L. (2001). **Inhibition of angiogenesis and tumor growth by SCH221153, a dual alpha(v)beta3 and alpha(v)beta5 integrin receptor antagonist.** *Cancer Res* 61, 2232-2238.
- Kuo, F., Histed, S., Xu, B., Bhadrasetty, V., Szajek, L. P., Williams, M. R., Wong, K., Wu, H., Lane, K., Coble, V., Vasalatiy, O., Griffiths, G. L., Paik, C. H., Elbuluk, O., Szot, C., Chaudhary, A., St Croix, B., Choyke, P. und Jagoda, E. M. (2014). **Immuno-PET imaging of tumor endothelial marker 8 (TEM8).** *Mol Pharm* 11, 3996-4006, doi: 10.1021/mp500056d.
- Laitinen, O. H., Nordlund, H. R., Hytonen, V. P. und Kulomaa, M. S. (2007). **Brave new (strept)avidins in biotechnology.** *Trends Biotechnol* 25, 269-277, doi: 10.1016/j.tibtech.2007.04.001.
- Lautt, W. W. (2009). **Hepatic Circulation: Physiology and Pathophysiology**, Morgan & Claypool Life Sciences, San Rafael (CA).
- Lee, J. G., Kang, C. M., Park, J. S., Kim, K. S., Yoon, D. S., Choi, J. S., Lee, W. J. und Kim, B. R. (2006). **The actual five-year survival rate of hepatocellular carcinoma patients after curative resection.** *Yonsei Med J* 47, 105-112, doi: 10.3349/ymj.2006.47.1.105.
- Lee, S. Y., Ferrari, M. und Decuzzi, P. (2009). **Shaping nano-/micro-particles for enhanced vascular interaction in laminar flows.** *Nanotechnology* 20, 495101, doi: 10.1088/0957-4484/20/49/495101.
- Lee, T. R., Choi, M., Kopacz, A. M., Yun, S. H., Liu, W. K. und Decuzzi, P. (2013). **On the near-wall accumulation of injectable particles in the microcirculation: smaller is not better.** *Sci Rep* 3, 2079, doi: 10.1038/srep02079.
- Leu, A. J., Berk, D. A., Lymboussaki, A., Alitalo, K. und Jain, R. K. (2000). **Absence of functional lymphatics within a murine sarcoma: a molecular and functional evaluation.** *Cancer Res* 60, 4324-4327.
- Levin, D., DiPaolo, R. J., Brinster, C., Revilla, M. J., Boyd, L. F., Teyton, L., Natarajan, K., Mage, M. G., Shevach, E. M. und Margulies, D. H. (2008). **Availability of autoantigenic epitopes controls phenotype, severity, and penetrance in TCR Tg autoimmune gastritis.** *Eur J Immunol* 38, 3339-3353, doi: 10.1002/eji.200838584.
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I. und Nourshargh, S. (2007). **Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated.** *Nat Rev Immunol* 7, 678-689, doi: 10.1038/nri2156.
- Li, B., Pozzi, A. und Young, P. P. (2011). **TNFalpha accelerates monocyte to endothelial transdifferentiation in tumors by the induction of integrin alpha5 expression and adhesion to fibronectin.** *Mol Cancer Res* 9, 702-711, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-10-0484.
- Li, G., Chen, X., Wang, Q., Xu, Z., Zhang, W. und Ye, L. (2007). **The roles of four multi-drug resistance proteins in hepatocellular carcinoma multidrug resistance.** *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 27, 173-175, doi: 10.1007/s11596-007-0217-8.
- Li, J. und Kao, W. J. (2003). **Synthesis of polyethylene glycol (PEG) derivatives and PEGylated-peptide biopolymer conjugates.** *Biomacromolecules* 4, 1055-1067, doi: 10.1021/bm034069l.

- Li, Y., Zhai, Z., Liu, D., Zhong, X., Meng, X., Yang, Q., Liu, J. und Li, H. (2015). **CD105 promotes hepatocarcinoma cell invasion and metastasis through VEGF**. *Tumour Biol* 36, 737-745, doi: 10.1007/s13277-014-2686-2.
- Li, Z., Xu, X., Feng, X. und Murphy, P. M. (2016). **The Macrophage-depleting Agent Clodronate Promotes Durable Hematopoietic Chimerism and Donor-specific Skin Allograft Tolerance in Mice**. *Sci Rep* 6, 22143, doi: 10.1038/srep22143.
- Li, Z. Y., Qin, X. Y., Guo, L. Y., Wang, H., Liu, X. X., Zheng, Z. Z., Guan, H. T., Song, L., Zou, Y. H. und Fan, T. Y. (2017). **Poly(acrylic acid) microspheres loaded with superparamagnetic iron oxide nanoparticles for transcatheter arterial embolization and MRI detectability: In vitro and in vivo evaluation**. *Int J Pharm* 527, 31-41, doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.04.069.
- Liao, M., Huang, J., Zhang, T. und Wu, H. (2013). **Transarterial chemoembolization in combination with local therapies for hepatocellular carcinoma: a meta-analysis**. *PLoS One* 8, e68453, doi: 10.1371/journal.pone.0068453.
- Liapi, E. und Geschwind, J. F. (2007). **Transcatheter and ablative therapeutic approaches for solid malignancies**. *J Clin Oncol* 25, 978-986, doi: 10.1200/JCO.2006.09.8657.
- Lin, A., Sabnis, A., Kona, S., Nattama, S., Patel, H., Dong, J. F. und Nguyen, K. T. (2010). **Shear-regulated uptake of nanoparticles by endothelial cells and development of endothelial-targeting nanoparticles**. *J Biomed Mater Res A* 93, 833-842, doi: 10.1002/jbm.a.32592.
- Lin, S., Hoffmann, K. und Schemmer, P. (2012). **Treatment of hepatocellular carcinoma: a systematic review**. *Liver Cancer* 1, 144-158, doi: 10.1159/000343828.
- Liu, T., Choi, H., Zhou, R. und Chen, I. W. (2015). **RES blockade: A strategy for boosting efficiency of nanoparticle drug**. *Nano Today* 10, 11-21, doi: 10.1016/j.nantod.2014.12.003.
- Llovet, J. M., Bru, C. und Bruix, J. (1999). **Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification**. *Semin Liver Dis* 19, 329-338, doi: 10.1055/s-2007-1007122.
- Llovet, J. M. und Bruix, J. (2003). **Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival**. *Hepatology* 37, 429-442, doi: 10.1053/jhep.2003.50047.
- Llovet, J. M., Burroughs, A. und Bruix, J. (2003). **Hepatocellular carcinoma**. *Lancet* 362, 1907-1917, doi: 10.1016/S0140-6736(03)14964-1.
- Llovet, J. M., Ricci, S., Mazzaferro, V., Hilgard, P., Gane, E., Blanc, J. F., de Oliveira, A. C., Santoro, A., Raoul, J. L., Forner, A., Schwartz, M., Porta, C., Zeuzem, S., Bolondi, L., Greten, T. F., Galle, P. R., Seitz, J. F., Borbath, I., Haussinger, D., Giannaris, T., Shan, M., Moscovici, M., Voliotis, D., Bruix, J. und Group, S. I. S. (2008). **Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma**. *N Engl J Med* 359, 378-390, doi: 10.1056/NEJMoa0708857.
- Lohr, J. M., Haas, S. L., Bechstein, W. O., Bodoky, G., Cwiertka, K., Fischbach, W., Folsch, U. R., Jager, D., Osinsky, D., Prausova, J., Schmidt, W. E., Lutz, M. P. und Group, C. T. S. (2012). **Cationic liposomal paclitaxel plus gemcitabine or gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a randomized controlled phase II trial**. *Ann Oncol* 23, 1214-1222, doi: 10.1093/annonc/mdr379.

