

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung im Walter-Brendel-Zentrum
für experimentelle Medizin der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Leiter: Prof. Dr. M. Pohl

**Nicht-invasive Untersuchung der Tumormikrozirkulation
mittels dynamischer Magnet-Resonanz-Tomographie
während antivaskulärer Therapie**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Sven Becker
aus Schramberg
2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Marc Dellian
Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Walter Koch
Priv. Doz. Dr. med. Christiane J. Bruns

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Martin E. Eichhorn

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser

Tag der mündlichen Prüfung: 16.10.2008

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	10
1.	Vorbemerkung	10
2.	Pathophysiologie der Tumorangiogenese	11
3.	Gliederung und Definition antivaskulärer Therapie	12
4.	Vaskular Targeting	13
5.	Vascular Targeting mit MBT0206	17
6.	Nicht-invasive Untersuchung der Tumormikrozirkulation	17
7.	Fragestellung und Zielsetzung	18
II.	Methodik	19
1.	Methodik der experimentellen Studien	19
1.1	Versuchstiere und deren Haltung	19
1.2	Subkutanes Tumormodell	19
1.2.1	Tumor	19
1.2.2	Kultur der Tumorzellen	19
1.2.3	Vorbereitung der Tumorzellen zur Implantation	20
1.2.4	Implantation der Tumorzellen unter die Rückenhaut	20
1.2.5	Dokumentation des Tumorwachstums	20
1.3	Wiegen der Versuchstiere	21
1.4	Implantation von Verweilkathetern	21
1.5	MBT0206	21
1.5.1	Herstellung der Liposomen	21
1.5.2	Kontrolle der Liposomen	23
1.6	Studie I	23
1.6.1	Zeitlicher Ablauf des Versuchsprotokolls	23
1.6.2	Versuchs- und Kontrollgruppen	24
1.6.3	Dynamische Magnet-Resonanz-Tomographie	25
1.6.3.1	MRT Gerät	25
1.6.3.2	Durchführung der dMRT-Messungen	25
1.6.3.3	T1-Snap-Shot-FLASH-Sequenz	26
1.6.3.4	Kontrastmittel: Gadolinium-DTPA (Magnevist®)	28

1.6.4	Histologie	28
1.6.4.1	Schneiden der Tumoren	28
1.6.4.2	Immunhistochemie (CD31-Färbung)	28
1.6.4.3	Hematoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)	29
1.6.5	Quantifizierte Parameter	29
1.6.5.1	Tumorwachstum	30
1.6.5.2	Parameter der dynamischen Magnet-Resonanz-Tomographie	30
1.6.5.2.1	Konzentration-Zeit-Kurven im arteriellen Blut und Tumorgewebe	30
1.6.5.2.2	Berechnung der Perfusion-like-Parameters	32
1.6.5.2.3	Berechnung der quantitativen Parameter	32
1.6.5.3	Parameter der histologischen Aufarbeitung der Tumore	35
1.6.5.3.1	Gefäßdichte	35
1.6.5.3.2	Thrombosen	35
1.7	Studie II	35
1.7.1	Zeitlicher Ablauf des Versuchsprotokolls	36
1.7.2	Versuchs- und Kontrollgruppe	36
1.7.3	Dynamische-Magnet-Resonanz-Tomographie	37
1.7.3.1	Makromolekulares Kontrastmittel: Gadolinium-Albumin	37
1.7.4	Quantifizierte Parameter der dMRT	38
1.8	Ein- und Ausschlusskriterien	39
1.9	Statistische Auswertung	39
2.	Methodik der klinischen Studie	39
2.1	Studienziel	39
2.2	Patienten	39
2.2.1	Einschlusskriterien	39
2.2.2	Ausschlusskriterien	40
2.3	Herstellung und Kontrolle der Liposomen	41
2.4	Zeitlicher Ablauf des Versuchsprotokolls	41
2.5	Versuchsgruppen	41
2.6	Dynamische Magnet-Resonanz-Tomographie	42
2.6.1	MRT Gerät	42
2.6.2	Durchführung der dMRT-Messungen	42
2.6.3	Kontrastmittel	43
2.6.4	T1-Turbo-FLASH-Sequenz	43

2.7	Quantifizierte Parameter der dMRT	44
2.7.1	Konzentrations-Zeit-Kurven im arteriellen Blut und Tumorgewebe	44
2.7.2	Berechnung der quantitativen Parameter	45
III.	Ergebnisse	46
1.	Ergebnisse der experimentellen Studien	46
1.1	Studie I	46
1.1.1	Subkutanes Tumorwachstum	46
1.1.2	Ergebnisse der dMRT	47
1.1.2.1	Konzentrations-Zeit-Kurve im arteriellen Blut	47
1.1.2.2	Konzentrations-Zeit-Kurven im Tumorgewebe	48
1.1.2.3	Perfusion-like-Parameters	51
1.1.2.4	Quantitative Parameter	52
1.1.2.4.1	Intratumorales Blutvolumen (rBV)	53
1.1.2.4.2	Intratumoraler Blutfluss (rBF)	54
1.1.2.4.3	Permeabilitäts-Oberflächen-Produkt (PS/V)	55
1.1.3	Ergebnisse der histologischen Untersuchungen	56
1.2	Studie II	60
1.2.1	Konzentrations-Zeit-Kurven im arteriellen Blut	60
1.2.2	Konzentrations-Zeit-Kurven im Tumorgewebe	62
1.2.3	Steigung der Regressionsgeraden in der späten Phase	64
2.	Ergebnisse der klinischen Studie	65
2.1	Patient I	65
2.1.1	Konzentrations-Zeit-Kurven in arteriellem Blut und Tumorgewebe	66
2.1.2	Quantitative Parameter	66
2.2	Patient II	68
2.2.1	Konzentrations-Zeit-Kurven in arteriellem Blut und Tumorgewebe	68
2.2.2	Quantitative Parameter	69
IV.	Diskussion	71
1.	Diskussion der experimentellen Studien	71
1.1	Methodik	71
1.1.1	Subkutanes Tumormodell	71
1.1.1.1	Das amelanotische Hamstermelanom A-Mel-3	71
1.1.1.2	Messung des subkutanen Tumorwachstums	72
1.1.2	Versuchsprotokoll und Durchführung der Messung	72

1.1.3	dMRT und Tracerkinetische Modelle	73
1.1.4	Histologie	78
1.2	Ergebnisse	79
1.2.1	Studie I	79
1.2.2	Studie II	84
2.	Diskussion der klinischen Studie	85
2.1	Methodik	85
2.1.1	Vergleichbarkeit der Patienten	85
2.1.2	Versuchsprotokoll und Durchführung der Messung	86
2.2	Ergebnisse	87
V.	Zusammenfassung und Schlussfolgerung	89
VI.	Literaturverzeichnis	91
	 Veröffentlichte Teilaspekte der Arbeit	 101
	 Abschließende Bemerkung	 103
	 Lebenslauf	 105

Abkürzungsverzeichnis

A-Mel-3	amelanotisches Hamstermelanom 3
<i>b</i>	Breite
β	Relaxivitätskonstante des jeweiligen Kontrastmittels
<i>C</i>	Konzentration
°C	Grad Celsius
Ca	Calcium
CD31 (PECAM-1)	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
CT	Computer Tomographie
<i>d</i>	Tag/Durchmesser
Δ	Delta
dMRT	dynamische Magnet Resonanz Tomographie
D	Dalton (Molekulargewicht)
DOPC	1,2 Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DOTAP	1,2 Dioleoyl-3-Trimethylammonium-Propan
EKG	Elektrokardiographie
<i>f</i>	relatives Volumen
<i>F</i>	kapilärer Plasmafluss
<i>g</i>	Erdbeschleunigung 9,81 m/s ²
G	Gauch
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
Gy	Grey
<i>h</i>	Höhe
Hb	Hämoglobin
HE	Hämatoxilin-Eosin-Färbung
HIV	humanes Immundefizienzvirus
H ₂ O	Wasser
<i>I</i>	Interstitium
ID	Innendurchmesser
i.v.	intravenös
KG	Körpergewicht

<i>l</i>	Länge
Mg	Magnesium
MRT	Magnet Resonanz Tomographie
NaCl	Natriumchlorid
NYHA	New York Heart Association
O ₂	Sauerstoff
OD	Aussendurchmesser
<i>P</i>	Plasma
<i>PS</i>	Permeabilitäts-Oberflächen-Produkt
<i>rBV</i>	Intratumorales Blutvolumen
<i>rBF</i>	Intratumoraler Blutfluss/Perfusion
<i>R</i>	Relaxivität
RGB	Rot Grün Blau
ROI	Region of Interest
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (standard error of the mean)
TE	Echozeit
TI	Inversionszeit
TR	Repetitionszeit
V	Volumen
WBC	White Blood Cell Count (Leukozytenzahl)

I. Einleitung

1. Vorbemerkung

Geschätzt erkranken in Deutschland jährlich ca. 218.000 Männer und ca. 206.000 Frauen neu an Krebs. Diese Zahlen wurden im Februar 2006 vom Robert Koch Institut in Verbindung mit der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. in der 5. überarbeiteten Auflage von „Krebs in Deutschland“ veröffentlicht und beziehen sich auf das Jahr 2002. Eingeschlossen in diese Berechnungen sind alle soliden Tumoren sowie die primär systemischen Lymphome und Leukämien. Mit über 209.000 Sterbefällen im Jahr 2002 rangieren die malignen Erkrankungen auf Platz 2 der häufigsten Todesursachen hinter den kardiovaskulären Erkrankungen. Ein wichtiger Risikofaktor für die Gefährdung an Krebs zu erkranken ist in den Industrieländern neben dem Rauchen das steigende Lebensalter. Laut Statistischem Bundesamt stieg allein im Zeitraum von 1998 bis 2001 die Lebenserwartung von Frauen von 80,27 auf 81,07 Jahre, die der Männer im gleichen Zeitraum von 74,04 auf 75,11 Jahre. Für das Jahr 2050 geht man von einer Lebenserwartung von 86,6 Jahren für Frauen und 81,1 Jahren für Männer aus (Pressemitteilung des statistischen Bundesamtes vom 6. Juni 2003). Da die Inzidenz für Neoplasien im Alter über 60 Jahre stark zunimmt, wird deutlich wie wichtig die Entwicklung neuer Therapiekonzepte bei der Bekämpfung dieser Erkrankungen in Zukunft sein wird. Die zunehmende Alterung der Gesellschaft, verbunden mit einer steigenden Zahl an malignen Erkrankungen, stellt aber nicht nur in Deutschland, sondern auch in anderen weit entwickelten Ländern auf der ganzen Welt, ein Problem dar (Bray *et al.* 2002; Dinse *et al.* 1999; Merrill and Weed 2001).

Trotz der großen Forschungsanstrengungen der letzten Jahrzehnte, die einen immensen Zuwachs an Grundlagenwissen über die Entstehung und das Wachstum von Tumoren erbrachte, konnten nur wenige neue Therapiestrategien aus der experimentellen Forschung in klinische Studien übernommen werden. Die Therapie maligner Erkrankungen stützt sich nach wie vor auf die drei Hauptpfeiler der Onkologie, die Chirurgie, die Chemotherapie und die Strahlentherapie. Neuere Therapieverfahren, wie die antivaskuläre Tumorthherapie, die mit ersten viel versprechenden klinischen Studienergebnissen aufwarten, könnten dem in naher Zukunft ein weiteres Standbein hinzufügen.

2. Pathophysiologie der Tumorangiogenese

Die Besonderheit des Gefäßsystems eines Tumors wurde erstmals von Rudolph Virchow im Jahre 1863 beschrieben (Balkwill and Mantovani 2001), aber erst 44 Jahre später durch Goldman systematisch bearbeitet (Goldman 1907). Er stellte fest, dass sich im proliferierenden Randbereich von Tumoren Gefäße mit chaotischer Struktur, Kalibersprüngen und Gefäßaussprossungen bilden. Weitere 38 Jahre vergingen bis Algire and Chalkley einen notwendigen Zusammenhang zwischen Tumorwachstum und der Ausbildung eines eigenen Gefäßnetzwerkes herstellen konnten (Algire and Chalkley 1945). Das heutige Verständnis der Angiogenese geht im wesentlichen auf die Forschungsarbeit von Judah Folkman zurück (Folkman 1971). Er formulierte darüber hinaus einen neuen Therapieansatz bei dem Metastasierung und Tumorwachstum über die Inhibierung der Tumorangiogenese verhindert werden soll.

Angiogenese ist aber nicht ausschließlich ein pathophysiologischer Prozess, sie findet im menschlichen Körper auch bei physiologischen Vorgängen statt. Zum einen im Verlauf des weiblichen Menstruationszyklus und zum anderen in der Vaskulogenese des sich entwickelnden Embryos (D'Amore and Thompson 1987; Folkman 1995; Risau 1997). Darüber hinaus spielt die Angiogenese bei weiteren pathophysiologischen Prozessen wie der Entstehung der rheumathoiden Arthritis (Folkman 1995), der diabetischen Retinopathie (Hammes *et al.* 1996) sowie bei der Wundheilung eine wichtige Rolle (Clark *et al.* 1982; Tonnesen, Feng, and Clark 2000).

Heute ist nachhaltig belegt, dass sich solide Tumoren bzw. Zellnester entarteter Zellen bis zu einem Volumen von bis zu 2 mm^3 durch Diffusion aus dem umliegenden Gewebe ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen können. In diesem Stadium der „tumor dormancy“ können die Zellen über Jahre verweilen (Naumov *et al.* 2006). Wodurch es, oft erst nach Jahren, zum „Angiogenic Switch“, also der Produktion und Sekretion von angiogenetischen Substanzen aus den Tumorzellen und somit zu einer Umstrukturierung des noch ungeordneten, „schlafenden“ Zellhaufens in einen endothelzellaktivierenden Zellverband kommt, ist bis heute nicht abschließend geklärt (Naumov, Akslen, and Folkman 2006). Entscheidend sind vermutlich Veränderungen im Tumormikromilieu wie eine Erhöhung des $p\text{CO}_2$, eine Verringerung des $p\text{O}_2$ oder der Abfall des pH-Wertes (Bergers and Benjamin 2003). Die aktivierten Zellen synthetisieren sowohl proteolytische wie auch endothelzellaktivierende Substanzen und setzen diese frei. Proteolytisch wirksame Matrix Metalloproteinasen sind in der Lage, das umgebende Gewebe anzudauen und machen damit

den Weg frei für die Einsprossung der Endothelzellen in Richtung des angiogenetischen Stimulus. Die Aktivierung der Endothelzellen kommt dabei wesentlich über den Vaskular Endothelial Growth Factor (VEGF) zustande. Zur Aktivierung weiterer Zellpopulationen tragen der basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) sowie der Plateled Derived Growth Factor (PDGF) bei. Die Migration der Endothelzellen und das Remodelling der Extrazellulären Matrix werden durch die Expression von Adhäsionsmolekülen, wie $\alpha_v\beta_3$, auf den Endothelzellen erleichtert. Nach der Bildung der Basalmembran werden schließlich Pericyten rekrutiert, die ein die Gefäße umgebendes Stützgewebe formen (Hammersen, Endrich, and Messmer 1985). Entstanden ist nun ein neues, den Tumor nutritiv versorgendes Gefäßsystem, das weiteres Wachstum und Metastasierung ermöglicht (Sutherland 1988). Das Tumorendothel zeichnet sich dabei im Gegensatz zu normalem Endothel durch eine chaotische Architektur mit oft nur bruchstückhaft ausgebildeter Basalmembran, großen interzellulären Lücken und einer damit verbundenen stark erhöhten Permeabilität aus. Eine Unterscheidung in Arteriolen und Venolen ist nicht möglich.