- Louis, K. S. und Siegel, A. C. (2011). **Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods**. *Methods Mol Biol* 740, 7-12, doi: 10.1007/978-1-61779-108-6_2.
- Lyon, P. C., Griffiths, L. F., Lee, J., Chung, D., Carlisle, R., Wu, F., Middleton, M. R., Gleeson, F. V. und Coussios, C. C. (2017). **Clinical trial protocol for TARDOX: a phase I study to investigate the feasibility of targeted release of lyso-thermosensitive liposomal doxorubicin (ThermoDox(R)) using focused ultrasound in patients with liver tumours**. *J Ther Ultrasound* 5, 28, doi: 10.1186/s40349-017-0104-0.
- Maeda, H., Nakamura, H. und Fang, J. (2013). **The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo**. *Adv Drug Deliv Rev* 65, 71-79, doi: 10.1016/j.addr.2012.10.002.
- Magnussen, A., Kasman, I. M., Norberg, S., Baluk, P., Murray, R., and McDonald, D. M. (2005). **Rapid Access of Antibodies to alpha5beta1 Integrin Overexpressed on the Luminal Surface of Tumor Blood Vessels**. *Cancer Research* 65, 2712-2721.
- Mahmoudian, J., Jeddi-Tehrani, M., Rabbani, H., Mahmoudi, A. R., Akhondi, M. M., Zarnani, A. H., Goli, L. B., Babaei, M. und Ghods, R. (2010). **Conjugation of R-Phycoerythrin to a Polyclonal Antibody and F (ab')₂ Fragment of a Polyclonal Antibody by Two Different Methods**. *Avicenna J Med Biotechnol* 2, 87-91.
- Malek, N. P., Schmidt, S., Huber, P., Manns, M. P. und Greten, T. F. (2014). **The diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma**. *Dtsch Arztebl Int* 111, 101-106, doi: 10.3238/arztebl.2014.0101.
- Mamot, C., Ritschard, R., Wicki, A., Stehle, G., Dieterle, T., Bubendorf, L., Hilker, C., Deuster, S., Herrmann, R. und Rochlitz, C. (2012). **Tolerability, safety, pharmacokinetics, and efficacy of doxorubicin-loaded anti-EGFR immunoliposomes in advanced solid tumours: a phase 1 dose-escalation study**. *Lancet Oncol* 13, 1234-1241, doi: 10.1016/S1470-2045(12)70476-X.
- Matsumura, Y. und Maeda, H. (1986). **A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs**. *Cancer Res* 46, 6387-6392.
- McDonald, D. M. und Baluk, P. (2002). **Significance of blood vessel leakiness in cancer**. *Cancer Res* 62, 5381-5385.
- McKeown, S. R. (2014). **Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours-implications for treatment response**. *Br J Radiol* 87, 20130676, doi: 10.1259/bjr.20130676.
- Miederer, M., Henriksen, G., Alke, A., Mossbrugger, I., Quintanilla-Martinez, L., Senekowitsch-Schmidtke, R. und Essler, M. (2008). **Preclinical evaluation of the alpha-particle generator nuclide ²²⁵Ac for somatostatin receptor radiotherapy of neuroendocrine tumors**. *Clin Cancer Res* 14, 3555-3561, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4647.
- Minchinton, A. I. und Tannock, I. F. (2006). **Drug penetration in solid tumours**. *Nat Rev Cancer* 6, 583-592, doi: 10.1038/nrc1893.
- Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G. und Gianni, L. (2004). **Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity**. *Pharmacol Rev* 56, 185-229, doi: 10.1124/pr.56.2.6.

- Mitsudo, K., Hayashi, Y., Minamiyama, S., Ohashi, N., Iida, M., Iwai, T., Oguri, S., Koizumi, T., Kioi, M., Hirota, M., Koike, I., Hata, M. und Tohnai, I. (2018). **Chemoradiotherapy using retrograde superselective intra-arterial infusion for tongue cancer: Analysis of therapeutic results in 118 cases.** *Oral Oncol* 79, 71-77, doi: 10.1016/j.oraloncology.2018.02.002.
- Mocellin, S., Pilati, P., Lise, M. und Nitti, D. (2007). **Meta-analysis of hepatic arterial infusion for unresectable liver metastases from colorectal cancer: the end of an era?** *J Clin Oncol* 25, 5649-5654, doi: 10.1200/JCO.2007.12.1764.
- Mokotoff, M., Mocarski, Y. M., Gentsch, B. L., Miller, M. R., Zhou, J. H., Chen, J. und Ball, E. D. (2001). **Caution in the use of 2-iminothiolane (Traut's reagent) as a cross-linking agent for peptides. The formation of N-peptidyl-2-iminothiolanes with bombesin (BN) antagonist (D-Trp(6),Leu(13)-psi[CH(2)NH]-Phe(14))BN(6-14) and D-Trp-Gln-Trp-NH(2).** *J Pept Res* 57, 383-389.
- Molema, G. (2005). **Design of vascular endothelium-specific drug-targeting strategies for the treatment of cancer.** *Acta Biochim Pol* 52, 301-310.
- Mori, A., Klibanov, A. L., Torchilin, V. P. und Huang, L. (1991). **Influence of the steric barrier activity of amphipathic poly(ethyleneglycol) and ganglioside GM1 on the circulation time of liposomes and on the target binding of immunoliposomes in vivo.** *FEBS Lett* 284, 263-266.
- Morikawa, S., Baluk, P., Kaidoh, T., Haskell, A., Jain, R. K. und McDonald, D. M. (2002). **Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors.** *Am J Pathol* 160, 985-1000, doi: 10.1016/S0002-9440(10)64920-6.
- Mosconi, C., Cappelli, A., Pettinato, C. und Golfieri, R. (2015). **Radioembolization with Yttrium-90 microspheres in hepatocellular carcinoma: Role and perspectives.** *World J Hepatol* 7, 738-752, doi: 10.4254/wjh.v7.i5.738.
- Mu, Q., Hu, T. und Yu, J. (2013). **Molecular insight into the steric shielding effect of PEG on the conjugated staphylokinase: biochemical characterization and molecular dynamics simulation.** *PLoS One* 8, e68559, doi: 10.1371/journal.pone.0068559.
- Mukherjee, S., Ghosh, R. N. und Maxfield, F. R. (1997). **Endocytosis.** *Physiol Rev* 77, 759-803, doi: 10.1152/physrev.1997.77.3.759.
- Mukundakrishnan, K., Ayyaswamy, P. S. und Eckmann, D. M. (2009). **Bubble motion in a blood vessel: shear stress induced endothelial cell injury.** *J Biomech Eng* 131, 074516, doi: 10.1115/1.3153310.
- Muro, S. (2012). **Challenges in design and characterization of ligand-targeted drug delivery systems.** *J Control Release* 164, 125-137, doi: 10.1016/j.jconrel.2012.05.052.
- Muro, S., Schuchman, E. H. und Muzykantov, V. R. (2006). **Lysosomal enzyme delivery by ICAM-1-targeted nanocarriers bypassing glycosylation- and clathrin-dependent endocytosis.** *Mol Ther* 13, 135-141, doi: 10.1016/j.ymthe.2005.07.687.
- Myerson, J. W., Brenner, J. S., Greineder, C. F. und Muzykantov, V. R. (2015). **Systems approaches to design of targeted therapeutic delivery.** *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 7, 253-265, doi: 10.1002/wsbm.1304.

- Nakamura, K., Yamashita, K., Itoh, Y., Yoshino, K., Nozawa, S. und Kasukawa, H. (2012). **Comparative studies of polyethylene glycol-modified liposomes prepared using different PEG-modification methods.** *Biochim Biophys Acta* 1818, 2801-2807, doi: 10.1016/j.bbame.2012.06.019.
- Namdee, K., Carrasco-Teja, M., Fish, M. B., Charoenphol, P. und Eniola-Adefeso, O. (2015a). **Effect of variation in hemorheology between human and animal blood on the binding efficacy of vascular-targeted carriers.** *Sci Rep* 5, 11631, doi: 10.1038/srep11631.
- Namdee, K., Sobczynski, D. J., Onyskiw, P. J. und Eniola-Adefeso, O. (2015b). **Differential Impact of Plasma Proteins on the Adhesion Efficiency of Vascular-Targeted Carriers (VTCs) in Blood of Common Laboratory Animals.** *Bioconjug Chem* 26, 2419-2428, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00474.
- Nanda, A. und St Croix, B. (2004). **Tumor endothelial markers: new targets for cancer therapy.** *Curr Opin Oncol* 16, 44-49.
- National Center for Biotechnology Information (2018a). **PubChem Compound Database; CID=807.** URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/807> [Stand: 24.05.2018].
- National Center for Biotechnology Information (2018b). **PubChem Compound Database; CID=13166855.** URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/13166855> [Stand: 24.05.2018].
- Nelson, S. J. und Manning, D. D. (1980). **Persistence of passively transferred goat F(ab')₂ antibody fragments in the circulation of rodents.** *J Immunol* 125, 2339-2343.
- Neri, D. (2003). **Targeting the vascular endothelium--novel approaches.** *Pathophysiol Haemost Thromb* 33 Suppl 1, 7-8, doi: 10.1159/000073278.
- Ng, C. M., Bai, S., Takimoto, C. H., Tang, M. T. und Tolcher, A. W. (2010). **Mechanism-based receptor-binding model to describe the pharmacokinetic and pharmacodynamic of an anti- $\alpha 5\beta 1$ integrin monoclonal antibody (volociximab) in cancer patients.** *Cancer Chemother Pharmacol* 65, 207-217, doi: 10.1007/s00280-009-1023-8.
- Nikfarjam, M., Malcontenti-Wilson, C., Fanartzis, M., Daruwalla, J. und Christophi, C. (2004). **A model of partial hepatectomy in mice.** *J Invest Surg* 17, 291-294, doi: 10.1080/08941930490502871.
- Nishikawa, H., Osaki, Y., Kita, R. und Kimura, T. (2012). **Hepatic arterial infusion chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma in Japan.** *Cancers (Basel)* 4, 165-183, doi: 10.3390/cancers4010165.
- Northfelt, D. W., Dezube, B. J., Thommes, J. A., Levine, R., Von Roenn, J. H., Dosik, G. M., Rios, A., Krown, S. E., DuMond, C. und Mamelok, R. D. (1997). **Efficacy of pegylated-liposomal doxorubicin in the treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma after failure of standard chemotherapy.** *J Clin Oncol* 15, 653-659, doi: 10.1200/JCO.1997.15.2.653.
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T. und Pognan, F. (2000). **Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity.** *Eur J Biochem* 267, 5421-5426.

- Obi, S., Sato, S. und Kawai, T. (2015). **Current Status of Hepatic Arterial Infusion Chemotherapy.** *Liver Cancer* 4, 188-199, doi: 10.1159/000367746.
- Oh, P., Li, Y., Yu, J., Durr, E., Krasinska, K. M., Carver, L. A., Testa, J. E. und Schnitzer, J. E. (2004). **Subtractive proteomic mapping of the endothelial surface in lung and solid tumours for tissue-specific therapy.** *Nature* 429, 629-635, doi: 10.1038/nature02580.
- Olsen, A. H., Parkin, D. M. und Sasieni, P. (2008). **Cancer mortality in the United Kingdom: projections to the year 2025.** *Br J Cancer* 99, 1549-1554, doi: 10.1038/sj.bjc.6604710.
- Orecchia, A., Lecal, P. M., Schietroma, C., Morea, V., Zambruno, G. und Failla, C. M. (2003). **Vascular endothelial growth factor receptor-1 is deposited in the extracellular matrix by endothelial cells and is a ligand for the alpha 5 beta 1 integrin.** *J Cell Sci* 116, 3479-3489, doi: 10.1242/jcs.00673.
- Owens, D. E., 3rd und Peppas, N. A. (2006). **Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles.** *Int J Pharm* 307, 93-102, doi: 10.1016/j.ijpharm.2005.10.010.
- Ozakyol, A. (2017). **Global Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma (HCC Epidemiology).** *J Gastrointest Cancer*, doi: 10.1007/s12029-017-9959-0.
- Papademetriou, I., Tsinas, Z., Hsu, J. und Muro, S. (2014). **Combination-targeting to multiple endothelial cell adhesion molecules modulates binding, endocytosis, and in vivo biodistribution of drug nanocarriers and their therapeutic cargoes.** *J Control Release* 188, 87-98, doi: 10.1016/j.jconrel.2014.06.008.
- Park, J. W., Chen, M., Colombo, M., Roberts, L. R., Schwartz, M., Chen, P. J., Kudo, M., Johnson, P., Wagner, S., Orsini, L. S. und Sherman, M. (2015). **Global patterns of hepatocellular carcinoma management from diagnosis to death: the BRIDGE Study.** *Liver Int* 35, 2155-2166, doi: 10.1111/liv.12818.
- Parsons-Wingerter, P., Kasman, I. M., Norberg, S., Magnussen, A., Zanivan, S., Rissone, A., Baluk, P., Favre, C. J., Jeffry, U., Murray, R. und McDonald, D. M. (2005). **Uniform overexpression and rapid accessibility of alpha5beta1 integrin on blood vessels in tumors.** *Am J Pathol* 167, 193-211.
- Pelillo, C., Bergamo, A., Mollica, H., Bestagno, M. und Sava, G. (2015). **Colorectal Cancer Metastases Settle in the Hepatic Microenvironment Through alpha5beta1 Integrin.** *J Cell Biochem* 116, 2385-2396, doi: 10.1002/jcb.25189.
- Petersen, J., Dandri, M., Mier, W., Lutgehetmann, M., Volz, T., von Weizsacker, F., Haberkorn, U., Fischer, L., Pollok, J. M., Erbes, B., Seitz, S. und Urban, S. (2008). **Prevention of hepatitis B virus infection in vivo by entry inhibitors derived from the large envelope protein.** *Nat Biotechnol* 26, 335-341, doi: 10.1038/nbt1389.
- Petitguillaume, A., Bernardini, M., Hadid, L., de Labriolle-Vaylet, C., Franck, D. und Desbree, A. (2014). **Three-dimensional personalized Monte Carlo dosimetry in 90Y resin microspheres therapy of hepatic metastases: nontumoral liver and lungs radiation protection considerations and treatment planning optimization.** *J Nucl Med* 55, 405-413, doi: 10.2967/jnumed.113.120444.

- Pinter, M., Hucke, F., Graziadei, I., Vogel, W., Maieron, A., Konigsberg, R., Stauber, R., Grunberger, B., Muller, C., Kolblinger, C., Peck-Radosavljevic, M. und Sieghart, W. (2012). **Advanced-stage hepatocellular carcinoma: transarterial chemoembolization versus sorafenib.** *Radiology* 263, 590-599, doi: 10.1148/radiol.12111550.
- Pisal, D. S., Kosloski, M. P. und Balu-Iyer, S. V. (2010). **Delivery of therapeutic proteins.** *J Pharm Sci* 99, 2557-2575, doi: 10.1002/jps.22054.
- Poisson, J., Lemoine, S., Boulanger, C., Durand, F., Moreau, R., Valla, D. und Rautou, P. E. (2017). **Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases.** *J Hepatol* 66, 212-227, doi: 10.1016/j.jhep.2016.07.009.
- Polesel, J., Zucchetto, A., Montella, M., Dal Maso, L., Crispo, A., La Vecchia, C., Serraino, D., Franceschi, S. und Talamini, R. (2009). **The impact of obesity and diabetes mellitus on the risk of hepatocellular carcinoma.** *Ann Oncol* 20, 353-357, doi: 10.1093/annonc/mdn565.
- Poon, R. T., Ng, I. O., Lau, C., Yu, W. C., Yang, Z. F., Fan, S. T. und Wong, J. (2002). **Tumor microvessel density as a predictor of recurrence after resection of hepatocellular carcinoma: a prospective study.** *J Clin Oncol* 20, 1775-1785, doi: 10.1200/JCO.2002.07.089.
- Postel-Vinay, S., Collette, L., Paoletti, X., Rizzo, E., Massard, C., Olmos, D., Fowst, C., Levy, B., Mancini, P., Lacombe, D., Ivy, P., Seymour, L., Le Tourneau, C., Siu, L. L., Kaye, S. B., Verweij, J. und Soria, J. C. (2014). **Towards new methods for the determination of dose limiting toxicities and the assessment of the recommended dose for further studies of molecularly targeted agents--dose-limiting toxicity and toxicity assessment recommendation group for early trials of targeted therapies, an European Organisation for Research and Treatment of Cancer-led study.** *Eur J Cancer* 50, 2040-2049, doi: 10.1016/j.ejca.2014.04.031.
- Quirk, M., Kim, Y. H., Saab, S. und Lee, E. W. (2015). **Management of hepatocellular carcinoma with portal vein thrombosis.** *World J Gastroenterol* 21, 3462-3471, doi: 10.3748/wjg.v21.i12.3462.
- Rezaei, M., Cao, J., Friedrich, K., Kemper, B., Brendel, O., Grosser, M., Adrian, M., Baretton, G., Breier, G. und Schnittler, H. J. (2018). **The expression of VE-cadherin in breast cancer cells modulates cell dynamics as a function of tumor differentiation and promotes tumor-endothelial cell interactions.** *Histochem Cell Biol* 149, 15-30, doi: 10.1007/s00418-017-1619-8.
- Rezaeiipoor, R., John, R., Adie, S. G., Chaney, E. J., Marjanovic, M., Oldenburg, A. L., Rinne, S. A. und Boppart, S. A. (2009). **Fc-DIRECTED ANTIBODY CONJUGATION OF MAGNETIC NANOPARTICLES FOR ENHANCED MOLECULAR TARGETING.** *J Innov Opt Health Sci* 2, 387-396, doi: 10.1142/S1793545809000693.
- Roerdink, F., Dijkstra, J., Hartman, G., Bolscher, B. und Scherphof, G. (1981). **The involvement of parenchymal, Kupffer and endothelial liver cells in the hepatic uptake of intravenously injected liposomes. Effects of lanthanum and gadolinium salts.** *Biochim Biophys Acta* 677, 79-89.
- Roth, L., Agemy, L., Kotamraju, V. R., Braun, G., Teesalu, T., Sugahara, K. N., Hamzah, J. und Ruoslahti, E. (2012). **Transtumoral targeting enabled by a novel neuropilin-binding peptide.** *Oncogene* 31, 3754-3763, doi: 10.1038/onc.2011.537.