3. Gliederung und Definition antivaskulärer Therapie

Aus dem Wissen über die Angiogenese lassen sich zwei große Therapiekonzepte im Sinne einer antivaskulären Therapie ableiten (**Abb. 1**). Zum einen ergibt sich die Möglichkeit einen oder mehrere Schritte des oben beschriebenen Prozesses zu inhibieren und damit die Vaskularisierung des Tumors zu unterbinden (Antiangiogenese), zum anderen bieten die doch deutlichen strukturellen Unterschiede des Tumorendothels im Vergleich zum normalen Endothel die Möglichkeit, dieses gezielt zu attackieren und so einen bereits vaskularisierten Tumor von seiner nutritiven Versorgung abzuschneiden (Vaskular Targeting). Primärer Angriffspunkt der antivaskulären Therapie ist somit nicht wie bei der klassischen Chemotherapie die Tumorzelle, sondern das diese Zellen versorgende Blutgefäßsystem.

Höchst relevant für die Inhibierung der Angiogenese scheint hauptsächlich die Blockierung der durch VEGF und α -Integrine vermittelten Endothelzellaktivierung zu sein. In die durch VEGF vermittelte Signaltransduktion lässt sich an verschiedenen Stellen eingreifen. Der monoklonale Antikörper Bevacuzimab (Avastin[®]), der als erste antiangiogenetische Substanz die klinische Zulassung erhalten hat, bindet freies VEGF, welches so bereits vor dem Kontakt mit der Endothelzelle eliminiert wird (Hurwitz *et al.* 2004). IMC-1C11 geht dagegen eine Verbindung mit der extrazellulären Domäne des VEGF-Rezeptors auf der Oberfläche der Endothelzelle ein. Dies führt zu einer Blockage des VEGF-Rezeptors (Posey *et al.* 2003; Gordon *et al.* 2001; Margolin *et al.* 2001; Mross *et al.* 2005). Wiederum andere

kleinmolekulare Substanzen, wie SU5416 und SU6668, blockieren nach dem Eindringen in die Zelle die Tyrosin-Kinase des VEGF-Rezeptors und verhindern somit eine intrazelluläre Signaltransduktion (Bergers *et al.* 2003).

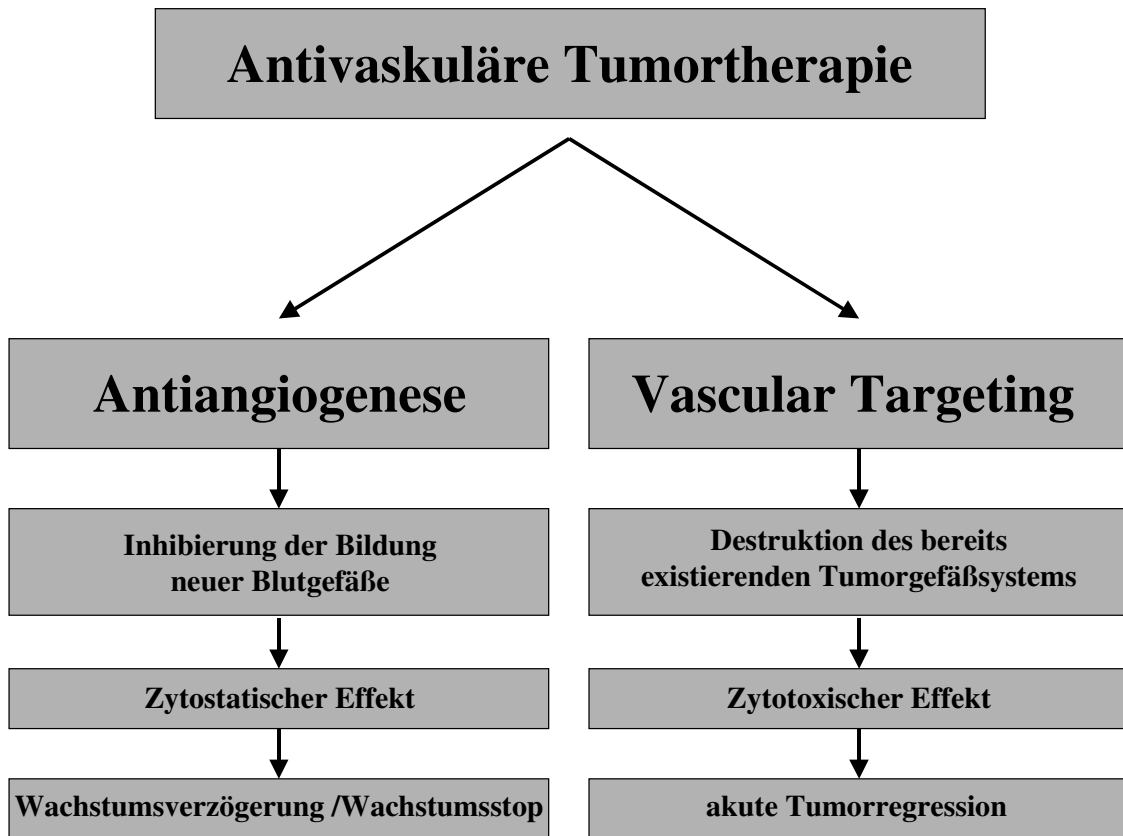


Abb. 1: Gliederung Antivaskulärer Tumorthherapie in die zwei Hauptrichtungen Antiangiogenese und Vascular Targeting.

Weitere therapeutische Ansätze sind in experimenteller Erprobung, klinische Studien stehen zu vielen Substanzen aber noch aus. Allerdings konnte keine der bisher in der Klinik als Monotherapie eingesetzten Formulierungen die Effektivität aus den experimentellen Tierstudien reproduzieren.

4. Vaskular Targeting

Der therapeutische Ansatz, bereits bestehendes Tumorendothel selektiv zu schädigen, (Vascular Targeting) geht auf Juliana Denekamp aus dem Jahr 1984 zurück (Denekamp1984). Sie konnte zeigen, dass sich die Zahl der durch ein einziges Blutgefäß versorgter Zellen im Tumor stark von der Zahl in Normalgewebe unterscheidet. Werden in normalem Gewebe nur wenige Zellschichten von einem Gefäß versorgt so können dies im

Tumor mehrere Hundert sein (Denekamp 1999). Bereits geringgradige Schädigungen des Endothels führen zum Untergang der ohnehin schon kritisch versorgten äußeren Zellschichten, Nekrose und Apoptose sind die Folge. Ein weiterer Vorteil gegenüber herkömmlichen Chemotherapeutika, die ja bis dato direkt auf die Zerstörung der Tumorzellen abzielten, besteht darin, dass bei i.v.-Applikation von Vascular Targeting Substanzen keinerlei Barrieren überwunden werden müssen, denn die Endothelzellen der Tumorblutgefäße stehen in direktem Kontakt mit dem Intravasalen Kompartiment (Jain 1994; Jain 1996; Jain 2001). Das Target der Therapie, die Endothelzelle, kann also direkt erreicht werden. Zudem sind die an der Proliferation neuer Tumorgefäße beteiligten Endothelzellen nicht wie die Tumorzellen neoplastisch, weisen genetisch eine höhere Stabilität auf und zeigen dadurch eine sehr langsame Resistenzentwicklung gegenüber Vascular Targeting Substanzen. Da Tumorgefäße bei unterschiedlichsten Tumorentitäten und auch bei der Entstehung von Metastasen annähernd den gleichen Aufbau zeigen, kann als weiterer Vorteil des Vascular Targeting von einem breiten Wirkspektrum ausgegangen werden.

Das Tumorendothel dabei selektiv zu zerstören stellte lange ein Problem dar, da auf Endothelzellen des Tumors weitaus weniger mögliche Liganden für ein entsprechendes Therapeutikum exprimiert werden, als dies auf normalen Endothelzellen der Fall ist. Intensive Forschungsbemühungen sowie die Analyse der Genexpression in Tumorendothelzellen erbrachten einige mögliche Angriffspunkte, die therapeutisch angegangen werden können (Nanda and St Croix 2004; St Croix *et al.* 2000). Zu ihnen gehören Rezeptoren für Wachstumshormone (VEGFR), α -Integrine, VCAM-1 oder CD105/Endoglin, deren Produktion in angiogenetischen Endothelzellen hoch reguliert sind und so an der Oberfläche der Zelle in großer Zahl als mögliche Ziele zur Verfügung stehen. Nach Vorarbeiten von Bringham, Zhu sowie McLean, konnten Thurston *et al.* erstmals eine ladungsvermittelte Anheftung kationischer Liposomen an angiogenetischen Endothelien zeigen (Thurston *et al.* 1998; Bringham *et al.* 1989; McLean *et al.* 1997; Zhu *et al.* 1993). Dies bietet die Möglichkeit cytotoxische Substanzen direkt an die entsprechenden Endothelzellen zu transportieren (Alessi, Ebbinghaus, and Neri 2004; Krasnici *et al.* 2003; Thurston *et al.* 1998). Darüber hinaus wurden in elektronenmikroskopischen Untersuchungen mit goldmarkierten Liposomen mögliche Wege der Aufnahme der Liposomen in die Zelle dargestellt (Thurston *et al.* 1998). Nach Anheftung der Liposomen an die mit dem Blutstrom in Verbindung stehenden Zellmembranen kommt es zur Internalisierung der Liposomen. Diese können im weiteren Verlauf innerhalb der Zelle in Endosomen und multivesikulären

Körperchen wiedergefunden werden (Thurston *et al.* 1998). Auch eine Öffnung und anschließende Verschmelzung der Lipiddoppelmembran der Liposomen mit der Zellmembran wäre denkbar. Letztendlich konnten die einzelnen Schritte der Aufnahme der Wirksubstanz aber noch nicht abschließend geklärt werden.

Neben dem bereits heute in der Klinik etablierten Verfahren der Chemoembolisation bei inoperablem hepatozellulärem Carzinom (Llovet and Bruix 2003), bei welchem die zu verabreichenden Medikamente über supraselektive Katheter direkt vor den Tumor bzw. die Metastase arteriell injiziert werden, lassen sich die für das Vascular Targeting systemisch anwendbaren Substanzen in drei Klassen einteilen:

In die Klasse der Liganden bindenden Substanzen gehören Antikörper sowie Konjugate aus Wachstumsfaktoren einerseits und cytotoxischen (Olson *et al.* 1997) oder koagulationsfördernden (Huang *et al.* 1997; Nilsson *et al.* 2001) Substanzen andererseits (Brekken and Thorpe 2001; Thorpe and Burrows 1995). Sie sind gegen Oberflächenstrukturen des proliferierenden Tumorendothels, wie VEGF-Rezeptoren oder Zelladhäsionsmoleküle gerichtet. Trotz guter Ergebnisse in tierexperimentellen Studien konnte bisher keine Formulierung Eingang in eine klinische Studie finden.

Im Gegensatz dazu konnten aus der Gruppe der kleinmolekularen tubulin-bindende Agentien bereits mehrere Ansätze in die Klinische Erprobung übernommen werden. Combretastatin A-4 oder der verwandte Wirkstoff AVE8062A (Hori, Saito, and Kubota 2002) entfalten ihre Wirkung über die Bindung und die damit verbundene Destabilisierung des Tubulinskeletts der Endothelzelle. Form und Struktur der Zelle gehen verloren, sie kann ihre Aufgabe im Zellverband nicht mehr aufrechterhalten, es kommt zu Rissen in der Endothelzellschicht. Die so mit dem Blutstrom in Verbindung tretenden koagulationsfördernden Bestandteile der subzellulären Matrix induzieren einen Thrombus, der das Gefäß verschließt und so zur Malnutrition der entsprechenden Tumorzellen führt. Im Tiermodell konnte für diesen Mechanismus eine Verringerung der Tumorperfusion um das 100-fache gemessen werden (Hori and Saito 2003; Tozer *et al.* 1999; Tozer *et al.* 2001). Auch in einer klinischen Studie, bei der die Perfusion mit Hilfe dynamischer Magnet-Resonanz-Tomographie (dMRT) untersucht wurde, ergab sich eine Reduktion der Perfusion auf 50% des Ausgangswertes (Stevenson *et al.* 2003).

Eine dritte, wichtige Klasse stellen kationische Liposomen dar. Mit ihrer positiven Ladung reichern sie sich im Gegensatz zu anionischen oder neutralen Liposomen selektiv an aktiviertem Tumorendothel an (Campbell *et al.* 2002; Krasnici *et al.* 2003; Thurston *et al.* 1998). Damit stellen sie ein ideales Transportvehikel dar, um cytotoxische Substanzen,

systemisch appliziert, unmittelbar an das Endothel des Tumors zu befördern. Aktuell wird davon ausgegangen, dass die Anreicherung dabei über die unterschiedliche Ladung von Liposomen und Tumorendothel zustande kommt. Angiogenetisch aktiviertes Endothel präsentiert auf seiner luminalen Seite in weitaus höherem Maße negativ geladenes Phosphatidylserin, als dies bei normalem Endothel der Fall ist (Ran and Thorpe 2002; Ran, Downes, and Thorpe 2002). Augustin et. al. konnten darüber hinaus in einem in vitro Versuch zeigen, dass es in aktivierten Endothelzellen zu einer Hochregulation von negativ geladenen hyperglycosylierten und hypersylatierten Membranproteinen kommt (Augustin, Kozian, and Johnson 1994). Die ladungsvermittelte Bindung der Liposomen an diese Strukturen geht dabei auch nach dem Einschluss von cytotoxischen Substanzen nicht verloren. Eine Übersicht über einzelne vielversprechende Vaskular Targeting Substanzen bietet **Tab. 1**.

<i>Substanz</i>	<i>Mechanismus</i>	<i>Studiendesign/Tumor</i>	<i>Literatur</i>
Oxi4503	Niedermolekulare an Tubulin bindende Substanz Combrestatin-Analogon	Präklinische Phase: MDA-MB 231 Adenokarzinom in SCID Mäusen	(Hua <i>et al.</i> 2003)
DMXAA	Induktion der Tumor Necrosis Faktor (TNF) Produktion	Präklinische Phase: Humanes Adenokarzinom des Colon in SCID Mäusen	(Baguley 2003; Beauregard <i>et al.</i> 2002)
ZD6126	niedermolekulare an Tubulin bindende Substanz	Phase I: fortgeschrittenes Tumorstadium	(Beerepoot <i>et al.</i> 2006)
Combretastatin a-4 Phosphat + Carboplatin	niedermolekulare an Tubulin bindende Substanz	Phase I: fortgeschrittene solide Tumore	(Bilenker <i>et al.</i> 2005)
MBT0206	ladungsvermittelte Bindung der kationischen Liposomen an Tumorendothelien	Phase I: fortgeschrittene Stadien bei Brust, Colon, Blasen und Prostatakarzinomen	Publikationen werden vorbereitet

Tab. 1: Übersicht verschiedener Vascular Targeting Substanzen, deren Wirkprinzip sowie der Stand der Untersuchungen.

5. Vascular Targeting mit MBT0206

Die Substanz MBT0206, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, gehört in die Klasse der Kationischen Liposomen. Hierbei wurde der Wirkstoff Paclitaxel (Taxol[®]) in eine positiv geladene Lipidhülle eingeschlossen. Paclitaxel aus der Gruppe der Taxane bindet an das Tubulinskelett der Zelle und führt über eine unstrukturierte Synthese der Mikrotubuli (Dye, Fink, and Williams, Jr. 1993; Schiff and Horwitz 1981) zu deren Untergang. Paclitaxel wird in freier Form bei unterschiedlichsten Tumorentitäten als Chemotherapeutikum eingesetzt, so z.B. beim Ovarialkarzinom, dem kleinzelligen Bronchialkarzinom sowie bei malignen Tumoren im Kopf-Hals-Bereich. Nach Enkapsulierung in Liposomen sind aber nicht mehr die Tumorzellen selbst, sondern die Endothelzellen des den Tumor versorgenden Blutgefäßsystems, das primäre Ziel. Darüber hinaus konnten für Wirkstoffe aus der Gruppe der Taxane auch antiangiogenetische Effekte beschrieben werden (Grant *et al.* 2003). Die gute Wirksamkeit von MBT0206 sowohl im Bezug auf das Tumorwachstum (Schmitt-Sody *et al.* 2003) wie auch auf funktionelle Parameter der Mikrozirkulation des Tumors (Strieth *et al.* 2004; Kunstfeld *et al.* 2003) konnte in mehreren tierexperimentellen Studien gezeigt werden.

6. Nicht-invasive Untersuchung der Tumormikrozirkulation

An der Schwelle zur klinischen Anwendung stellt sich die Frage nach einem geeigneten Monitorverfahren für den Gebrauch am Menschen. Im Gegensatz zu den invasiven Verfahren am Tier sollte das klinische Monitoring möglichst nicht invasiv, häufig durchführbar sowie von geringer Belastung für den Patienten sein. Die rein morphologische Verlaufskontrolle der Tumorgröße mittels CT oder normalem MRT ist hier allerdings nicht ausreichend, da Veränderungen am Tumorendothel, die ja das primäre Ziel der Therapie mit MBT0206 darstellt, nicht detektiert werden können. Detaillierte Informationen über therapiebedingte Änderungen am Blutgefäßsystem des Tumors können aber im Rahmen einer klinischen Studie entscheidend zur Optimierung der Dosierung oder einer gezielten Anpassung der Applikationssequenz beitragen.

Eine Methode, die diese hohen Anforderungen in Zukunft erfüllen könnte, ist die dynamische Magnet-Resonanz-Tomographie (dMRT), die im Rahmen der vorliegenden Arbeit neben der rein morphologisch histologischen Betrachtung als Monitorverfahren eingesetzt wurde (Bhujwalla *et al.* 2003; Degani *et al.* 2003; McDonald and Choyke 2003; Morgan *et al.* 2003).

7. Fragestellung und Zielsetzung

Ausgehend von den guten Ergebnissen der tierexperimentellen Wachstumstudien am subkutan implantierten amelanotischen Hamstermelanom A-Mel-3 (Schmitt-Sody *et al.* 2001) sowie der Suche nach einem geeigneten Monitoringverfahren für die klinische Anwendung, stellten sich für die vorliegende Arbeit folgende Fragen:

- Kommt es, wie bereits in der Rückenhautkammer beobachtet (Strieth *et al.* 2004), unter antivaskulärer Therapie mit MBT0206 zu Veränderung mikrozirkulatorischer Parameter auch am subkutan implantierten A-Mel-3?
- Können die mikrozirkulatorischen Veränderungen im Tumor nicht-invasiv mittels dMRT in Verbindung mit einem niedermolekularen Kontrastmittel quantifiziert werden?
- Kommt es unter Therapie mit MBT0206 auch zu einer Änderung der Endothelpermeabilität für makromolekulare Substanzen?
- Inwiefern lassen sich die Ergebnisse der Untersuchungen (dMRT) im Tiermodell auf den Einsatz im Rahmen einer klinischen Studie bei Patienten mit Tumoren im Kopf-Hals-Bereich übertragen?

II. Methodik

1. Methodik der experimentellen Studien

Die im folgenden dargestellten tierexperimentellen Versuche wurden in der Zeit von April 2003 bis Juli 2004 am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilian-Universität München unter der kommissarischen Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Baethman sowie am Institut für Strahlenbiologie des GSF Forschungszentrums Neuherberg durchgeführt.

1.1 Versuchstiere und deren Haltung

Bei den Versuchstieren handelte es sich um sechs bis acht Wochen alte männliche syrische Goldhamster (*Mesocricetus aureatus*) aus dem Inzuchtstamm der Firma Charles River (Sulzfeld). Das mittlere Körpergewicht betrug 50 g (45 – 55 g). Die Tiere wurden im Tierstall des Instituts für Chirurgische Forschung bei 24 °C und 50 % Luftfeuchtigkeit bei freiem Zugang zu Futter und Wasser gehalten. Es bestand ein 12-stündig wechselnder Licht-Dunkel-Rhythmus. Nach subkutaner Implantation der Tumorzellen wurden die Versuchstiere in einem Intensivpflege-Inkubator (Modell 7510; Dräger-Werk AG; Lübeck) bei 28 °C und weiterhin 50% Luftfeuchtigkeit untergebracht um das reproduzierbare Anwachsen der Tumorzellen zu gewährleisten.

1.2 Subkutanes Tumormodell

1.2.1 Tumor

Als Tumormodell diente das amelanotische Hamstermelanom A-Mel-3 (FORTNER, MAHY, and SCHRODT 1961), das am Institut für Chirurgische Forschung als Zelllinie gehalten wird.

1.2.2 Kultur der Tumorzellen

Die Tumorzellen des A-Mel-3 wurden in einer kontinuierlich laufenden Zellkultur gehalten und konnten im Dreitagerhythmus gewonnen werden. Aus Gründen der Vergleichbarkeit hinsichtlich des Wachstums wurden nur Tumorzellen aus der gleichen Passage verwendet.

1.2.3 Vorbereitung der Tumorzellen zur Implantation

Die tiefgefrorenen Tumorzellen wurden rasch aufgetaut und in 50 ml Waschmedium RPMI (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Germany) suspendiert. Danach wurde für 5 min mit 450 g zentrifugiert, der Überstand abgegossen und erneut mit Waschmedium suspendiert. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Vor der dritten Zentrifugation wurde in einer Probe der Suspension mittels Hämocytometrie die Gesamtzahl der Zellen berechnet und durch Trypanblaufärbung die Zellaktivität ermittelt. Nach der dann folgenden letzten Zentrifugation wurde der Überstand abgegossen und die verbleibende Zellsuspension mit einer 1 ml Tuberkulinspritze (Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany) aspiriert.

1.2.4 Implantation der Tumorzellen unter die Rückenhaut

Vor Implantation der Tumorzellen wurden die Versuchstiere mittels intraperitonealer Injektion narkotisiert. Hierzu wurde ein Gemisch aus Ketamin (100 mg/kg KG, Ketavet; Parke-Davis, Berlin, Deutschland) und Xylazin (10 mg/kg KG Rompun 2 %; Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) verwendet. Mit dem Langhaarrasierer (Elektra GH 204, Aesculap, Tuttlingen) wurde der gesamte Rücken der Tiere rasiert und danach chemisch depiliert (Pilca med, Olivia, Hamburg). Die Rückenhaut wurde mit Wasser von größeren Verschmutzungen befreit und mit 70 %igem Alkohol desinfiziert. Da bei den späteren Messungen im Magnet-Resonanz-Tomographen sowohl das Herz als auch der Tumor in einer möglichst horizontalen Schicht geschnitten werden sollten, wurden die Zellen auf Herzhöhe leicht rechtsseitig unter die Rückenhaut injiziert. Dazu wurde auf die Tuberkulinspritze eine Einmalkanüle (Größe 30 G 1/2; 0,3 x 13 mm, BD Medical Systems, Drogheda, Ireland) aufgesetzt und ca. 10 µl der Zellsuspension subkutan appliziert. Die Anzahl der inokulierten Zellen lag zwischen 4 - 6 x 10⁶ Zellen, die Vitalität bei ca. 95 %.

1.2.5 Dokumentation des Tumorwachstums

Zur Dokumentation des subkutanen Tumorwachstums wurden während der ca. 90minütigen Applikation von MBT0206 Höhe, Breite und Tiefe der Tumoren auf dem Rücken der Versuchstiere gemessen um so das Tumolvolumen berechnen zu können. Die Tiere wurden dabei mit einer Inhalationsnarkose aus O₂ und Isoflurane (Abott, Cham, Switzerland) narkotisiert um zum einen die Belastung der Tiere möglichst gering zu halten und zum anderen eine reibungslose Applikation des Therapeutikums zu gewährleisten. Gleichzeitig wurden die Tumoren mit einer Digitalkamera (Nikon CoolPix 995) photographiert.

1.3 Wiegen der Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden zu Beginn des Versuches sowie an den Therapietagen auf einer Kleintierwaage (Mettler, Schweiz) gewogen, um die Menge der zu applizierenden Substanzen berechnen zu können. Darüber hinaus wurde das Gewicht über die gesamte Versuchsdauer protokolliert, um den Gesundheitszustand der Versuchstiere zu überwachen.

1.4 Implantation von Verweilkathetern

Am Tag der ersten Therapiegabe wurden die Tiere wiederum mittels eines Rompun/Ketavet-Gemisches narkotisiert. Nach Rasur und chemischer Depilation der frontalen Halspartie wurde die rechte Regio jugularis mit der Vena jugularis interna chirurgisch dargestellt. Unter Sicht durch das Operationsmikroskop (Leiz, Deutschland) wurde ein mit 0,9 %iger NaCl-Lösung gefüllter, 25 cm langer Polyethylenkatheter (0,28 mm ID, 0,61 mm OD; Portex, Kent, England) in die rechte Vena jugularis interna eingeführt und ca. 10-15 mm bis kurz vor das Atrium des rechten Herzens vorgeschoben. Der Katheter wurde mit chirurgischem Faden (Perma-Handseide 6-0; Ethicon GmbH Nordstedt) an der Vena jugularis fixiert und an das subkutane Gewebe angenäht. Im Anschluss wurde der Katheter über einen subkutanen Hauttunnel am Rücken der Tiere ausgeleitet. Über den zwischen den Skapulae austretenden ersten Katheter wurde nun ein zweiter Katheter mit größerem Durchmesser geführt und ca. 1 - 2 cm unter die Haut vorgeschoben. Dieser zweite Katheter wurde an der Rückenhaut angenäht. Die Katheter wurden ca. 10 cm über Hautniveau belassen und luftdicht verschweißt. Die Lage der Katheter gewährleistete einen langfristigen Schutz vor mechanischer Manipulation und Entzündung. Für die Applikationen des jeweiligen Therapeutikums wurden die Katheter mit einer Einmalkanüle (27 G 3/4, 0,40 x 20 mm, Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany) punktiert und im Anschluss wieder verschweißt.

1.5 MBT0206

1.5.1 Herstellung der Liposomen

Zur Herstellung der Liposomen wurden außer dem Wirkstoff Paclitaxel (Synopharm, Barsbeutel, Germany) die Lipide 1,2 Dioleoyl-3-Trimethylammonium-Propan (DOTAP) und 1,2 Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC; Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL) verwendet. Der in den Seitenketten vorhandene Stickstoff der Lipide sorgt dabei für die positive Ladung der Liposomen. Zur Behandlung der Kontrollgruppe wurde konventionelles

Paclitaxel (Bristol-Myers-Squipp, New York, NY) verwendet, das in 5%iger Glucoselösung (B. Braun, Melsungen, Germany) verdünnt wurde.

Mit Hilfe der Lipid-Film-Methode wurden Liposomen mit einem Lipidgehalt von 10 mM hergestellt. Dazu wurden 0,25 mmol DOTAP, 0,235 mmol DOPC und 0,012 mmol Paclitaxel in 15 ml Chloroform (MERCK, Darmstadt, Germany) gelöst. Das Gemisch wurde in einem Rundkolben langsam auf 40° C erwärmt, danach in einem unter Vakuum stehenden rotierenden Verdampfer vom Lösungsmittel befreit, bis sich an der Gefäßwand ein dünner Lipidfilm bildete. Zurückgebliebene Lösungsmittelreste wurden in einem 2. Schritt beseitigt. Dazu wurde der an der Wand anliegende Lipidfilm unter 5 Millibar Druck weitere 60 min getrocknet. Nach Zugabe von 10 ml 5%iger Glucoselösung bilden sich nun spontan multilammelläre Liposomen. 24 h nach Zugabe der Glucoselösung erfolgte bei einer Temperatur von 30° C eine fünfmalige Extrusion der Suspension (Northern Lipids Inc., Vancouver, British Columbia, Canada). Die verwendete Polycarbonat-Membran (Osmonics, Minnetonka, MN) hatte eine Porengröße von 200 nm. Die so entstandene Suspension wurde lyophilisiert und unter 100 % Argon bei 4° C gelagert.

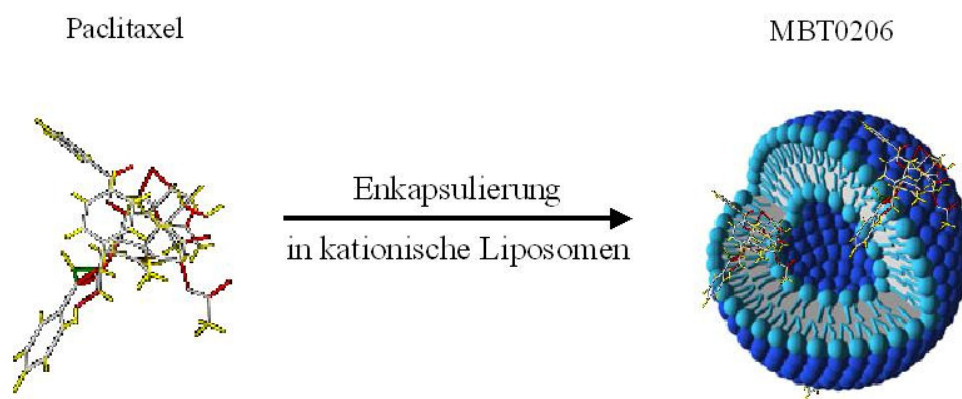


Abb. 2: Dreidimensionale schematische Darstellung der Strukturformel des Wirkstoffes Paclitaxel sowie eines Liposoms nach Enkapsulierung der Wirksubstanz. Gut zu erkennen ist die Lipid Doppelmembran mit dem darin eingebetteten Paclitaxel.

An den einzelnen Therapietagen wurde das Lyophilisat jeweils 30 min vor intravenöser Applikation mit Aqua ad injectabilia (Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany) resuspendiert.

1.5.2 Kontrolle der Liposomen

Die Größe der Liposomen wurde mittels Photonenkorrelations-Spektroskopie (Malvern Zetasizer 3000, Malvern Instruments, Herrenberg, Germany) bestimmt. Der Durchmesser der Liposomen betrug dabei im Durchschnitt 180-200 nm. Die Lipidkonzentration bzw. die Konzentration an Paclitaxel wurden durch high-performance Flüssigchromatographie (HPLC) erhoben. Verwendet wurde ein Detektor, der im UV-Bereich misst. Die Lipide wurden bei einer Wellenlänge von 205 nm, Paclitaxel bei einer Wellenlänge von 227 nm detektiert. Für die Separierung und Quantifizierung der einzelnen Komponenten wurde eine C8 LiChrospher 60 RP-select B Säule (250 x 4 mm, 5 µm Partikelgröße) mit einer C18 Vorsäule verwendet. Die Fraktionen wurden aliquotiert und im Verhältnis 1 : 3 mit Tetrahydrofuran (Baker JT, Phillipsburg, NJ) verdünnt, bevor gemessen wurde.

1.6 Studie I

Im Rahmen der Studie I wurde neben den dMRT-Untersuchungen mit niedermolekularem Kontrastmittel auch das subkutane Tumorwachstum untersucht. Darüber hinaus wurden die Tumoren histologisch aufgearbeitet und quantitativ analysiert.

1.6.1 Zeitlicher Ablauf des Versuchsprotokolls

Abb. 3 zeigt den Ablauf der einzelnen Versuchsschritte, denen die Versuchstiere unterzogen wurden.

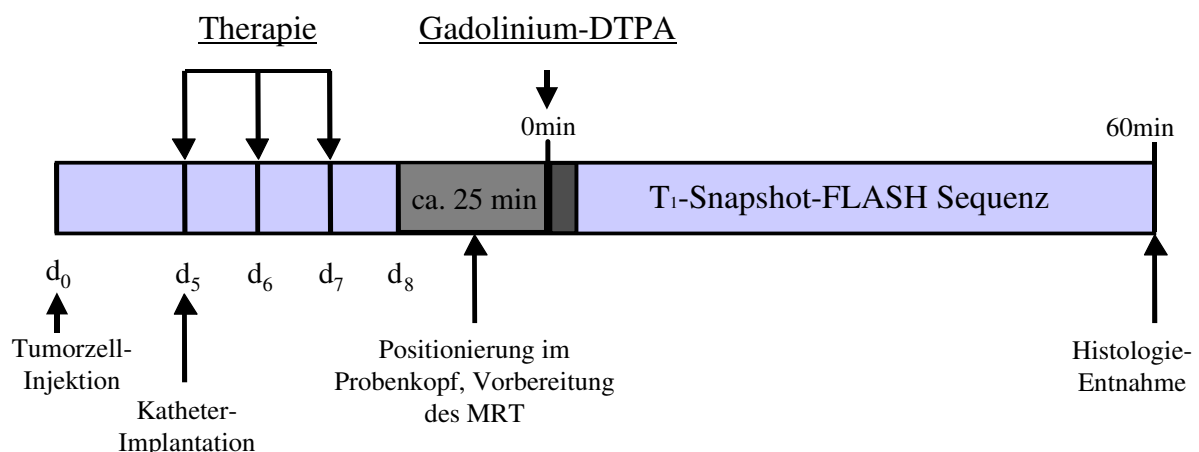


Abb. 3: Versuchsprotokoll der experimentellen Studie I, d = Tag. Applikation des niedermolekularen Kontrastmittels Gadolinium-DTPA (Magnevist®) über einen Zeitraum von 4 min zu Beginn der Messung. Nach Ende der Messungen im MRT wurden die Tumore zur histologischen Untersuchung entnommen.