- Roth, P., Hammer, C., Piguët, A. C., Ledermann, M., Dufour, J. F. und Waelti, E. (2007). **Effects on hepatocellular carcinoma of doxorubicin-loaded immunoliposomes designed to target the VEGFR-2.** *J Drug Target* 15, 623-631, doi: 10.1080/10611860701502723.
- Rudnick, S. I. und Adams, G. P. (2009). **Affinity and avidity in antibody-based tumor targeting.** *Cancer Biother Radiopharm* 24, 155-161, doi: 10.1089/cbr.2009.0627.
- Rudnick, S. I., Lou, J., Shaller, C. C., Tang, Y., Klein-Szanto, A. J., Weiner, L. M., Marks, J. D. und Adams, G. P. (2011). **Influence of affinity and antigen internalization on the uptake and penetration of Anti-HER2 antibodies in solid tumors.** *Cancer Res* 71, 2250-2259, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2277.
- Ruoslahti, E. (1991). **Integrins.** *J Clin Invest* 87, 1-5, doi: 10.1172/JCI114957.
- Ruoslahti, E. (2002). **Drug targeting to specific vascular sites.** *Drug Discov Today* 7, 1138-1143.
- Ruppert, M., Aigner, S., Hubbe, M., Yagita, H. und Altevogt, P. (1995). **The L1 adhesion molecule is a cellular ligand for VLA-5.** *J Cell Biol* 131, 1881-1891.
- Ryschich, E., Schmidt, J., Hammerling, G. J., Klar, E. und Ganss, R. (2002). **Transformation of the microvascular system during multistage tumorigenesis.** *Int J Cancer* 97, 719-725.
- Sacco, R., Mismas, V., Marceglia, S., Romano, A., Giacomelli, L., Bertini, M., Federici, G., Metrangolo, S., Parisi, G., Tumino, E., Bresci, G., Corti, A., Tredici, M., Piccinno, M., Giorgi, L., Bartolozzi, C. und Bargellini, I. (2015). **Transarterial radioembolization for hepatocellular carcinoma: An update and perspectives.** *World J Gastroenterol* 21, 6518-6525, doi: 10.3748/wjg.v21.i21.6518.
- Sadej, R., Romanska, H., Baldwin, G., Gkirtzimanaki, K., Novitskaya, V., Filer, A. D., Krcova, Z., Kusinska, R., Ehrmann, J., Buckley, C. D., Kordek, R., Potemski, P., Eliopoulos, A. G., Lalani el, N. und Berditchewski, F. (2009). **CD151 regulates tumorigenesis by modulating the communication between tumor cells and endothelium.** *Mol Cancer Res* 7, 787-798, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-08-0574.
- Salem, R. und Lewandowski, R. J. (2013). **Chemoembolization and radioembolization for hepatocellular carcinoma.** *Clin Gastroenterol Hepatol* 11, 604-611; quiz e643-604, doi: 10.1016/j.cgh.2012.12.039.
- Salem, R., Parikh, P., Atassi, B., Lewandowski, R. J., Ryu, R. K., Sato, K. T., Gates, V. L., Ibrahim, S., Mulcahy, M. F., Kulik, L., Liu, D. M., Riaz, A., Omary, R. A. und Kennedy, A. S. (2008). **Incidence of radiation pneumonitis after hepatic intra-arterial radiotherapy with yttrium-90 microspheres assuming uniform lung distribution.** *Am J Clin Oncol* 31, 431-438, doi: 10.1097/COC.0b013e318168ef65.
- Salem, R. und Thurston, K. G. (2006). **Radioembolization with 90Yttrium microspheres: a state-of-the-art brachytherapy treatment for primary and secondary liver malignancies. Part 1: Technical and methodologic considerations.** *J Vasc Interv Radiol* 17, 1251-1278, doi: 10.1097/01.RVI.0000233785.75257.9A.
- Salnikova, O., Breuhahn, K., Hartmann, N., Schmidt, J. und Ryschich, E. (2013). **Endothelial plasticity governs the site-specific leukocyte recruitment in hepatocellular cancer.** *Int J Cancer* 133, 2372-2382, doi: 10.1002/ijc.28268.

- Sapsford, K. E., Algar, W. R., Berti, L., Gemmill, K. B., Casey, B. J., Oh, E., Stewart, M. H. und Medintz, I. L. (2013). **Functionalizing nanoparticles with biological molecules: developing chemistries that facilitate nanotechnology.** *Chem Rev* 113, 1904-2074, doi: 10.1021/cr300143v.
- Sato, Y., Inaba, Y., Ura, T., Nishiofuku, H., Yamaura, H., Kato, M., Takahari, D., Tanaka, T. und Muro, K. (2017). **Outcomes of a Phase I/II Trial of Hepatic Arterial Infusion of Oxaliplatin Combined with Intravenous 5-Fluorouracil and L-Leucovorin in Patients with Unresectable Liver Metastases from Colorectal Cancer After Systemic Chemotherapy Failure.** *J Gastrointest Cancer*, doi: 10.1007/s12029-016-9915-4.
- Schellenberger, E. A., Weissleder, R. und Josephson, L. (2004). **Optimal modification of annexin V with fluorescent dyes.** *Chembiochem* 5, 271-274, doi: 10.1002/cbic.200300741.
- Scherpereel, A., Rome, J. J., Wiewrodt, R., Watkins, S. C., Harshaw, D. W., Alder, S., Christofidou-Solomidou, M., Haut, E., Murciano, J. C., Nakada, M., Albelda, S. M. und Muzykantov, V. R. (2002). **Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1-directed immunotargeting to cardiopulmonary vasculature.** *J Pharmacol Exp Ther* 300, 777-786.
- Scherphof, G. L., Kamps, A. A. M. und Koning, G. A. (1997). **In vivo targeting of surface-modified liposomes to metastatically growing colon carcinoma cells and sinusoidal endothelial cells in the rat liver.** *Journal of Liposome Research* 7, 419-432, doi: 10.3109/08982109709035510.
- Scheuring, S., Muller, D. J., Ringler, P., Heymann, J. B. und Engel, A. (1999). **Imaging streptavidin 2D crystals on biotinylated lipid monolayers at high resolution with the atomic force microscope.** *J Microsc* 193, 28-35.
- Schiestel, T., Brunner, H. und Tovar, G. E. (2004). **Controlled surface functionalization of silica nanospheres by covalent conjugation reactions and preparation of high density streptavidin nanoparticles.** *J Nanosci Nanotechnol* 4, 504-511.
- Schiffelers, R. M., Koning, G. A., ten Hagen, T. L., Fens, M. H., Schraa, A. J., Janssen, A. P., Kok, R. J., Molema, G. und Storm, G. (2003). **Anti-tumor efficacy of tumor vasculature-targeted liposomal doxorubicin.** *J Control Release* 91, 115-122.
- Schlageter, M., Terracciano, L. M., D'Angelo, S. und Sorrentino, P. (2014). **Histopathology of hepatocellular carcinoma.** *World J Gastroenterol* 20, 15955-15964, doi: 10.3748/wjg.v20.i43.15955.
- Schlesinger, S., Aleksandrova, K., Pischon, T., Jenab, M., Fedirko, V., Trepo, E., Overvad, K., Roswall, N., Tjonneland, A., Boutron-Ruault, M. C., Fagherazzi, G., Racine, A., Kaaks, R., Grote, V. A., Boeing, H., Trichopoulou, A., Pantzalis, M., Kritikou, M., Mattiello, A., Sieri, S., Sacerdote, C., Palli, D., Tumino, R., Peeters, P. H., Bueno-de-Mesquita, H. B., Weiderpass, E., Quiros, J. R., Zamora-Ros, R., Sanchez, M. J., Arriola, L., Ardanaz, E., Tormo, M. J., Nilsson, P., Lindkvist, B., Sund, M., Rolandsson, O., Khaw, K. T., Wareham, N., Travis, R. C., Riboli, E. und Nothlings, U. (2013). **Diabetes mellitus, insulin treatment, diabetes duration, and risk of biliary tract cancer and hepatocellular carcinoma in a European cohort.** *Ann Oncol* 24, 2449-2455, doi: 10.1093/annonc/mdt204.
- Schmidt, J., Ryschich, E., Daniel, V., Herzog, L., Werner, J., Herfarth, C., Longnecker, D. S., Gebhard, M. M. und Klar, E. (2000). **Vascular structure and microcirculation of experimental pancreatic carcinoma in rats.** *Eur J Surg* 166, 328-335, doi: 10.1080/110241500750009195.