Begonnen wurde an Tag 0 mit der subkutanen Implantation der Tumorzellen unter die Rückenhaut. An Tag 5 schloss sich die Anlage der V. jugularis-Verweilkatheter an, über die die Applikation des jeweiligen Therapeutikums an Tag 5, 6 und 7 stattfand. Im MRT gemessen wurden die Versuchstiere an Tag 8. Hierzu wurden die Tiere mittels einer Isofluran-Inhalationsnarkose narkotisiert, im Probenkopf fixiert und die entsprechenden Einstellungen am MRT vorgenommen. Dies nahm jeweils eine Zeit von ca. 25 min in Anspruch. Nach dem Start der Messequenz wurde die Infusion des Kontrastmittels über einen Zeitraum von 4 min begonnen. Nach dem Ende der Messung wurden die Tiere getötet und die Tumoren zur histologischen Aufarbeitung entnommen.

1.6.2 Versuchs- und Kontrollgruppen

Bei der Einteilung der Versuchs- bzw. Kontrollgruppen wurde wie folgt vorgegangen. Einen Tag nach Tumorzellimplantation wurden die Tiere randomisiert und einer der drei folgenden Gruppen zugeteilt:

- Kontrollgruppe: keine Behandlung
- Versuchsgruppe I: Behandlung mit Paclitaxel (Taxol[®]), 5 mg/kg KG
- Versuchsgruppe II: Behandlung mit MBT0206,
entspricht 5 mg/kg KG des Wirkstoffes Paclitaxel

Die Behandlung der jeweiligen Gruppen erfolgt stets an Tag 5, 6 und 7 bevor die Tiere an Tag 8 im MRT gemessen wurden. Appliziert wurde das Kontrastmittel über die in der rechten V. jugularis liegenden Verweilkatheter. Die Tiere der Kontrollgruppe wurden volumenkoriert zur MBT0206 Gruppe bereits an Tag 6 gemessen, um den Einfluß der TumorgroÙe auf die Ergebnisse der dMRT zu minimieren.

1.6.3 Dynamische Magnet-Resonanz-Tomographie

1.6.3.1 MRT Gerät

Die Messungen der Versuchsgruppen wurden an einem Magnet-Resonance-Tomographen der Firma Bruker (Bruker DMX 400, Karlsruhe, Germany) im GSF Forschungszentrum in Neuherberg durchgeführt. Die große Feldstärke des Tomographen von 9,4 Tesla garantiert dabei eine sehr hohe zeitliche und räumliche Auflösung der Bilder. Es wurde mit einem Field of View von 4 x 4 cm bei einer Schichtdicke von 1 mm und einer maximalen Auflösung von 313 x 313 μm gearbeitet.

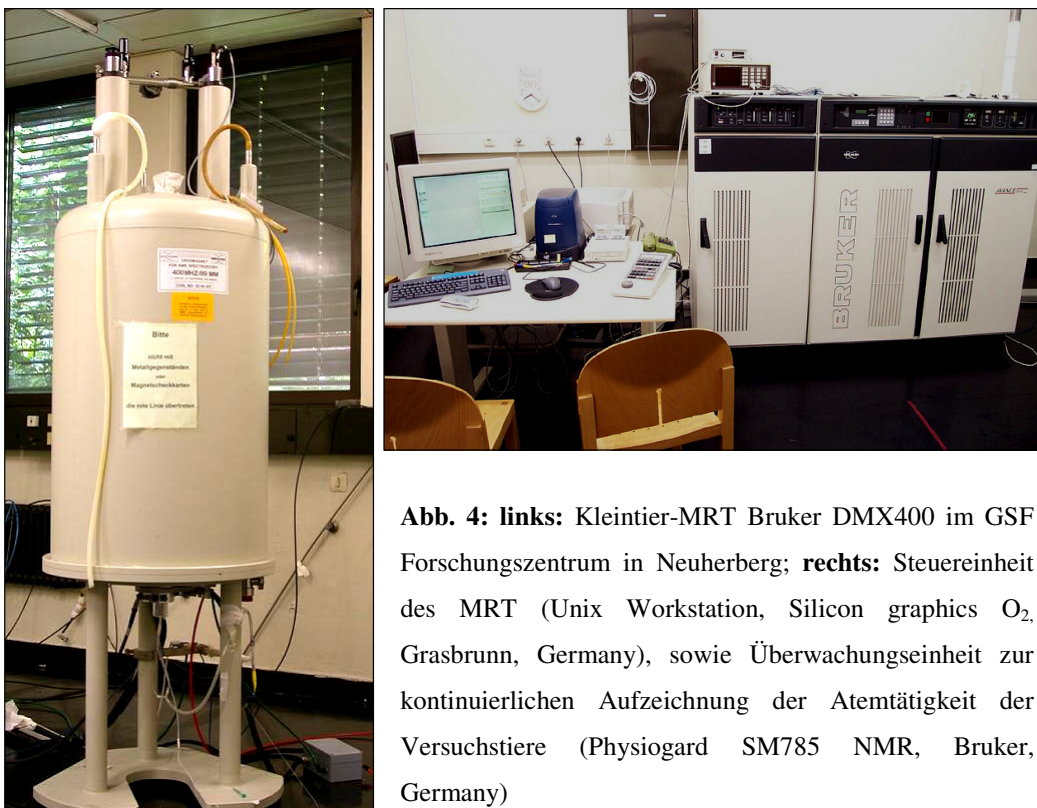


Abb. 4: links: Kleintier-MRT Bruker DMX400 im GSF Forschungszentrum in Neuherberg; rechts: Steuereinheit des MRT (Unix Workstation, Silicon graphics O₂, Grasbrunn, Germany), sowie Überwachungseinheit zur kontinuierlichen Aufzeichnung der Atemtätigkeit der Versuchstiere (Physiogard SM785 NMR, Bruker, Germany)

1.6.3.2 Durchführung der dMRT-Messungen

Für die Messungen wurden die Versuchstiere über eine Gesichtsmaske kontinuierlich mit O₂ und 0,8 % Isofluran narkotisiert, um Bewegungsartefakte zu minimieren. Da ein direkter Zugang zu den Versuchstieren während der Messungen nicht möglich war, wurden die Atemexkursionen fortlaufend mit einer auf dem Abdomen positionierten Drucksonde aufgenommen und an einem externen Monitor (Physiogard SM785 NMR, Bruker, Karlsruhe, Germany) dargestellt. Auf eine invasive Blutdruckmessung wurde verzichtet, da es in

vorangegangenen Untersuchungen zu keinen nennenswerten Blutdruckschwankungen gekommen war.

Um ein Unterkühlen der Tiere im stickstoffbefüllten MRT zu verhindern, wurde dem Probenkopf über ein Warmluftgebläse kontinuierlich 32° C warme Luft zugeführt, so dass im Inneren eine Temperatur von ca. 28° C herrschte.

Nach Arretierung des Probenkopfes im MRT wurde dann mit einem Scout Scan die entsprechende Schicht gewählt, in der dann die T₁-Snap-Shot-FLASH-Sequenz zum Einsatz kam.

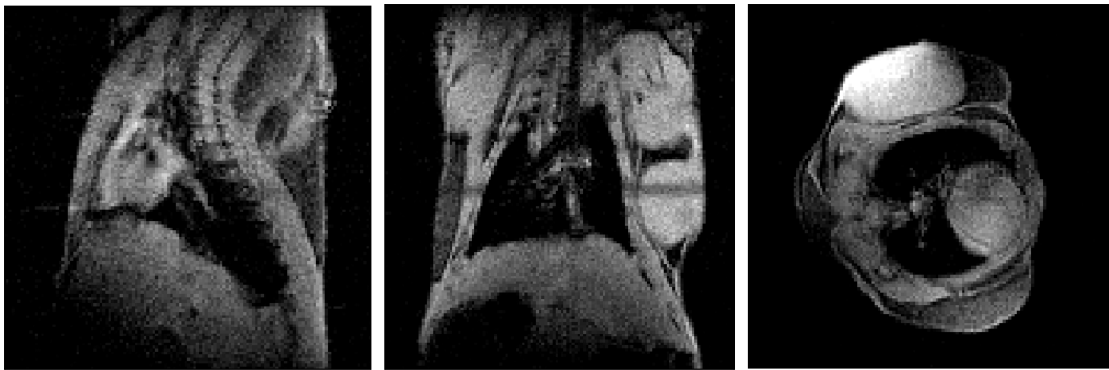


Abb. 5: Scout-Scan zur Ermittlung der für die T₁-Snap-Shot-FLASH-Sequenz am besten geeigneten Schicht. Geschnitten werden sollte dabei sowohl der linke Ventrikel als auch der Tumor in möglichst großem Umfang; **von links nach rechts:** sagittale, frontale und axiale Schichtaufnahme des Thorax eines Hamsters mit subkutan wachsendem Tumor.

Die jeweilige Menge des Kontrastmittels wurde mit Hilfe einer Harvard Pumpe (Harvard Apparatus Modell 55-5920) über den in der V. jugularis liegenden Katheter appliziert. Nach Ende der einstündigen Messung wurden die Tiere getötet und die Tumoren zur histologischen Aufarbeitung entnommen.

1.6.3.3 T₁-Snap-Shot-FLASH-Sequenz

Für die Messung der T₁-Zeiten wurde eine stark T₁ gewichtete Snap-Shot-Flash-Sequenz verwendet, bei der die Ausrichtung der H-Atome in Richtung des Hauptmagnetfeldes (longitudinale Magnetisierung) durch einen Impuls invertiert, also um 180° gedreht, werden. Im Anschluss an diesen initialen Impuls werden 24 T₁ gewichtete Bilder in einem Zeitraum von 5 s aquiriert. Die Bilder bilden dabei den Rückfall der invertierten H-Atome in ihre

Ausgangsposition ab. Der Rückfall der Magnetisierung folgt dabei der in **Abb. 6** genannten Formel.

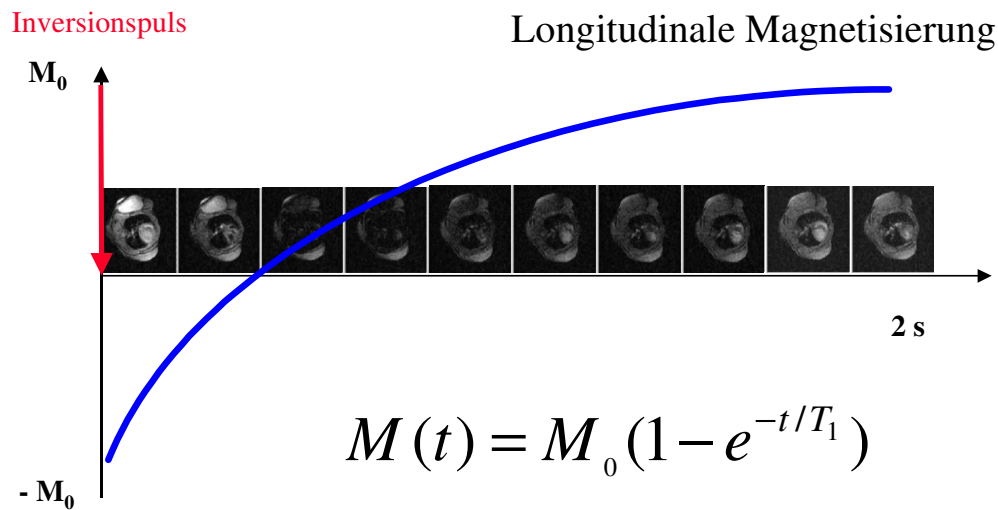


Abb. 6: Darstellung der Magnetisierung sowie deren Rückfall in die longitudinale Ausrichtung nach Inversionspuls über die ersten 2 s. Anhand der beschriebenen Formel lässt sich nach Aquisition von insgesamt 24 Bildern über einen Zeitraum von 5 s die jeweilige T_1 -Zeit berechnen; Dieser Schritt wurde für jeden der 49 Meßzeitpunkte direkt vom Computer berechnet und als T_1 -Zeit ausgegeben.

Um diese Relaxation im kontrastmittelbeladenen Gewebe sowie im Blut möglichst genau darstellen zu können, wurden kurze Repetitionszeiten (TR) und kurze Echozeiten (TE) verwendet (TR = 2,3 ms, TE = 1,1 ms). Die Daten wurden in einer Matrix von 64 x 128 aquiriert und gespeichert. Aus den 24 Bildern wurden nun T_1 Maps erstellt, in denen für jedes Voxel eine T_1 -Zeit errechnet wurde. Um ein möglichst homogenes Hauptmagnetfeld und so ideale Voraussetzungen für die Aquisition der T_1 gewichteten Bilder zu erzielen, wurde ein Einstrahlwinkel (flip angle) des Impulses von 5° gewählt. Unter Verwendung der beschriebenen Parameter lässt sich dann aus der Änderung der T_1 Zeit vor, zur T_1 Zeit nach Kontrastmittel-Applikation direkt auf die Kontrastmittel-Konzentration im Gewebe schließen (Pahernik et al., 2001).

Während der Gesamtlänge der Messung von 60 min wurden 49 T_1 -Maps erstellt, die nach Umrechnung in die Kontrastmittel-Konzentration gegen die Zeit aufgetragen wurden (Konzentrations-Zeit-Kurven). Während der ersten 10 Minuten wurde der Abstand der einzelnen Messzeitpunkte kürzer gewählt um den starken Änderungen der Konzentration während der Kontrastmittel-Gabe und kurz danach gerecht zu werden.

1.6.3.4 Kontrastmittel: Gadolinium-DTPA (Magnevist®)

Das niedermolekulare Kontrastmittel Gadolinium-DTPA (Magnevist®, Schering Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland) besitzt ein Molekulargewicht von 548 D. Es ist paramagnetisch und verkürzt die Relaxation in T_1 gewichteten Sequenzen. Gadolinium-DTPA bleibt aufgrund seiner negativen Ladung ausschließlich extrazellulär, wird nicht verstoffwechselt und über die Nieren ausgeschieden. Um möglichst gute T_1 Bilder während der zu Beginn der Messung fortlaufend schnellen Wiederholung der Messsequenz zu erreichen, muss die longitudinale Magnetisierung zwischen den einzelnen Inversionspulsen wieder in den Ausgangszustand zurückkehren. Die Aquisition reiner T_1 Bilder ist so nur alle ca. 10 s möglich. Um den Anstieg der Konzentrations-Zeit-Kurven aber trotzdem präzise beschreiben zu können, wurde das Kontrastmittel deshalb über einen Zeitraum von 4 min in Form eines prolongierten Bolus appliziert. Infundiert wurden mit Hilfe einer Harvard Pumpe 0,1 mmol/kg Körpergewicht mit einer Flussrate von 0,125 ml/min.

1.6.4 Histologie

Nach dem Ende der Messungen im MRT wurden die Tiere mit einer Überdosis Pentobarbital getötet, die Tumoren in 4%igem Paraformaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet.

1.6.4.1 Schneiden der Tumoren

Für die immunhistochemischen sowie die lichtmikroskopischen Untersuchungen der Tumorgewebeproben wurden die Paraffin-Blöcke mit Hilfe eines Mikrotoms (Hn 40, Fa. Reichert und Jung (Leica), Bensheim) geschnitten, auf einen Objektträger aufgetragen und nach der jeweiligen Färbung mit einem Deckglas verschlossen. Für die immunhistochemischen Untersuchungen sowie für die Hematoxylin-Eosin-Färbung wurde eine Schnittdicke von 5 μm gewählt.