- Schmitt-Sody, M., Strieth, S., Krasnici, S., Sauer, B., Schulze, B., Teifel, M., Michaelis, U., Naujoks, K. und Dellian, M. (2003). **Neovascular targeting therapy: paclitaxel encapsulated in cationic liposomes improves antitumoral efficacy.** *Clin Cancer Res* 9, 2335-2341.
- Schultz, J. F. und Armant, D. R. (1995). **Beta 1- and beta 3-class integrins mediate fibronectin binding activity at the surface of developing mouse peri-implantation blastocysts. Regulation by ligand-induced mobilization of stored receptor.** *J Biol Chem* 270, 11522-11531.
- Semela, D. und Dufour, J. F. (2004). **Angiogenesis and hepatocellular carcinoma.** *J Hepatol* 41, 864-880, doi: 10.1016/j.jhep.2004.09.006.
- Sergio, A., Cristofori, C., Cardin, R., Pivetta, G., Ragazzi, R., Baldan, A., Girardi, L., Cillo, U., Burra, P., Giacomini, A. und Farinati, F. (2008). **Transcatheter arterial chemoembolization (TACE) in hepatocellular carcinoma (HCC): the role of angiogenesis and invasiveness.** *Am J Gastroenterol* 103, 914-921, doi: 10.1111/j.1572-0241.2007.01712.x.
- Seymour, L. W., Miyamoto, Y., Maeda, H., Brereton, M., Strohalm, J., Ulbrich, K. und Duncan, R. (1995). **Influence of molecular weight on passive tumour accumulation of a soluble macromolecular drug carrier.** *Eur J Cancer* 31A, 766-770.
- Shiratori, Y., Tanaka, M., Kawase, T., Shiina, S., Komatsu, Y. und Omata, M. (1993). **Quantification of sinusoidal cell function in vivo.** *Semin Liver Dis* 13, 39-49, doi: 10.1055/s-2007-1007336.
- Shuvaev, V. V., Christofidou-Solomidou, M., Scherpereel, A., Simone, E., Arguiri, E., Tliba, S., Pick, J., Kennel, S., Albelda, S. M. und Muzykantov, V. R. (2007). **Factors modulating the delivery and effect of enzymatic cargo conjugated with antibodies targeted to the pulmonary endothelium.** *J Control Release* 118, 235-244, doi: 10.1016/j.jconrel.2006.12.025.
- Siegel, R. L., Miller, K. D. und Jemal, A. (2018). **Cancer statistics, 2018.** *CA Cancer J Clin* 68, 7-30, doi: 10.3322/caac.21442.
- Siemann, D. W., Bibby, M. C., Dark, G. G., Dicker, A. P., Eskens, F. A., Horsmann, M. R., Marme, D., and Larusso, P. M. (2005). **Differentiation and definition of vascular-targeted therapies.** *Clin Cancer Res* 11, 416-420.
- Siemann, D. W., Chaplin, D. J. und Horsman, M. R. (2017). **Realizing the Potential of Vascular Targeted Therapy: The Rationale for Combining Vascular Disrupting Agents and Anti-Angiogenic Agents to Treat Cancer.** *Cancer Invest* 35, 519-534, doi: 10.1080/07357907.2017.1364745.
- Simard, P. und Leroux, J. C. (2010). **In vivo evaluation of pH-sensitive polymer-based immunoliposomes targeting the CD33 antigen.** *Mol Pharm* 7, 1098-1107, doi: 10.1021/mp900261m.
- Sincock, P. M., Mayrhofer, G. und Ashman, L. K. (1997). **Localization of the transmembrane 4 superfamily (TM4SF) member PETA-3 (CD151) in normal human tissues: comparison with CD9, CD63, and alpha5beta1 integrin.** *J Histochem Cytochem* 45, 515-525, doi: 10.1177/002215549704500404.

- Smedsrod, B., Le Couteur, D., Ikejima, K., Jaeschke, H., Kawada, N., Naito, M., Knolle, P., Nagy, L., Senoo, H., Vidal-Vanaclocha, F. und Yamaguchi, N. (2009). **Hepatic sinusoidal cells in health and disease: update from the 14th International Symposium**. *Liver Int* 29, 490-501, doi: 10.1111/j.1478-3231.2009.01979.x.
- Sofia, S. J., Premnath, V. V. und Merrill, E. W. (1998). **Poly(ethylene oxide) Grafted to Silicon Surfaces: Grafting Density and Protein Adsorption**. *Macromolecules* 31, 5059-5070, doi: 10.1021/ma971016l.
- Soloman, R. und Gabizon, A. A. (2008). **Clinical pharmacology of liposomal anthracyclines: focus on pegylated liposomal Doxorubicin**. *Clin Lymphoma Myeloma* 8, 21-32.
- Sorensen, K. K., McCourt, P., Berg, T., Crossley, C., Le Couteur, D., Wake, K. und Smedsrod, B. (2012). **The scavenger endothelial cell: a new player in homeostasis and immunity**. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 303, R1217-1230, doi: 10.1152/ajpregu.00686.2011.
- Sottani, C., Poggi, G., Quaretti, P., Regazzi, M., Montagna, B., Quaquarelli, E., Imbriani, M., Leoni, E., Di Cesare, P., Riccardi, A., Bernardo, G. und Minoia, C. (2012). **Serum pharmacokinetics in patients treated with transarterial chemoembolization (TACE) using two types of epirubicin-loaded microspheres**. *Anticancer Res* 32, 1769-1774.
- Sridhar, S. S. und Shepherd, F. A. (2003). **Targeting angiogenesis: a review of angiogenesis inhibitors in the treatment of lung cancer**. *Lung Cancer* 42 Suppl 1, S81-91.
- Steiner, M. und Neri, D. (2011). **Antibody-radionuclide conjugates for cancer therapy: historical considerations and new trends**. *Clin Cancer Res* 17, 6406-6416, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-0483.
- Storm, G., Belliot, S. O., Daemen, T. und Lasic, D. D. (1995). **Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system**. *Adv Drug Deliv Rev* 17, 31-48.
- Streubel, B., Chott, A., Huber, D., Exner, M., Jager, U., Wagner, O. und Schwarzing, I. (2004). **Lymphoma-specific genetic aberrations in microvascular endothelial cells in B-cell lymphomas**. *N Engl J Med* 351, 250-259, doi: 10.1056/NEJMoa033153.
- Strieth, S., Eichhorn, M. E., Werner, A., Sauer, B., Teifel, M., Michaelis, U., Berghaus, A. und Dellian, M. (2008). **Paclitaxel encapsulated in cationic liposomes increases tumor microvessel leakiness and improves therapeutic efficacy in combination with Cisplatin**. *Clin Cancer Res* 14, 4603-4611, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4738.
- Strübing, F. (2015) **Mikro- und makroskopisches Imaging experimenteller Lebertumoren mit Hilfe von endothelspezifischen Antikörpern**. Medizinische Dissertation in Begutachtung, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Sucandy, I., Cheek, S., Golas, B. J., Tsung, A., Geller, D. A. und Marsh, J. W. (2016). **Longterm survival outcomes of patients undergoing treatment with radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma and metastatic colorectal cancer liver tumors**. *HPB (Oxford)* 18, 756-763, doi: 10.1016/j.hpb.2016.06.010.
- Sutton, D., Nasongkla, N., Blanco, E. und Gao, J. (2007). **Functionalized micellar systems for cancer targeted drug delivery**. *Pharm Res* 24, 1029-1046, doi: 10.1007/s11095-006-9223-y.