1.6.4.2 Immunhistochemie (CD31-Färbung)

Um die Schnitte mittels CD31 färben zu können wurden sie zunächst vom Paraffin befreit. Hierzu wurden sie jeweils 15 min mit Xylol I-Lösung, dann mit Xylol II-Lösung (beide Carl Roth GmbH und Co.KG, Karlsruhe, Deutschland) behandelt. Daran schloss sich ein jeweils 5 minütiges Bad in absteigenden Ethanolkonzentrationen an (100 % - 96 % - 70 %). Es folgte ein 10 minütiges Bad in PBS-Tween-Puffer (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland) mit Mg und Ca-Zusatz. Anschließend wurde noch 4 x für ca. 1 min in PBS-Tween-Puffer (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland) ohne Mg/Ca-Zusatz gewaschen. Jetzt

wurden die Gewebeschnitte in 10 mM Citratpuffer, pH 6,0 in der Mikrowelle (Siemens HF 12023 800 Watt, Deutschland) für 3 x 5 min gekocht, um die CD31-Antigene zu demaskieren. Nachdem das Material abgekühlt war, wurde es noch einmal für jeweils 20 min in destilliertem H₂O und PBS-Puffer gebadet. Nun wurden die Schnitte über Nacht bei 4° C mit dem primären CD31-Antikörper (Cat.No.sc-1506, Lot.No.D1503, Santa Cruz, Californien, USA) inkubiert. Dieser Antikörper der Ziege ist gegen Mausantigen gerichtet, kreuzreagiert aber auch mit Hamsterantigen. Am nächsten Morgen wurde nach einem Spülschritt (4 x 1 min) in PBS-Puffer mit dem sekundären Antikörper (biotinylated donkey anti-goat IgG, sc-2042, Santa Cruz, Californien, USA) für eine Stunde inkubiert. Hierbei handelte es sich um einen Antikörper des Esels, der gegen IgG der Ziege gerichtet ist. Auch hier wurde wiederum ein Spülschritt angeschlossen, bevor mit ABC-Lösung (1 ml PBS + 20 µl Avidin + 20 µl Biotin) für eine weitere Stunde inkubiert wurde. Nach einem weiteren Waschschrift wurde nun nochmals für 20 min mit AEC-Lösung (PerkinElmerKit) inkubiert, bevor wiederum gespült wurde. Nach einem 10-minütigen Bad in PBS-Tween-Puffer wurden die Schnitte dann kurz in destilliertem Wasser gewaschen und für ca. 10 s in Hämalaun gefärbt, anschließend unter fließendem Wasser gespült und eingedeckelt.

1.6.4.3 Hematoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Wie bei der immunhistochemischen Färbung mit CD31 musste das Gewebe zu Beginn mittels Xylol I/II und einer absteigenden Ethanolkonzentrationen (100 % - 96 % - 70 %) entparaffiniert werden. Nach dieser Alkoholreihe wurden die Schnitte für ca. 20 s in destilliertem H₂O gewässert, bevor sie dann für ca. 15 s im Hämalaunbad gefärbt wurden. Hierbei kommt es zu einer Blaufärbung der Zellkerne. Um das Gewebe von überflüssigem Hämalaun zu befreien und auf den nächsten Färbeschritt vorzubereiten, wurde im Anschluss 10 min mit fließendem Wasser gespült. Nun wurde 10 min mit Eosin gefärbt und wiederum für 3 min mit fließendem Wasser gespült, um auch die Reste des Eosins zu beseitigen. Nach Färbung in Eosin stellt sich dann das Cytoplasma rot dar. Ein jeweils 5 minütiges Bad in aufsteigender Ethanolkonzentration (70 % - 96 % -100 %) wurde angeschlossen, bevor dann abschließend noch einmal für jeweils 10 min in Xylol I, bzw. Xylol II –Lösung gebadet wurde.

1.6.5 Quantifizierte Parameter

Im Rahmen der Studie I wurden die folgenden Parameter gemessen und berechnet.

1.6.5.1 Tumorwachstum

Die Messung wurde in O₂/0,8 % Isofluran-Narkose durchgeführt. Mit einer µm-Schieblehre wurden der längste (*l*) und der kürzeste (*b*) horizontale Durchmesser sowie die Höhe (*h*) der Tumoren gemessen. Bei subkutanem Anwachsen der Tumoren ließen sich diese problemlos 1-2 mm vom darunter liegenden Muskelgewebe abheben. Aus Höhe, Breite und Länge wurde dann das Tumolvolumen nach der von Tomayko und Reynolds beschriebenen Formel:

$$V = 0,837 \cdot l \cdot h \cdot b$$

berechnet (Tomayko and Reynolds 1989). Der Korrekturfaktor $c = 0,837$ wurde durch Weiss und Mitarbeiter (Weiss *et al.* 1990) für das A-Mel-3 bestimmt.

1.6.5.2 Parameter der dynamischen Magnet-Resonanz-Tomographie

Gemessene Parameter

- Konzentrations-Zeit-Kurven im arteriellen Blut
- Konzentrations-Zeit-Kurven im Tumorgewebe

Berechnete Parameter

- Perfusion-like-Parameters
 1. Initialer Anstieg (Kontrastmittel-Uptake)
 2. Maximum im Tumor korrigiert gegen das Maximum über dem Herzareal
 3. Kontrastmittel-Clearance
- Quantitative Parameter
 1. Intratumorales Blutvolumen (rBV)
 2. Intratumoraler Blutfluss (rBF)
 3. Permeabilitäts-Oberflächen-Produkt (PS/V)

1.6.5.2.1 Konzentration-Zeit-Kurven im arteriellen Blut und Tumorgewebe

Wie bereits erwähnt kann aus den T₁-Zeiten, die mittels Snap-Shot-FLASH-Sequenz erhoben wurden, direkt auf die Kontrastmittel-Konzentrationen in den jeweiligen Geweben geschlossen werden:

$$\Delta R(t) = \frac{1}{T_{1post}(t)} - \frac{1}{T_{1pre}(t)} = \beta C \quad (1)$$

Die Relaxivität (ΔR) ist dabei direkt proportional zum reziproken Wert der T_1 -Zeiten nach Kontrastmittel-Gabe minus dem reziproken Wert der T_1 -Zeiten vor Kontrastmittel-Gabe. Dieser Term ist wiederum direkt proportional zur Kontrastmittel-Konzentration. Die Konstante β gibt die Relaxivität des Kontrastmittels wieder und ist für verschiedene Kontrastmittel unterschiedlich.

Auf der ersten T_1 -Map wurde nun das zu messende Areal (Region of Interest, ROI) markiert und der Mittelwert der markierten Voxel als Einzelwert gespeichert. Die entsprechende ROI wurde dann auf die folgenden 48 T_1 -Maps übertragen und die Ergebnisse als Tabelle ausgegeben und gespeichert. Die Darstellung der Konzentrations-Zeit-Kurven erfolgte dann an einem externen Windows[®]-PC (Amilo-Notebook, Siemens Fujitsu, Deutschland) mit Hilfe von SIGMAPLOT 2000 (Systat Software Inc., Point Richmond, USA).

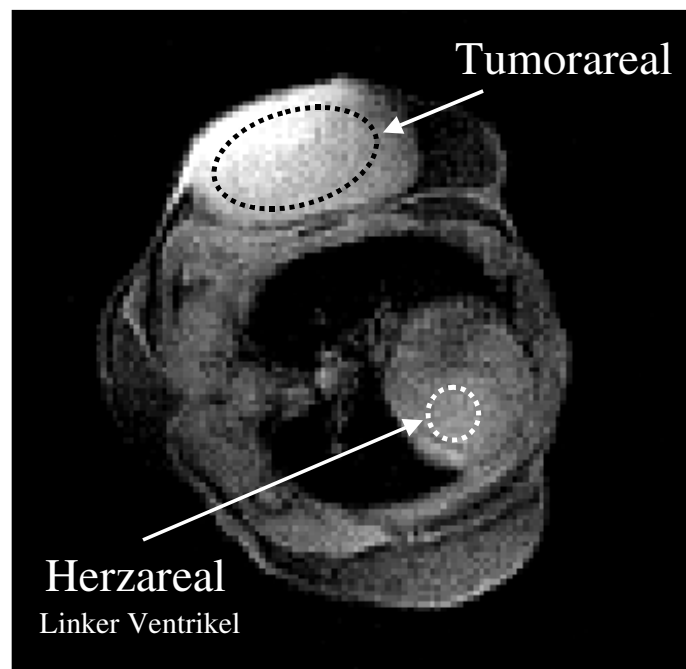


Abb. 7: Transversale Schichtaufnahme eines Versuchstieres auf Höhe des Herzens mit zusätzlich geschnittenem Tumor. Die für die Berechnung der mikrozirkulatorischen Parameter wichtigen Areale sind gepunktet markiert.

Für die Berechnung der Konzentrations-Zeit-Kurven im arteriellen Blut wurde die ROI im Zentrum des linken Ventrikels platziert, da hier ein ausreichendes Blutvolumen zur Verfügung steht, um möglichst genaue Messungen durchführen zu können. Die ROI im Tumor beinhaltete sowohl den Rand als auch das Zentrum des Tumors. Nekrotische Bereiche des Tumors wurden von der Messung ausgeschlossen.

1.6.5.2.2 Berechnung der Perfusion-like-Parameters

Um wesentliche Charakteristika der im Tumor gemessenen Konzentrations-Zeit-Kurven auch in Zahlen fassen zu können, wurden Perfusion-like-Parameters berechnet, die Aussagen über einzelne Abschnitte des Kurvenverlaufes zulassen. Die initiale Anstiegsteilheit ($\Delta R/\Delta t$) wurde als Maß der Perfusion berechnet.

Um die Maximalwerte der Konzentrations-Zeit-Kurven im Tumor als einem Maß für das Blutvolumen innerhalb des Tumors vergleichen zu können, wurden sie gegen die Konzentrations-Zeit-Kurven im arteriellen Blut korrigiert. Hierzu wurden die Maxima über dem Tumor durch die Maxima im arteriellen Blut dividiert ($\Delta R_{max.Tumor}/\Delta R_{max.Blut}$).

Als dritter Parameter wurde schließlich die Kontrastmittel-Clearance und damit das Abfluten des Kontrastmittels aus dem Tumor berechnet. Dazu wurde der Endwert ΔR der Konzentrations-Zeit-Kurve im Tumor vom Maximum ΔR im Tumor abgezogen und dann durch die Zeitspanne Δt von Maximalwert bis zum Endwert geteilt ($\frac{\Delta R_{max.} - \Delta R_{min 60}}{\Delta t}$).

1.6.5.2.3 Berechnung der quantitativen Parameter

Für die Berechnung von intratumoralem Blutvolumen (rBV), intratumoralem Blutfluss (rBF) und Permeabilitäts-Oberflächen-Produkt (PS/V) wurde das Tracerkinetische Model nach Brix (Brix *et al.* 1999) verwendet. Dieses offene 2-Kompartiment-Model beschreibt, das sich niedermolekulares Kontrastmittel im Tumor auf das intravasale und das interstitielle Kompartiment verteilt. Die Austauschvorgänge zwischen den beiden Räumen werden dabei durch das Permeabilitäts-Oberflächen-Produkt determiniert, welches ein Maß für die Durchlässigkeit des Gefäßendothels darstellt. Die Kontrastmittel-Konzentration im Tumor ist darüber hinaus vom intratumoralen Blutvolumen sowie vom intratumoralen Blutfluss, also der Perfusion, abhängig. Da das Kontrastmittel wie bereits erwähnt ausschließlich extrazellulär bleibt, kann auf ein drittes intrazelluläres Kompartiment bei der Berechnung verzichtet werden.

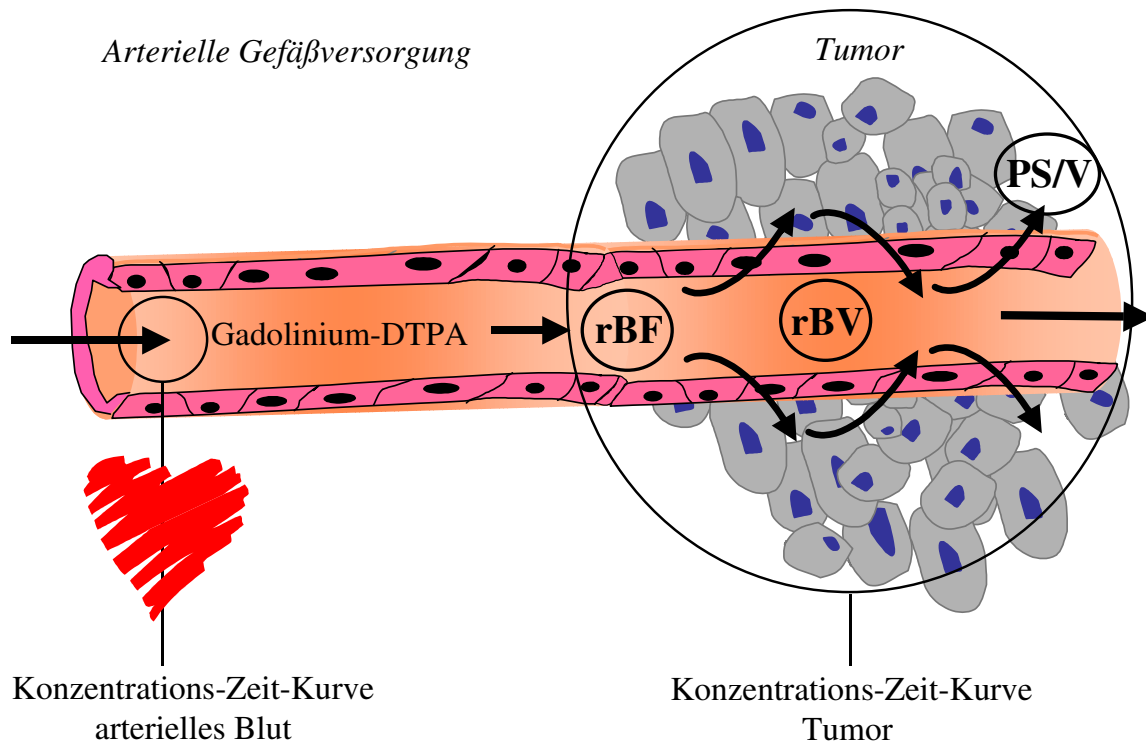


Abb. 8: Schematische Darstellung eines Tumors mit arterieller Gefäßversorgung. Zur Berechnung von intratumoralem Blutfluss (rBF), intratumoralem Blutvolumen (rBV) und Permeabilitäts-Oberflächen-Produkt (PS/V) nach Brix et al. wurden die Konzentrations-Zeit-Kurven im Tumorgewebe sowie im arteriellen Blut (linker Ventrikel) gemessen.

Der Transport des niedermolekularen Kontrastmittel im Plasma, mit einer mittleren Kontrastmittel-Konzentration von C_P und einem Volumen V_P , sowie die Diffusion in das interstitielle Kompartiment, hier mit einer mittleren Kontrastmittel-Konzentration von C_I und einem Volumen von V_I , kann dann nach den folgenden Formeln beschrieben werden:

$$V_P \frac{dC_P(t)}{dt} = F(C_A - C_P) - PS(C_P - C_I) \quad (2)$$

und

$$V_I \frac{dC_I(t)}{dt} = PS(C_P - C_I) \quad (3)$$

Die Variable $C_A(t)$ beschreibt dabei die Konzentration des Kontrastmittels im arteriellen Blut, F den kapillären Plasmafluss und PS/V das Permeabilitäts-Oberflächen-Produkt. Die Konzentration im gesamten Gewebe $C_T(t)$, die aus ΔR mit Hilfe von (1) berechnet werden kann, ist gegeben durch:

$$C_T(t) = f_p C_p(t) + f_i C_i(t) \quad (4)$$

wobei $f_p = V_p/V_T$ den relativen Anteil des Plasmas und $f_i = V_i/V_T$ den relativen Anteil des interstitiellen Raumes im untersuchten Gewebevolumen V_T darstellt. Die Bearbeitung der pharmakokinetischen Daten wurde mit einem speziellen Programm zur Berechnung mathematischer Formeln (MKMODEL, 5.0, Biosoft, Cambridge, England) unter Zuhilfenahme der Gleichungen (2) - (4), von Prof. Dr. Brix (Bundesamt für Strahlenschutz, Abteilung für medizinische Strahlenhygiene und Dosimetrie, Neuherberg), durchgeführt. Die Ergebnisse aus den Gleichungen (2) - (4) in Verbindung mit dem Verlauf der Konzentrations-Zeit-Kurven über arteriellem Blut $C_A(t)$ und Tumorgewebe $C_T(t)$ machen dann die Berechnung verschiedener mikrozirkulatorischer Parameter möglich. Dies sind die bereits beschriebenen f_p und f_i sowie der Austausch des Kontrastmittels zwischen Plasma und interstitiellem Kompartiment PS/V_p . Das regionale Blutvolumen rBV (in ml/100g Gewebe) sowie der regionale Blutfluss rBF (in ml/min/100g Gewebe) sind dann durch die zwei folgenden Gleichungen gegeben:

$$rBV = \frac{V_p}{(1 - h_{micro})xm} = \frac{f_p}{(1 - h_{micro})xp} \quad (5)$$

sowie

$$rBF = \frac{F}{(1 - h_{micro})xm} = rBVx \frac{F}{V_p} \quad (6)$$

Im untersuchten Gewebevolumen V_T , stellt $m = p \times V_T$ die Masse an festem Gewebe mit einer Dichte von $p = 1,04 \text{ g/cm}^3$ dar. Der Mikrohämatokrit in den Tumorblutgefäßen wird mit $h_{micro} = 0,18$ angesetzt (Goetz 1987).

1.6.5.3 Parameter der histologischen Aufarbeitung der Tumore

1.6.5.3.1 Gefäßdichte

Zur Quantifizierung der Gefäßdichte wurden die mit CD31 markierten Schnittpräparate (siehe 1.6.4.2) mit Hilfe eines Mikroskops (Leiz, Deutschland) mit einem 20 x Objektiv digital aufgezeichnet (Nikon CoolPix 995) und im Anschluss mittels digitaler Bildbearbeitung (KS400, Zeiss, Jena, Germany) weiterverarbeitet. Bei der Bearbeitung der digitalen Bilder wurde eine Threshold RGB Technik verwendet, die es ermöglichte, nur die CD31 positiven Pixel auf dem jeweiligen Bild darzustellen und den Rest des Bildes auszublenden. Die CD31 positiven Pixel wurden dann vom Bildverarbeitungsprogramm gezählt und als Prozent der Gesamtbildfläche dargestellt. Aus jedem Tumor wurden 4 Schnittpräparate und daraus jeweils 4 Gesichtsfelder zur Untersuchung herangezogen.

1.6.5.3.2 Thrombosen

Um die Zahl der Thrombosen quantifizieren zu können, wurden die in HE gefärbten Schnittpräparate (siehe 1.6.4.3) unter dem Mikroskop mit einem 20 x Objektiv digital aufgenommen. In einem zweiten Schritt wurde dann die Anzahl der Thrombosen im Gesichtsfeld zur gesamten Gefäßquerschnittsfläche im untersuchten Gesichtsfeld in Beziehung gesetzt. Die Gefäßfläche wurde dabei wieder mit Hilfe der digitalen Bilverarbeitung bestimmt. Auch für die Beurteilung der Thrombosen wurden aus jedem Tumor 4 Schnittpräparate und daraus jeweils 4 Gesichtsfelder untersucht. Die Auswertung wurde von zwei unabhängigen Personen vorgenommen, denen nicht bekannt war, mit welcher Substanz die Tiere behandelt wurden.

1.7 Studie II

Vor dem Hintergrund einer möglichen Kombinationstherapie von MBT0206 mit makromolekularen Zytostatika sollte in einer zweiten Studie die Gefäßpermeabilität auch für Substanzen mit makromolekularem Aufbau vor und nach Therapie mit MBT0206 untersucht werden. Da im Rahmen klinischer Studien bereits heute Chemotherapeutika mit makromolekularem Aufbau am Patienten zum Einsatz kommen (Modi *et al.* 2006), wäre eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität auch für diese Substanzen von großer klinischer Relevanz. Im Rahmen der Studie II wurden deshalb dMRT-Untersuchungen mit dem makromolekularen Kontrastmittel Gadolinium-Albumin durchgeführt.

Die Haltung der Versuchstiere, das verwendete A-Mel-3 Tumormodell als auch die Zusammensetzung und Herstellung der Liposomen entsprachen exakt dem Versuchsaufbau der Studie I. Auch die Implantation der Verweilkatheter sowie das Wiegen der Tiere wurden in gleicher Weise durchgeführt.

1.7.1 Zeitlicher Ablauf des Versuchsprotokolls

Der Ablauf der einzelnen Versuchsschritte in Studie II entsprach, bis auf die bolusförmige Applikation des Kontrastmittels, dem Versuchsprotokoll der Studie I:

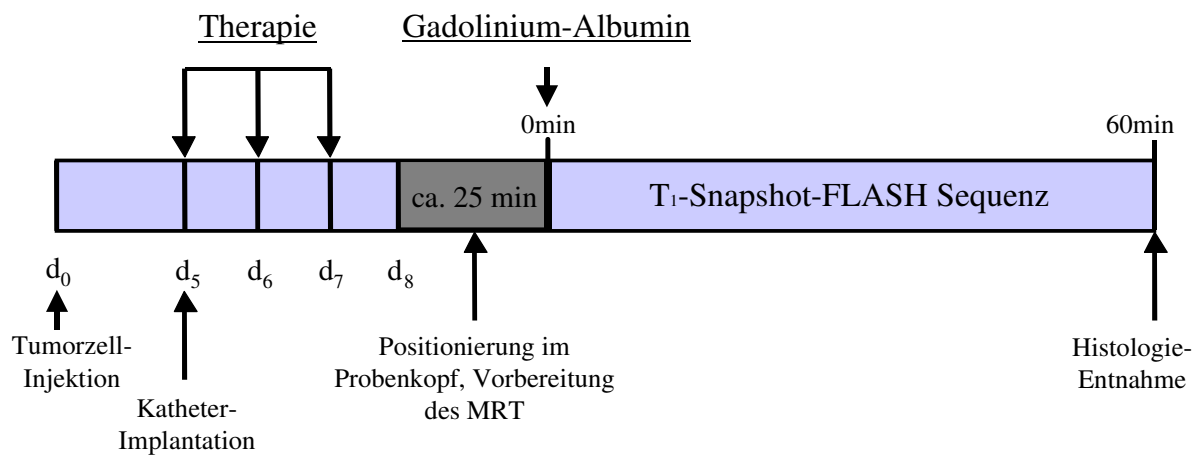


Abb. 9: Versuchsprotokoll der experimentellen Studie II, d = Tag. Applikation des makromolekularen Kontrastmittels Gadolinium-Albumin in Form eines Bolus (ca. 10 s) zu Beginn der Messung. Wiederum war eine Vorlaufzeit von ca. 25 min nötig um die entsprechenden Einstellungen am MRT vorzunehmen.

Nach Implantation der Tumorzellen an Tag 0 wurde mit der Behandlung an Tag 5 begonnen, welche an Tag 6 und 7 fortgesetzt wurde. An Tag 8 fand die Messung im MRT statt.

1.7.2 Versuchs- und Kontrollgruppe

Im Rahmen der Studie II wurden die Tiere einen Tag nach Tumorzellimplantation randomisiert und einer der beiden Gruppen zugeteilt:

- | | |
|-----------------|---|
| Kontrollgruppe: | keine Behandlung |
| Versuchsgruppe: | Behandlung mit MBT0206,
entspricht 5 mg/kg KG des Wirkstoffes Paclitaxel |

Wie bereits in Studie I wurden MBT0206 während der Therapie, als auch das makromolekulare Kontrastmittel während der Messung im MRT über den in der rechten V. jugularis liegenden Verweilkatheter appliziert. In der Kontrollgruppe wurden größenvergleichbare Tumore an Tag 6 untersucht.

1.7.3 Dynamische-Magnet-Resonanz-Tomographie

Die Messungen wurden wiederum mit dem MRT im GSF Forschungszentrum Neuherberg durchgeführt. Der Ablauf der Messungen, die verwendete T1-Snap-Shot-FLASH-Sequenz sowie deren Einstellungen entsprachen den Vorgaben der Studie I (siehe 1.6.3.2 und 1.6.3.3). Anstatt des niedermolekularen Kontrastmittels Gadolinium-DTPA, welches über einen Zeitraum von 4 min appliziert wurde, kam in Studie II das makromolekulare Kontrastmittel Gadolinium-Albumin (Fa. Schering, Deutschland) in Form einer Bolus-Gabe von ca. 10 s zum Einsatz.

1.7.3.1 Makromolekulares Kontrastmittel: Gadolinium-Albumin

Gadolinium-Albumin ist wie Gadolinium-DTPA paramagnetisch und verkürzt die Relaxation in T1 gewichteten Bildern. Es besitzt auf Grund des Albumins einen makromolekularen Aufbau (Molekulargewicht > 66000 D) und verteilt sich ausschließlich in den extrazellulären Kompartimenten. Da Albumin normalerweise nicht über die Nieren ausgeschieden wird und nur einer langsamen hepatischen Metabolisierung unterliegt, weist Gadolinium-Albumin eine sehr lange Plasmahalbwertszeit auf. Infundiert wurde Gadolinium-Albumin (13,5 $\mu\text{mol/kg}$ KG Albumin, 0,27 mmol/kg KG Gadolinium) gelöst in 0,9 %iger NaCl-Lösung. Gewichtsadaptiert ergab sich ein Volumen von ca. 500-600 μl das in Form eines Bolus von ca. 10 s Länge zu Beginn der Messung injiziert wurde.

Auf Grund der Molekülgröße ergibt sich für ein makromolekulares Kontrastmittel wie Gadolinium-Albumin eine andere Konzentrations-Zeit-Kurve, als dies für ein niedermolekulares Kontrastmittel der Fall ist. In **Abb. 10** sind schematisch die Kurvenverläufe für Gadolinium-Albumin und Gadolinium-DTPA im jeweiligen Tumor dargestellt. Während es nach Ende der niedermolekularen Kontrastmittel-Applikation zu einem sofortigen Abfall der Konzentration innerhalb des Tumors kommt, reichert sich das makromolekulare Kontrastmittel nach Bolus-Gabe noch weiter im Tumor an.

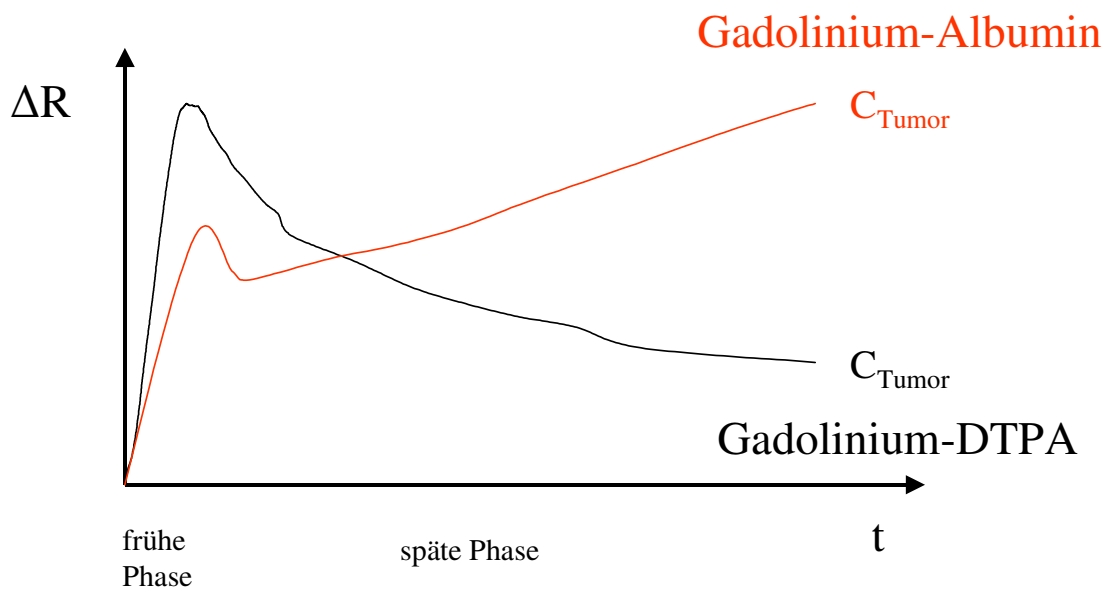


Abb. 10: Schematische Darstellung der Konzentrations-Zeit-Kurven im jeweiligen Tumor bei Verwendung eines makromolekularen Kontrastmittels, hier Gadolinium-Albumin im Gegensatz zu einem niedermolekularen Kontrastmittel wie Gadolinium-DTPA. Zu Unterschieden kommt es vor allem im Verlauf der späten Phase wo die beiden Kurven gegensätzliche Steigungen aufweisen.

Für ein makromolekulares Kontrastmittel kann die Steigung der Kurve ($\Delta R/\Delta t$) in der späten Phase der Messung als ein Maß für die Extravasation des Makromoleküls in das umgebende Gewebe herangezogen werden. Sie gibt Aufschluss über die Permeabilität der Tumorgefäße für makromolekulare Substanzen.

1.7.4 Quantifizierte Parameter der dMRT

Die Messung der Kontrastmittel-Konzentrationen im Blut sowie im Tumor fand zu exakt gleichen Zeitpunkten statt, wie dies in Studie I der Fall war, so dass vergleichbare Konzentrations-Zeit-Kurven entstanden. Zur Berechnung der Kurvensteigung wurden die Messpunkte in der späten Phase ab Minute 12 verwendet. An diese Punkte wurde dann mit Hilfe des Computerprogrammes SIGMAPLOT (Systat Software Inc., Point Richmond, USA) eine Regressionsgerade angelegt und deren Steigung vom Programm berechnet und ausgegeben.

1.8 Ein- und Ausschlusskriterien

Durch tägliche visuelle Kontrolle der Versuchstiere, die Dokumentation des Tumorwachstums sowie die Messung des Versuchstiergewichts an den Tagen 5, 6, 7 und 8 wurde gewährleistet, dass nur Tiere in einem guten Allgemeinzustand in die Studien aufgenommen wurden. Eingeschlossen wurden alle Tiere, die die jeweilige Therapie gut vertrugen, ein während des gesamten Versuchs ansteigendes Körpergewicht zeigten und bei denen es zu keinen Auffälligkeiten im Verhalten kam. Ausgeschlossen wurden drei Tiere bei denen es zu Ulzerationen bzw. Nekrosen der Haut und des darunterliegenden Tumors gekommen war.

1.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde an einem Windows[®]-PC (Amilo-Notebook, Siemens Fujitsu, Deutschland) mit Hilfe des Programms SigmaStat[®] (Jandel Corp., San Rafael, Ca., USA) durchgeführt. Zum Nachweis der Normalverteilung wurde der Kolmogorov-Smirnov Test angewendet. Zur Analyse der Varianz bei normalverteilten Gruppen kam der One Way ANOVA Test, für die Post-hoc Analyse die Student-Newman-Keuls-Methode zum Einsatz. Bei nicht normalverteilten Gruppen wurde zur Varianzanalyse der Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks Test verwendet.

Wurden andere Tests angewendet sind diese bei den entsprechenden Schaubildern oder im Text vermerkt.

2. Methodik der klinischen Studie

2.1 Studienziel

Prüfung der Verträglichkeit und Wirksamkeit des liposomal verpackten Paclitaxel (LipoPac[®] bzw. MBT0206) bei Patienten mit rezidivierendem, therapieresistentem Plattenepithelkarzinom im Kopf-/Halsbereich im Rahmen einer klinische Studie der Phase Ib/II. Studiennummer: CTLP03. Ein entsprechend genehmigter Ethikantrag lag vor.

2.2 Patienten

Die Patienten wurden anhand folgender Ein- bzw Ausschlusskriterien in die Studie aufgenommen.