- Tagawa, S. T., Milowsky, M. I., Morris, M., Vallabhajosula, S., Christos, P., Akhtar, N. H., Osborne, J., Goldsmith, S. J., Larson, S., Taskar, N. P., Scher, H. I., Bander, N. H. und Nanus, D. M. (2013). **Phase II study of Lutetium-177-labeled anti-prostate-specific membrane antigen monoclonal antibody J591 for metastatic castration-resistant prostate cancer.** *Clin Cancer Res* 19, 5182-5191, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0231.
- Takeichi, T., Mocevicius, P., Deduchovas, O., Salnikova, O., Castro-Santa, E., Buchler, M. W., Schmidt, J. und Ryschich, E. (2012). **alphaL beta2 integrin is indispensable for CD8+ T-cell recruitment in experimental pancreatic and hepatocellular cancer.** *Int J Cancer* 130, 2067-2076, doi: 10.1002/ijc.26223.
- Tavares, A. J., Poon, W., Zhang, Y. N., Dai, Q., Besla, R., Ding, D., Ouyang, B., Li, A., Chen, J., Zheng, G., Robbins, C. und Chan, W. C. W. (2017). **Effect of removing Kupffer cells on nanoparticle tumor delivery.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, E10871-E10880, doi: 10.1073/pnas.1713390114.
- Taverna, D. und Hynes, R. O. (2001). **Reduced blood vessel formation and tumor growth in alpha5-integrin-negative teratocarcinomas and embryoid bodies.** *Cancer Res* 61, 5255-5261.
- Tejada-Berges, T., Granai, C. O., Gordinier, M. und Gajewski, W. (2002). **Caelyx/Doxil for the treatment of metastatic ovarian and breast cancer.** *Expert Rev Anticancer Ther* 2, 143-150, doi: 10.1586/14737140.2.2.143.
- Thao, L. Q., Lee, C., Kim, B., Lee, S., Kim, T. H., Kim, J. O., Lee, E. S., Oh, K. T., Choi, H. G., Yoo, S. D. und Youn, Y. S. (2017). **Doxorubicin and paclitaxel co-bound lactosylated albumin nanoparticles having targetability to hepatocellular carcinoma.** *Colloids Surf B Biointerfaces* 152, 183-191, doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.01.017.
- Thomann, S. (2014) **Antikörper- und Nanopartikel-basierte CD146-gerichtete Anreicherungsprinzipien an das Blutgefäßsystem des hepatozellulären Karzinoms.** Medizinische Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Thomann, S., Baek, S. und Ryschich, E. (2015). **Impact of wall shear stress and ligand avidity on binding of anti-CD146-coated nanoparticles to murine tumor endothelium under flow.** *Oncotarget*, doi: 10.18632/oncotarget.5662.
- Thomann, S., Longerich, T., Bazhin, A. V., Mier, W., Schemmer, P. und Ryschich, E. (2014). **Selective targeting of liver cancer with the endothelial marker CD146.** *Oncotarget* 5, 8614-8624, doi: 10.18632/oncotarget.2345.
- Thurber, G. M., Schmidt, M. M. und Wittrup, K. D. (2008). **Antibody tumor penetration: transport opposed by systemic and antigen-mediated clearance.** *Adv Drug Deliv Rev* 60, 1421-1434, doi: 10.1016/j.addr.2008.04.012.
- Tichauer, K. M., Deharvengt, S. J., Samkoe, K. S., Gunn, J. R., Bosenberg, M. W., Turk, M. J., Hasan, T., Stan, R. V. und Pogue, B. W. (2014). **Tumor endothelial marker imaging in melanomas using dual-tracer fluorescence molecular imaging.** *Mol Imaging Biol* 16, 372-382, doi: 10.1007/s11307-013-0692-1.
- Todo, S., Makowka, L., Tzakis, A. G., Marsh, J. W., Jr., Karrer, F. M., Armany, M., Miller, C., Tallent, M. B., Esquivel, C. O., Gordon, R. D. und et al. (1987). **Hepatic artery in liver transplantation.** *Transplant Proc* 19, 2406-2411.

- Toley, B. J., Tropeano Lovatt, Z. G., Harrington, J. L. und Forbes, N. S. (2013). **Microfluidic technique to measure intratumoral transport and calculate drug efficacy shows that binding is essential for doxorubicin and release hampers Doxil**. *Integr Biol (Camb)* 5, 1184-1196, doi: 10.1039/c3ib40021b.
- Tramontano, A., Janda, K. D. und Lerner, R. A. (1986). **Chemical reactivity at an antibody binding site elicited by mechanistic design of a synthetic antigen**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 6736-6740.
- Uhl, P., Helm, F., Hofhaus, G., Brings, S., Kaufman, C., Leotta, K., Urban, S., Haberkorn, U., Mier, W. und Fricker, G. (2016). **A liposomal formulation for the oral application of the investigational hepatitis B drug Myrcludex B**. *Eur J Pharm Biopharm* 103, 159-166, doi: 10.1016/j.ejpb.2016.03.031.
- Valle, J. W., Ramanathan, R. K., Glynne-Jones, R., Anthoney, A., Berlin, J., Yazji, S. und Evans, T. (2006). **Phase II study of volociximab (M200), an alpha 5 beta 1 anti-integrin antibody in metastatic adenocarcinoma of the pancreas (MPC)**. *Journal of Clinical Oncology* 24, 205s-205s.
- van der Meel, R., Lammers, T. und Hennink, W. E. (2017). **Cancer nanomedicines: oversold or underappreciated?** *Expert Opin Drug Deliv* 14, 1-5, doi: 10.1080/17425247.2017.1262346.
- van der Meel, R., Vehmeijer, L. J., Kok, R. J., Storm, G. und van Gaal, E. V. (2013). **Ligand-targeted particulate nanomedicines undergoing clinical evaluation: current status**. *Adv Drug Deliv Rev* 65, 1284-1298, doi: 10.1016/j.addr.2013.08.012.
- van Furth, R., Cohn, Z. A., Hirsch, J. G., Humphrey, J. H., Spector, W. G. und Langevoort, H. L. (1972). **The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells**. *Bull World Health Organ* 46, 845-852.
- Veisheh, O., Gunn, J. W. und Zhang, M. (2010). **Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging**. *Adv Drug Deliv Rev* 62, 284-304, doi: 10.1016/j.addr.2009.11.002.
- Venturoli, D. und Rippe, B. (2005). **Ficoll and dextran vs. globular proteins as probes for testing glomerular permselectivity: effects of molecular size, shape, charge, and deformability**. *Am J Physiol Renal Physiol* 288, F605-613, doi: 10.1152/ajprenal.00171.2004.
- Vira, S., Mekhedov, E., Humphrey, G. und Blank, P. S. (2010). **Fluorescent-labeled antibodies: Balancing functionality and degree of labeling**. *Anal Biochem* 402, 146-150, doi: 10.1016/j.ab.2010.03.036.
- Vogl, T. J., Zangos, S., Heller, M., Hammerstingl, R. M., Bocher, E., Jacob, U. und Bauer, R. W. (2007). **[Transarterial chemoperfusion with gemcitabine and mitomycin C in pancreatic carcinoma: results in locally recurrent tumors and advanced tumor stages]**. *Rofo* 179, 1181-1188, doi: 10.1055/s-2007-963568.
- Wadkin, J. C. R., Patten, D. A., Kamarajah, S. K., Shepherd, E. L., Novitskaya, V., Berditchevski, F., Adams, D. H., Weston, C. J. und Shetty, S. (2017). **CD151 supports VCAM-1-mediated lymphocyte adhesion to liver endothelium and is upregulated in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma**. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 313, G138-G149, doi: 10.1152/ajpgi.00411.2016.

- Walton, H. L., Corjay, M. H., Mohamed, S. N., Mousa, S. A., Santomenna, L. D. und Reilly, T. M. (2000). **Hypoxia induces differential expression of the integrin receptors alpha(vbeta3) and alpha(vbeta5) in cultured human endothelial cells.** *J Cell Biochem* 78, 674-680.
- Wang, B. G. und Frober, R. (2009). **Accessory extrahepatic arteries: Blood supply of a human liver by three arteries A case report with brief literature review.** *Ann Anat* 191, 477-484, doi: 10.1016/j.aanat.2009.06.006.
- Wang, J., Tian, S., Petros, R. A., Napier, M. E. und Desimone, J. M. (2010a). **The complex role of multivalency in nanoparticles targeting the transferrin receptor for cancer therapies.** *J Am Chem Soc* 132, 11306-11313, doi: 10.1021/ja1043177.
- Wang, J. Y., Xu, X. Y., Jia, J. H., Wu, C. H. und Ge, R. W. (2010b). **Expressions of SE-1, CD31 and CD105 in the vascular endothelial cells and serum of rat with hepatocellular carcinoma.** *Chin Med J (Engl)* 123, 730-733.
- Wang, W., Shao, A., Zhang, N., Fang, J., Ruan, J. J. und Ruan, B. H. (2017). **Cationic Polymethacrylate-Modified Liposomes Significantly Enhanced Doxorubicin Delivery and Antitumor Activity.** *Sci Rep* 7, 43036, doi: 10.1038/srep43036.
- Wang, X., Mei, Z., Wang, Y. und Tang, L. (2015). **Gold nanorod biochip functionalization by antibody thiolation.** *Talanta* 136, 1-8, doi: 10.1016/j.talanta.2014.11.023.
- Weinberg, W. C., Frazier-Jessen, M. R., Wu, W. J., Weir, A., Hartsough, M., Keegan, P. und Fuchs, C. (2005). **Development and regulation of monoclonal antibody products: challenges and opportunities.** *Cancer Metastasis Rev* 24, 569-584, doi: 10.1007/s10555-005-6196-y.
- Welzel, T. M., Graubard, B. I., Zeuzem, S., El-Serag, H. B., Davila, J. A. und McGlynn, K. A. (2011). **Metabolic syndrome increases the risk of primary liver cancer in the United States: a study in the SEER-Medicare database.** *Hepatology* 54, 463-471, doi: 10.1002/hep.24397.
- Werner, M. E., Karve, S., Sukumar, R., Cummings, N. D., Copp, J. A., Chen, R. C., Zhang, T. und Wang, A. Z. (2011). **Folate-targeted nanoparticle delivery of chemo- and radiotherapeutics for the treatment of ovarian cancer peritoneal metastasis.** *Biomaterials* 32, 8548-8554, doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.07.067.
- White, G. (1992). **Heterogeneity in EC50 and nH of GABAA receptors on dorsal root ganglion neurons freshly isolated from adult rats.** *Brain Res* 585, 56-62.
- Wicki, A., Rochlitz, C., Orleth, A., Ritschard, R., Albrecht, I., Herrmann, R., Christofori, G. und Mamot, C. (2012). **Targeting tumor-associated endothelial cells: anti-VEGFR2 immunoliposomes mediate tumor vessel disruption and inhibit tumor growth.** *Clin Cancer Res* 18, 454-464, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1102.
- Wilchek, M. und Bayer, E. A. (1990). **Introduction to avidin-biotin technology.** *Methods Enzymol* 184, 5-13.
- Wilchek, M., Bayer, E. A. und Livnah, O. (2006). **Essentials of biorecognition: the (strept)avidin-biotin system as a model for protein-protein and protein-ligand interaction.** *Immunol Lett* 103, 27-32, doi: 10.1016/j.imlet.2005.10.022.

- Winkler, N., Strubing, F., Gross, W., Mier, W. und Ryschich, E. (2018). **Phenomenon of endothelial antibody capture: Principles and potential for locoregional targeting of hepatic tumors.** *Hepatology*, doi: 10.1002/hep.30072.
- Wobus, M., Vogel, B., Schmucking, E., Hamann, J. und Aust, G. (2004). **N-glycosylation of CD97 within the EGF domains is crucial for epitope accessibility in normal and malignant cells as well as CD55 ligand binding.** *Int J Cancer* 112, 815-822, doi: 10.1002/ijc.20483.
- Wolfram, J., Nizzero, S., Liu, H., Li, F., Zhang, G., Li, Z., Shen, H., Blanco, E. und Ferrari, M. (2017). **A chloroquine-induced macrophage-preconditioning strategy for improved nanodelivery.** *Sci Rep* 7, 13738, doi: 10.1038/s41598-017-14221-2.
- Woodfin, A., Voisin, M. B. und Nourshargh, S. (2007). **PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 2514-2523, doi: 10.1161/ATVBAHA.107.151456.
- Wu, L. Q., Zhang, W. J., Niu, J. X., Ye, L. Y., Yang, Z. H., Grau, G. E. und Lou, J. N. (2008). **Phenotypic and functional differences between human liver cancer endothelial cells and liver sinusoidal endothelial cells.** *J Vasc Res* 45, 78-86, doi: 10.1159/000109079.
- Wu, M., Frieboes, H. B., McDougall, S. R., Chaplain, M. A., Cristini, V. und Lowengrub, J. (2013). **The effect of interstitial pressure on tumor growth: coupling with the blood and lymphatic vascular systems.** *J Theor Biol* 320, 131-151, doi: 10.1016/j.jtbi.2012.11.031.
- Xiao, F. und Hrabetova, S. (2009). **Enlarged extracellular space of aquaporin-4-deficient mice does not enhance diffusion of Alexa Fluor 488 or dextran polymers.** *Neuroscience* 161, 39-45, doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.03.017.
- Xiao, Z., Levy-Nissenbaum, E., Alexis, F., Luptak, A., Teply, B. A., Chan, J. M., Shi, J., Digga, E., Cheng, J., Langer, R. und Farokhzad, O. C. (2012). **Engineering of targeted nanoparticles for cancer therapy using internalizing aptamers isolated by cell-uptake selection.** *ACS Nano* 6, 696-704, doi: 10.1021/nn204165v.
- Yamamoto, T., Hirohashi, K., Kaneda, K., Ikebe, T., Mikami, S., Uenishi, T., Kanazawa, A., Takemura, S., Shuto, T., Tanaka, H., Kubo, S., Sakurai, M. und Kinoshita, H. (2001). **Relationship of the microvascular type to the tumor size, arterIALIZATION and dedifferentiation of human hepatocellular carcinoma.** *Jpn J Cancer Res* 92, 1207-1213.
- Yang, Z. F. und Poon, R. T. (2008). **Vascular changes in hepatocellular carcinoma.** *Anat Rec (Hoboken)* 291, 721-734, doi: 10.1002/ar.20668.
- Yano, S., Kaku, S., Suzuki, K., Terazaki, C., Sakayori, T., Kawasaki, T., Kawamura, K., Sugita, Y., Hoshino, K. und Masuho, Y. (1995). **Natural antibodies against the immunoglobulin F(ab')₂ fragment cause elimination of antigens recognized by the F(ab')₂ from the circulation.** *Eur J Immunol* 25, 3128-3133, doi: 10.1002/eji.1830251121.
- Yao, S., Zhang, J., Chen, H., Sheng, Y., Zhang, X., Liu, Z. und Zhang, C. (2013). **Diagnostic value of immunohistochemical staining of GP73, GPC3, DCP, CD34, CD31, and reticulin staining in hepatocellular carcinoma.** *J Histochem Cytochem* 61, 639-648, doi: 10.1369/0022155413492771.

- Yumura, K., Ui, M., Doi, H., Hamakubo, T., Kodama, T., Tsumoto, K. und Sugiyama, A. (2013). **Mutations for decreasing the immunogenicity and maintaining the function of core streptavidin.** *Protein Sci* 22, 213-221, doi: 10.1002/pro.2203.
- Zamboni, W. C. (2005). **Liposomal, nanoparticle, and conjugated formulations of anticancer agents.** *Clin Cancer Res* 11, 8230-8234, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1895.
- Zechmann, C. M., Afshar-Oromieh, A., Armor, T., Stubbs, J. B., Mier, W., Hadaschik, B., Joyal, J., Kopka, K., Debus, J., Babich, J. W. und Haberkorn, U. (2014). **Radiation dosimetry and first therapy results with a (124)I/ (131)I-labeled small molecule (MIP-1095) targeting PSMA for prostate cancer therapy.** *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 41, 1280-1292, doi: 10.1007/s00259-014-2713-y.
- Zhang, B. H., Yang, B. H. und Tang, Z. Y. (2004). **Randomized controlled trial of screening for hepatocellular carcinoma.** *J Cancer Res Clin Oncol* 130, 417-422, doi: 10.1007/s00432-004-0552-0.
- Zhang, X., Cheng, S. L., Bian, K., Wang, L., Zhang, X., Yan, B., Jia, L. T., Zhao, J., Gammoh, N., Yang, A. G. und Zhang, R. (2015). **MicroRNA-26a promotes anoikis in human hepatocellular carcinoma cells by targeting alpha5 integrin.** *Oncotarget* 6, 2277-2289, doi: 10.18632/oncotarget.2956.
- Zhang, X., Wang, Q., Qin, L., Fu, H., Fang, Y., Han, B. und Duan, Y. (2016). **EGF-modified mPEG-PLGA-PLL nanoparticle for delivering doxorubicin combined with Bcl-2 siRNA as a potential treatment strategy for lung cancer.** *Drug Deliv* 23, 2936-2945, doi: 10.3109/10717544.2015.1126769.
- Zhang, X., Xiong, Z., Wu, Y., Cai, W., Tseng, J. R., Gambhir, S. S., and Chen, X. (2006). **Quantitative PET imaging of tumor integrin alphavbeta3 expression with 18F-FRGD2.** *Nucl. Med.* 47, 113-121.
- Zhao, C., Feng, Q., Dou, Z., Yuan, W., Sui, C., Zhang, X., Xia, G., Sun, H. und Ma, J. (2013). **Local targeted therapy of liver metastasis from colon cancer by galactosylated liposome encapsulated with doxorubicin.** *PLoS One* 8, e73860, doi: 10.1371/journal.pone.0073860.
- Zhao, H. und Shaqfeh, E. S. (2011). **Shear-induced platelet margination in a microchannel.** *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 83, 061924, doi: 10.1103/PhysRevE.83.061924.
- Zhao, N., Sun, H., Sun, B., Zhu, D., Zhao, X., Wang, Y., Gu, Q., Dong, X., Liu, F., Zhang, Y. und Li, X. (2016). **miR-27a-3p suppresses tumor metastasis and VM by down-regulating VE-cadherin expression and inhibiting EMT: an essential role for Twist-1 in HCC.** *Sci Rep* 6, 23091, doi: 10.1038/srep23091.
- Zheng, J. C., Lei, N., He, Q. C., Hu, W., Jin, J. G., Meng, Y., Deng, N. H., Meng, Y. F., Zhang, C. J. und Shen, F. B. (2012). **PEGylation is effective in reducing immunogenicity, immunotoxicity, and hepatotoxicity of alpha-momorcharin in vivo.** *Immunopharmacol Immunotoxicol* 34, 866-873, doi: 10.3109/08923973.2012.666979.
- Zhu, A. X., Duda, D. G., Sahani, D. V. und Jain, R. K. (2011). **HCC and angiogenesis: possible targets and future directions.** *Nat Rev Clin Oncol* 8, 292-301, doi: 10.1038/nrclinonc.2011.30.
- Zhu, X. W. und Gong, J. P. (2013). **Expression and role of icam-1 in the occurrence and development of hepatocellular carcinoma.** *Asian Pac J Cancer Prev* 14, 1579-1583.