2.2.1 Einschlusskriterien

- Alter > 18 Jahre

- Patient mit rezidivierendem, therapierefraktärem Plattenepithelkarzinom
- Mindestens eine Läsion die ausreichend in MRT/CT gemessen werden kann
- Karnofsky-Index $\geq 60\%$
- Lebenserwartung > 4 Monate
- Einverständnis zu weiteren Untersuchungen nach Ende der Therapie
- Einverständnis zu einem Schwangerschaftstest bei weiblichen Patienten
- Einverständnis zur Kontrazeption während Therapie
- Einverständniserklärung (informed consent)

2.2.2 Ausschlusskriterien

- Akute oder chronische Entzündung
- Diagnose einer diabetischen Retinopathie oder einer Makuladegeneration
- Herz-Kreislaufkrankung, New York Heart Association (NYHA) III oder IV
- Ernst zu nehmende Lungenerkrankungen
- Hämatologie: WBC $< 2,5$ g/l, Hb $< 8,5$ g/dl, Thrombozyten < 100 g/l
- Nierenfunktion: Kreatinin $> 2,0$ mg/dl
- Leberfunktion: Bilirubin $> 2,0$ mg/dl, AP > 300 U/l (nur bei Patienten ohne Knochenmetastasen), Quick $< 60\%$, GOT/GPT > 60 U/l
- Virushepatitis, HIV
- Aktive bakterielle Infektion
- Diagnose einer oder mehrerer Metastasen im zentralen Nervensystem
- Andere maligne Erkrankungen in den letzten 3 Jahren
- Patienten die sich nach ernststen Nebenwirkungen vorangegangener Chemo- oder Strahlentherapie nicht erholt haben
- Peptische Ulzerationen oder aktive Blutung im Gastrointestinaltrakt
- Bekannter Pleuraerguss
- Psychiatrische Erkrankungen
- Substanzabhängigkeit
- Patienten die den Anforderungen der Studie nicht gewachsen sind oder die nach Meinung des Studienleiters nicht an der Studie teilnehmen sollten
- Patienten die momentan an einer anderen Klinischen Studie teilnehmen
- Bekannte allergische Reaktionen auf Bestandteile oder ähnliche chemische oder biologische Stoffe die in LipoPac[®] (MBT0206) enthalten sind

2.3 Herstellung und Kontrolle der Liposomen

Die Herstellung sowie die Kontrolle der Wirksubstanz LipoPac[®] erfolgte in exakt den gleichen Arbeitsschritten wie die Herstellung und Überwachung von MBT0206 für die tierexperimentelle Studie in einem GMP-Labor (Apotheke des Klinikums der Universität München).

2.4 Zeitlicher Ablauf des Versuchsprotokolls

Nach dem Screening anhand der Ein- bzw. Ausschlusskriterien wurde an Tag 0 eine erste dMRT-Untersuchung durchgeführt. Die Therapie fand an Tag 1, 3 und 5 statt bevor an Tag 7 ein zweites Mal im MRT gemessen wurde. An Tag 14 schloss sich eine Folgeuntersuchung des Patienten mit erneuter dMRT-Messung an.

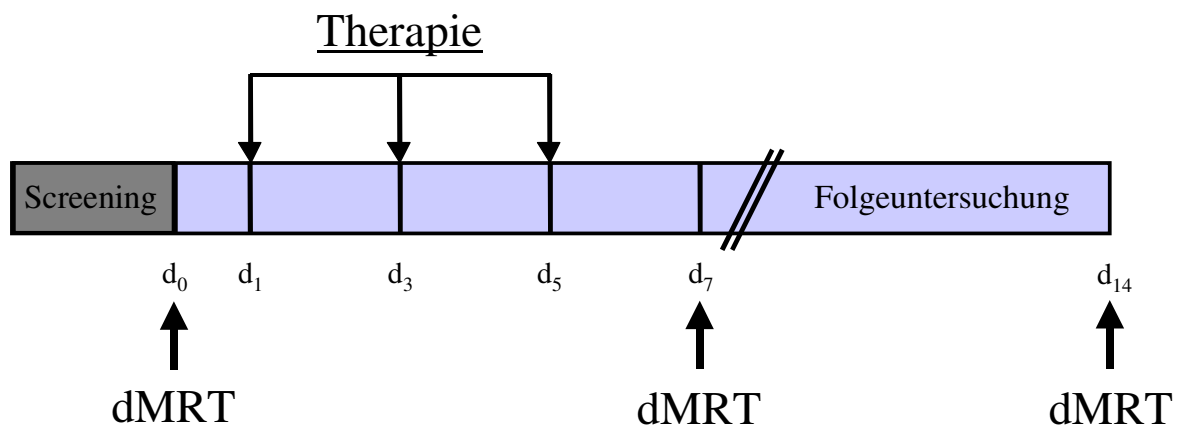


Abb. 11: Versuchsprotokoll der klinischen Studie, d = Tag. Im Gegensatz zum präklinischen Setting wurden die Patienten mehrmals im MRT gemessen.

2.5 Versuchsgruppen

Den beiden Dosierungsstufen wurden jeweils 3 Patienten zugeteilt:

Messung mit Gadolinium-DTPA als Kontrastmittel

- | | |
|-------------------|--|
| Versuchsgruppe I | Behandlung mit LipoPac [®] 16 mg/kg KG
entspricht 0,55 mg/kg KG liposomalem Paclitaxel |
| Versuchsgruppe II | Behandlung mit LipoPac [®] 32 mg/kg KG
entspricht 1,10 mg/kg KG liposomalem Paclitaxel |

Nach einer initialen Messung vor Beginn der Behandlung wurde den Patienten beider Gruppen an den entsprechenden Tagen jeweils eine Dosis LipoPac® in der jeweiligen Konzentration appliziert. An Tag 7 schloss sich dann eine weitere Messung im MRT an. Dieses Schema wurde für jeden Behandlungszyklus beibehalten. Ein Reentry aus der Versuchsgruppe I in die Versuchsgruppe II war möglich, wenn keine stärkeren Nebenwirkungen aufgetreten waren und die Patienten dazu ihr Einverständnis gegeben hatten.

2.6 Dynamische Magnet-Resonanz-Tomographie

2.6.1 MRT Gerät

Die Messungen wurden an einem Magnet-Resonance-Tomographen der Firma Siemens (Siemens SONATA, Erlangen, Germany) im Institut für klinische Radiologie der Universität München durchgeführt. Das Gerät besitzt eine Feldstärke von 1,5 Tesla. Zur Verbesserung der Bildqualität wurde eine Kopf-Hals-Oberflächenspule verwendet.

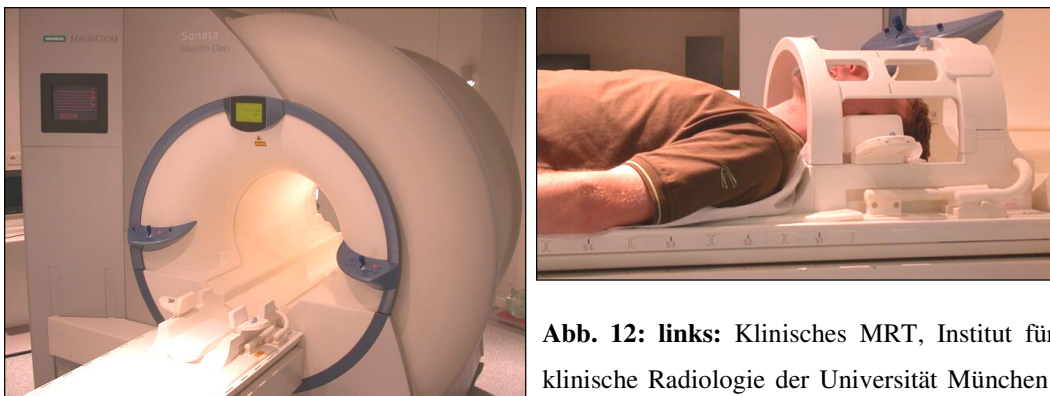


Abb. 12: links: Klinisches MRT, Institut für klinische Radiologie der Universität München; **rechts:** Kopf-Hals-Oberflächenspule

2.6.2 Durchführung der dMRT-Messungen

Die Patienten wurden nach Aufklärung über die Untersuchung durch den Radiologen mit einem peripher venösen Zugang von 18 G (Braunüle, Braun, Melsungen, Germany) versorgt, über den während der Untersuchung das Kontrastmittel gegeben wurde. Anschließend wurden die Patienten auf dem Untersuchungstisch positioniert. Zur Verbesserung der Bildqualität wurde der Kopf-Hals-Bereich zusätzlich mit einer Oberflächenspule versehen. Die Patienten wurden im MRT während der gesamten Messung mittels Videokamera lückenlos überwacht, sie hatten darüber hinaus die Möglichkeit, mit Hilfe einer Klingel auf mögliche Probleme aufmerksam zu machen. Eine Überwachung mittels EKG oder nicht

invasiver Blutdruckmessung fand nicht statt. Nach Positionierung des Patienten im MRT wurden anhand eines Scout-Scans die entsprechenden Schichten rekonstruiert, in denen anschließend mit der T₁-Turbo-FLASH-Sequenz gemessen wurde.

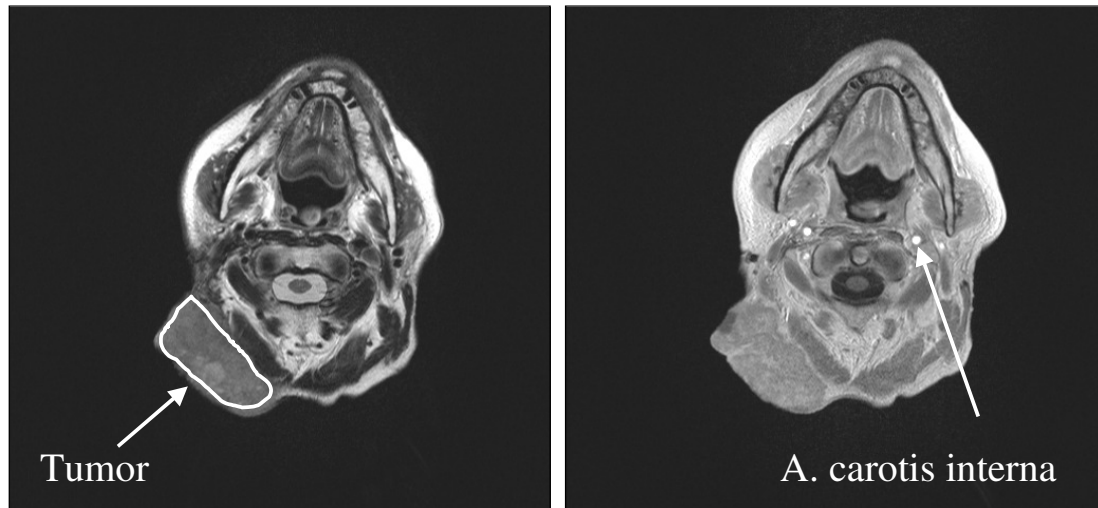


Abb. 13: Scout-Scan eines Patienten in axialer Schnittebene auf Höhe der Mandibula. **Links:** T₂ gewichtete Aufnahme vor Kontrastmittel-Gabe mit markiertem Tumorareal. **Rechts:** T₁ gewichtete Aufnahme nach Kontrastmittel-Gabe. Es kommt zu einer deutlichen Darstellung der mit Kontrastmittel gefüllten Gefäße.

2.6.3 Kontrastmittel

Wie bei der präklinischen Studie I wurde als Kontrastmittel Gadolinium-DTPA (Magnevist[®], Schering Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland) verwendet. Nach Aufzeichnung einer Baseline wurden mittels einer Spritzenpumpe (CAI 626P/Tomojet, Doltron AG, Uster, Schweiz) 0,4 ml/kg Körpergewicht mit einer Flussrate von 5 ml/s infundiert. Bei einem durchschnittlichen Körpergewicht von 70 kg ergab sich so eine Applikationszeit von 5-6 s. Ein Milliliter der wässrigen Infusionslösung enthielt 78,63 mg Gadolinium sowie 469 mg Gadopentetsäure. Infundiert wurden so 31,5 mg Gadolinium pro kg Körpergewicht.

2.6.4 T₁-Turbo-FLASH-Sequenz

Für die Messung der T₁-Zeiten wurde eine stark T₁ gewichtete Saturation-Recovery-Turbo-FLASH-Sequenz (SRTF) verwendet. Im Gegensatz zur experimentellen Studie wurde aus Gründen der Zumutbarkeit für den Patienten als auch der technischen Machbarkeit die Aquisition der Bilder auf einen Zeitraum von 12 min 32 s begrenzt. Aufgrund der Programm-

und Speicherstruktur des Siemens Systems musste nach 8 min und 32 s eine zweite Messsequenz von noch einmal 4 min gestartet werden, um die Gesamtmesszeit zu erreichen. Es wurde gleichzeitig in vier verschiedenen Schichten des Tumors gemessen, wobei insgesamt 470 Bilder pro Schicht, also zusammen 1880 Bilder, aquiriert wurden. Der zeitliche Abstand der einzelnen Messungen betrug 1,6 s, eine Kumulation der Messzeitpunkte während der Kontrastmittelapplikation fand im Gegensatz zur Tierstudie nicht statt. Die Sequenz wurde mit folgenden Parametern durchgeführt: TR = 400 ms, TE = 1,4 ms, TI = 180 ms. Der Einstrahlwinkel des Impulses (flip angle) betrug 12°. Nach Berechnung der Kontrastmittel-Konzentrationen zu den einzelnen Messzeitpunkten konnten dann die zur Quantifizierung der mikrozirkulatorischen Parameter notwendigen Konzentrations-Zeit-Kurven erstellt werden.

2.7 Quantifizierte Parameter der dMRT

Gemessene Parameter:

- Konzentrations-Zeit-Kurven im arteriellen Blut
- Konzentrations-Zeit-Kurven im Tumorgewebe

Berechnete Parameter:

- Intratumorales Blutvolumen
- Intratumoraler Blutfluss
- Permeabilitäts-Oberflächen-Produkt

2.7.1 Konzentrations-Zeit-Kurven im arteriellen Blut und Tumorgewebe

Wie bei der Snap-Shot-FLASH-Sequenz kann auch bei der Turbo-FLASH-Sequenz auf Grund der Proportionalität direkt auf die Kontrastmittel-Konzentration im Gewebe geschlossen werden (Brix *et al.* 2004). Nach Markierung der entsprechenden ROIs auf einem der in einer Schicht aufgenommenen 470 Bilder, wurden diese Messareale auf die restlichen 469 übertragen, der Mittelwert der jeweiligen Schicht berechnet und die Werte in Form einer Tabelle ausgegeben und gespeichert. Nach Konvertierung der am Siemens-System erhobenen Daten konnten diese dann an einem Windows®-PC weiter bearbeitet werden. Für die Berechnung der Konzentrations-Zeit-Kurven im arteriellen Blut wurde die ROI im Querschnitt der A. carotis interna platziert. Die ROI im Tumor beinhaltete das Zentrum sowie die Randbereiche des Tumors. Nekrotische Bereiche des Tumors wurden nicht in die Berechnung miteinbezogen.

2.7.2 Berechnung der quantitativen Parameter

Die Quantifizierung der Parameter Intratumorales Blutvolumen, Intratumoraler Blutfluss sowie Permeabilitäts-Oberflächen-Produkt erfolgte wie bei der tierexperimentellen Studie nach dem 2-Kompartimentmodell nach Brix (Brix et al., 1999).

III. Ergebnisse

1. Ergebnisse der experimentellen Studien

1.1 Studie I

1.1.1 Subkutanes Tumorwachstum

Mit Hilfe des unter die Rückenhaut des Hamsters implantierten A-Mel-3 wurde bis zur dMRT-Messung an Tag 8 parallel der Einfluss von MBT0206 auf das subkutane Wachstum untersucht. Die Therapie mit MBT0206 wurde von allen Versuchstieren gut vertragen und hatte keine Auswirkungen auf die Gewichtszunahme sowie das Wohlbefinden der Tiere. Im Vergleich mit der Paclitaxel-Gruppe (Tumorvolumen: $515 \pm 75 \text{ mm}^3$, $n=6$) kam es in der MBT0206-Gruppe (Tumorvolumen: $319 \pm 19 \text{ mm}^3$, $n=7$) zu einer signifikanten Reduktion des Tumorwachstums. Im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tumorvolumen: $289 \pm 40 \text{ mm}^3$, $n=7$), die volumenkorieliert zur MBT0206-Gruppe gemessen wurde, zeigte sich eine signifikante Verzögerung des Wachstums bei den mit MBT0206 behandelten Tieren um 2 Tage.