7 EIGENANTEIL AN DATENERHEBUNG UND –AUSWERTUNG UND EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN

Diese Arbeit entstand mithilfe der finanziellen Unterstützung des Deutsche Krebshilfe e.V.

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden in folgendem Aufsatz vorab publiziert:

Winkler, N., Strübing, F., Groß, W., Mier, W. und Ryschich, E. (2018). **Phenomenon of endothelial antibody capture: principles and potential for locoregional targeting of hepatic tumors.** *Hepatology*. doi: 10.1002/hep.30072. (*Impact factor* 13,2)

Für die vorliegende Arbeit erhobene und in obiger Publikation veröffentlichte Daten sind im Ergebnisteil in den Abschnitten 3.1.1 (nur Mausdaten), 3.1.2 sowie im kompletten Abschnitt 3.2 beschrieben. Die dazugehörige Diskussion ist in den Abschnitten 4.1, 4.2 sowie teilweise in 4.8 zu finden. Alle in diesen Abschnitten aufgeführte, den Antikörperklon CD49e (5H10-27) betreffende Erkenntnisse wurden jedoch noch nicht veröffentlicht.

Mein Eigenanteil an obiger Publikation umfasst die Immunfluoreszenzfärbungen in Mausgewebe, das Akquirieren aller EC₅₀-Daten, die Aviditätsbestimmung in LSEC, das Durchführen der *ex vivo*-Experimente an der isolierten Mausleber und somit Charakterisierung der Anreicherungsmechanismen von Antikörpern am Endothel, die Vor- und Nachbereitung der *in vivo* i.a.-Applikation in RMS-tumortragenden Mäusen, die Auswertung aller aus den vorgenannten Experimenten hervorgegangenen Daten sowie das Schreiben von ca. 50% des Manuskriptentwurfs, insbesondere des Material- und Methodenteils, des Ergebnisteils, der meine Daten beschreibt und der Erstellung der daraus hervorgegangenen Abbildungen.

Die in der Publikation veröffentlichten *in vivo*-Daten mit radioaktiv markiertem Isotyp- und CD146-Antikörper (LPS/LAS-tumortragende Mäuse) wurden vor Beginn meiner Arbeit von Herrn Felix Strübing erhoben und fungierten somit als deren Grundlage. Entsprechende Daten wurden daher zum Vergleich in Abschnitt 4.2 diskutiert, um die hier präsentierten Daten in Relation setzen zu können und die Einordnung in den Gesamtkontext zu ermöglichen.

Weitere eigene Veröffentlichungen

Stempin, S., Engel, A., Winkler, N., Buhrke, T. und Lampen, A. (2015). **Morphological and molecular characterization of the human breast epithelial cell line M13SV1 and its tumorigenic derivatives M13SV1-R2-2 and M13SV1-R2-N1.** *Cancer Cell Int* 15, 110, doi: 10.1186/s12935-015-0262-5.

LEBENS LAUF

Personalien

Name: Nora Winkler
Geburtsdatum: 15.11.1989
Geburtsort: Dresden
Staatsangehörigkeit: deutsch

Berufserfahrung / Praktische Tätigkeiten

September 2015 – **Promotion**
August 2018 Universitätsklinikum Heidelberg, Sektion Chirurgische Forschung
Endotheliale Anreicherung: Konzept, Mechanismen und Potential für Tumor-Targeting mithilfe von Antikörpern und Nanopartikeln

August 2013 – **Diplomarbeit**
Juni 2014 Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin
The influence of the soy-derived isoflavone genistein on the miRNA profile of human breast epithelial cells of different tumorigenic stages

November 2012 – **Laborassistentz**
Juni 2013 Leibniz-Institut für Plasmaforschung und Technologie e.V., Greifswald

Mai – Juni 2012 **Laborpraktikum**
Dalhousie University, Halifax, Kanada

Ausbildung

September 2011 – **Auslandsstudium: Human Nutritional Science**
April 2012 University of Manitoba, Winnipeg, Kanada

Oktober 2008 – **Studium der Humanbiologie**
Juni 2014 Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald
Hauptfach: Humanökologie/Ökotoxikologie
Nebenfächer: Pathologie und Pharmakologie

7. Mai 2008 **Abitur**

2000 – 2008 Pestalozzi Gymnasium, Heidenau

1999 – 2000 Heinrich-Heine Grundschule, Heidenau

1996 – 1999 12. Grund- und Mittelschule, Dresden

DANKSAGUNG

Meinen Eltern, Frau Dr. **Uta Wienecke** und Herrn Dr. **Marko Winkler**, meinem Stiefvater, Herrn **Stephan Wienecke** sowie Frau **Evelyn Schröder** danke ich für ihre kontinuierliche Motivation und facettenreiche Unterstützung während des Studiums sowie von der ersten bis zur letzten Minute dieser Arbeit, ohne die so manches nicht möglich gewesen wäre.

Herrn Prof. Dr. **Eduard Ryschich** danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, die intensive und kontinuierliche Betreuung sowie den permanenten Austausch von Ideen zur Optimierung des Projekts.

Herrn **Andreas Termer**, meinem treuen Begleiter seit (fast) der ersten Stunde meiner Promotionszeit, danke ich für seine immense Geduld mit mir, insbesondere in den äußerst stressigen Phasen, seinen fachlichen Input sowie die Diskussion meiner Ergebnisse und die kritische Durchsicht meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. **Walter Mier** danke ich für die Antikörper-Konjugierung mit radioaktiven Isotopen und das Angebot, seine Räumlichkeiten für diverse Experimente nutzen zu dürfen. Darüber hinaus danke ich ihm für seine konstruktive Kritik bezüglich des Projekts.

Herrn Dr. **Wolfgang Groß** danke ich für die Bereitstellung der sctmult-Software, seine Hilfe bei der statistischen Auswertung der erhobenen Daten sowie seine kritischen Anmerkungen.

Frau **Claudia Bernardi-Neuwirth** danke ich für ihre umfangreiche Unterstützung im Laboralltag im ersten Jahr meiner Promotion, insbesondere bei der LSEC-Isolierung und Herstellung von Kryoschnitten, sowie ihre Fähigkeit, den manchmal stressigen Laboralltag mit Worten oder kleinen Aufmerksamkeiten aufzulockern.

Frau **Ankica Stanić**, Frau **Sonja Bauer** und Frau **Ellen Watson** danke ich für ihre Unterstützung im Laboralltag sowie bei organisatorischen Angelegenheiten.

Herrn Dr. **Philipp Uhl** danke ich für seine umfassende Hilfe bei der Charakterisierung meiner Liposomen.

Frau **Karin Leotta** danke ich für ihre exzellente technische Hilfestellung bei den Bioverteilungsstudien von Radioisotopen.

Frau **Lisa Keßler** danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Frau Dr. **Nina Waldburger** danke ich für die Kategorisierung der humanen Gewebeproben.

Dem **Deutsche Krebshilfe e.V.** danke ich für die Bereitstellung der finanziellen Mittel, die diese Arbeit überhaupt erst möglich gemacht haben.

EIDESSTÄTLICHE VERSICHERUNG

1. Bei der eingereichten Dissertation zu dem Thema

Endotheliale Anreicherung: Konzept, Mechanismen und Potential für Tumor-Targeting mithilfe von Antikörpern und Nanopartikeln

handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.

2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.
3. Die Arbeit oder Teile davon habe ich bislang nicht an einer Hochschule des In- oder Auslands als Bestandteil einer Prüfungs- oder Qualifikationsleistung vorgelegt.
4. Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärungen bestätige ich.
5. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt. Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erkläre und nichts verschwiegen habe.

Ort und Datum

Unterschrift