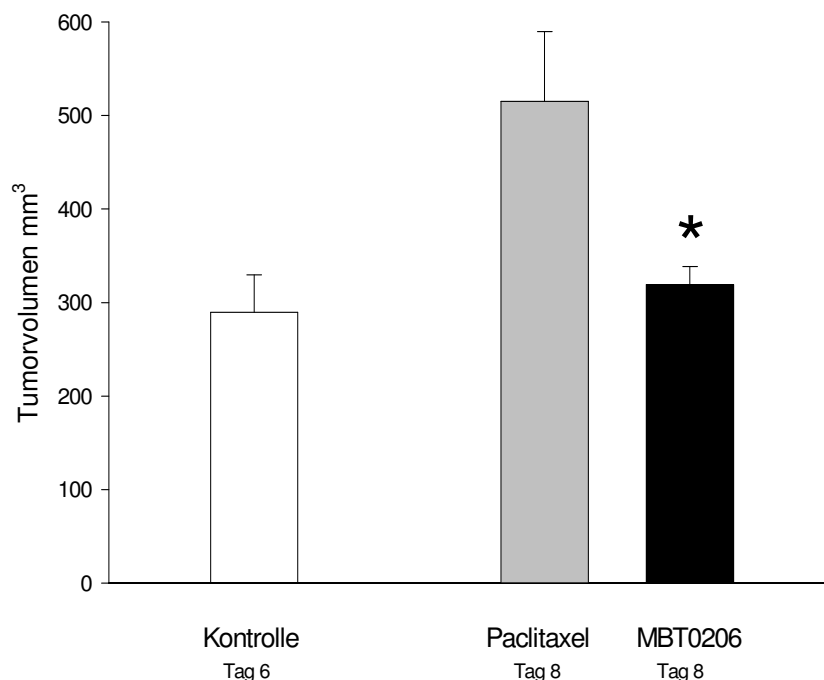


Abb. 14: Tumorvolumina am Tag der Messung im MRT. Mittelwerte plus Standard-Fehler: * $p < 0,05$ gegen Paclitaxel.

1.1.2 Ergebnisse der dMRT

Ausgangspunkt für die Berechnung der mikrozirkulatorischen Parameter rBV , rBF und PS/V sind die Konzentrations-Zeit-Kurven im arteriellen Blut sowie im Tumorgewebe.

1.1.2.1 Konzentrations-Zeit-Kurve im arteriellen Blut

Während der einstündigen Messung im MRT wurden insgesamt 49 T_1 -Zeiten gemessen, die hier als Relaxivitätsänderung ΔR gegen die Zeit in min aufgetragen wurden und in **Abb. 15** als Konzentrations-Zeit-Kurven dargestellt sind. Größere Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchstieren sind nicht zu erkennen.

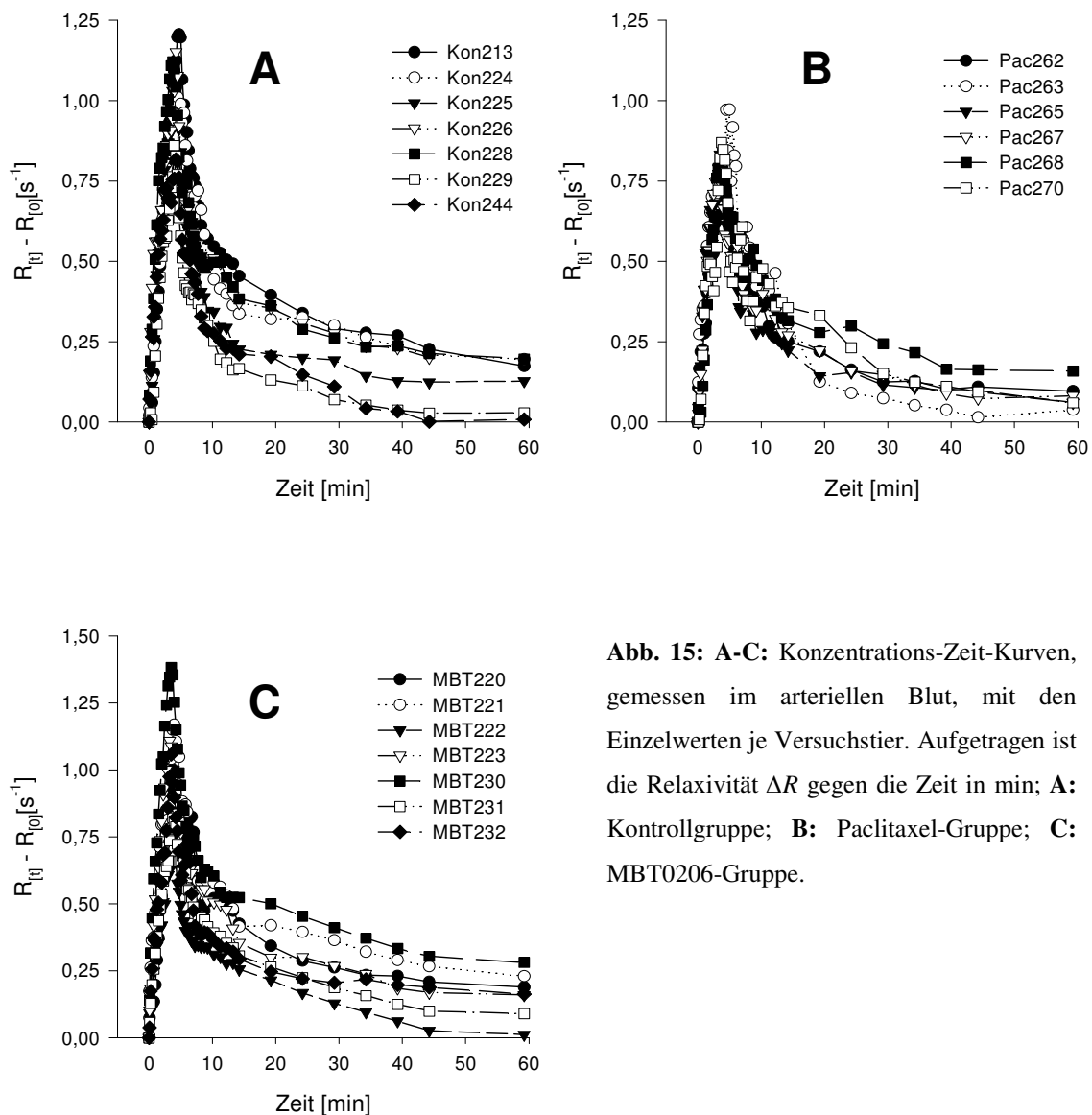


Abb. 15: A-C: Konzentrations-Zeit-Kurven, gemessen im arteriellen Blut, mit den Einzelwerten je Versuchstier. Aufgetragen ist die Relaxivität ΔR gegen die Zeit in min; **A:** Kontrollgruppe; **B:** Paclitaxel-Gruppe; **C:** MBT0206-Gruppe.

Die Betrachtung der Mittelwertkurven in **Abb. 16** zeigt: Initiales Anfluten des Kontrastmittels, Höhe des Maximums sowie der annähernd exponentielle Abfall der Konzentrations-Zeit-Kurven nach Ende der Kontrastmittel-Applikation waren in allen drei Gruppen annähernd gleich. Es kam zu keinen signifikanten Unterschieden im Verlauf der Kurven zwischen den drei Versuchsgruppen.

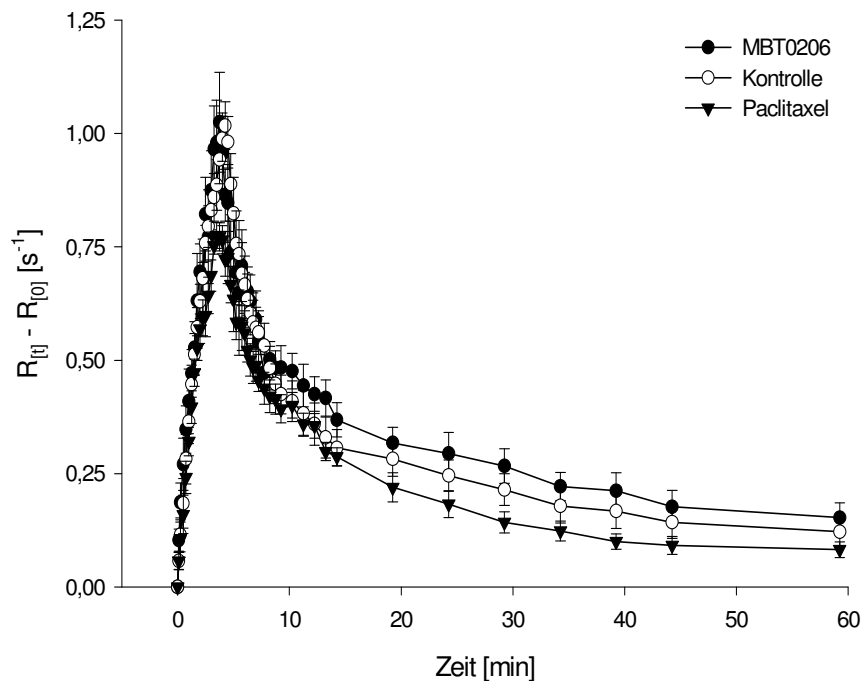


Abb. 16: Konzentrations-Zeit-Kurven im arteriellen Blut gemessen im linken Ventrikel über 60 min. Mit Beginn der Messung wurde die Injektion des Kontrastmittels über einen Zeitraum von 4 min gestartet. Mittelwerte \pm SEM. Anzahl der Versuchstiere pro Versuchsgruppe: Kontrolle n=7, Paclitaxel n=6, MBT0206 n=7.

1.1.2.2 Konzentrations-Zeit-Kurven im Tumorgewebe

Bei der Messung der Konzentrations-Zeit-Kurven im Tumor ergaben sich im Gegensatz zur Messung im linken Ventrikel deutliche Unterschiede im Kurvenverlauf. **Abb. 17** zeigt die Änderungen der Relaxivität ΔR über die Zeit in min. Während sich die Kurven der Kontroll- sowie der Paclitaxelgruppe nicht wesentlich von einander unterschieden, konnte bei den mit MBT0206 behandelten Versuchstieren ein abweichender Kurvenverlauf gemessen werden. Neben den geringeren Maxima die erreicht wurden, zeigte sich in der späteren Phase eine deutlich geringere Abnahme der Relaxivität.

Die Konzentrations-Zeit-Kurve des Versuchstieres MBT230 zeigte im Vergleich zu den übrigen Tieren der MBT0206-Gruppe kein initiales Maximum, sondern erreicht dieses erst nach ca. 30 min. Während des Versuches waren keine Anomalien der Atemtätigkeit beobachtet worden. Für konstante makrohämodynamische Verhältnisse spricht der im Vergleich mit den anderen Versuchstieren gemessene Kurvenverlauf im arteriellen Blut. Auch die histologischen Untersuchungen ergaben keine Besonderheiten im Gegensatz zu den anderen Tieren der Gruppe, so dass alle Einschlusskriterien erfüllt waren.

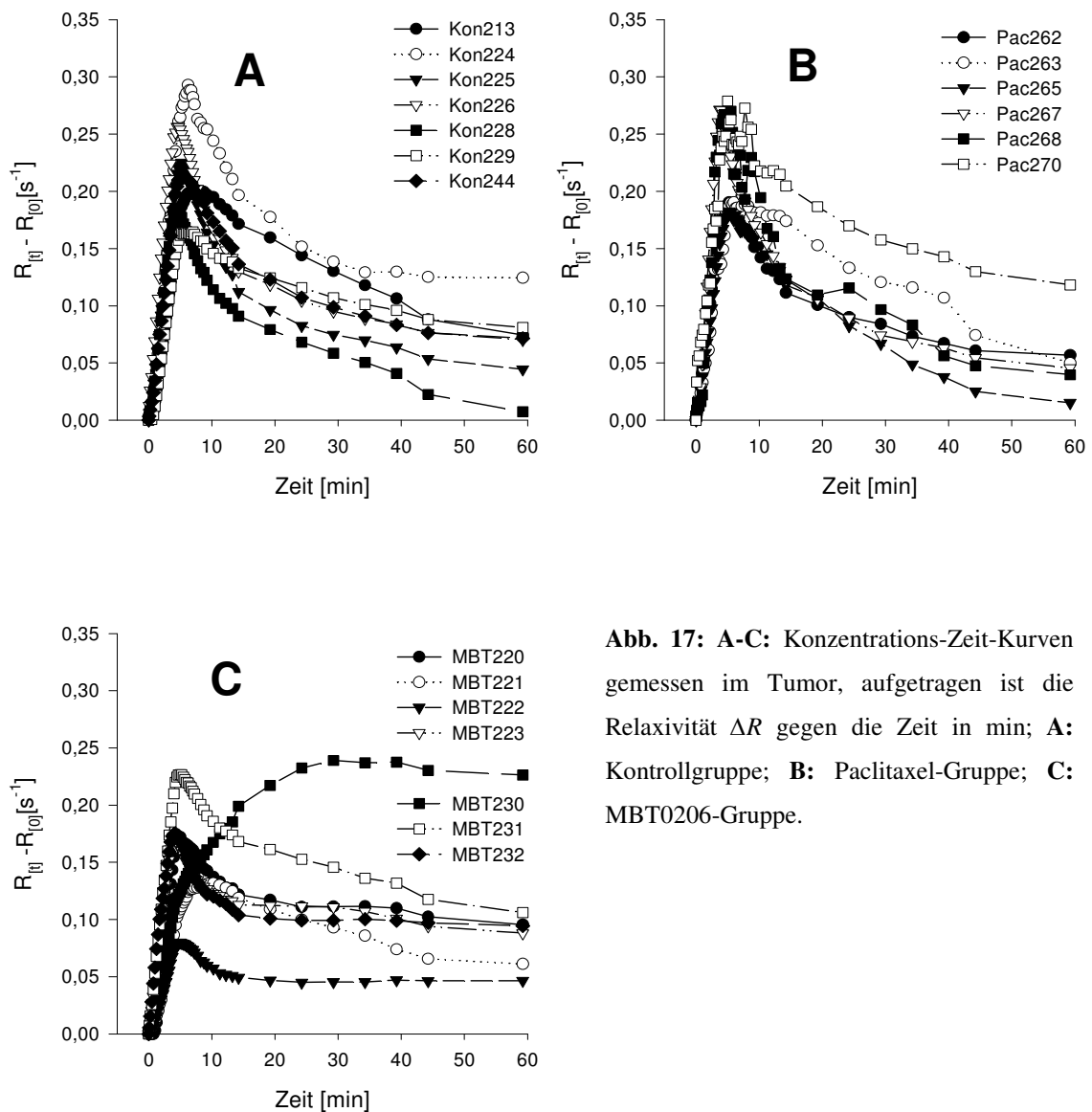


Abb. 17: A-C: Konzentrations-Zeit-Kurven gemessen im Tumor, aufgetragen ist die Relaxivität ΔR gegen die Zeit in min; **A:** Kontrollgruppe; **B:** Paclitaxel-Gruppe; **C:** MBT0206-Gruppe.

Die Berechnung der Mittelwertskurven die in **Abb. 18** dargestellt sind, macht die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen deutlicher. Wie bereits aus der Betrachtung der Einzeltiere abzuleiten war, kommt es zu einer deutlichen Verringerung des Maximums in der mit MBT0206 behandelten Gruppe. Kontroll- und Paclitaxel-Gruppe unterscheiden sich in Hinsicht auf das Maximum nicht. Bei der weiteren Analyse der Graphen zeigt sich in der MBT0206 Gruppe ein deutlich flacherer Kurvenverlauf in der späten Phase der Messung. Die beiden anderen Gruppen zeigen dagegen einen deutlicheren Rückgang der Relaxivität.

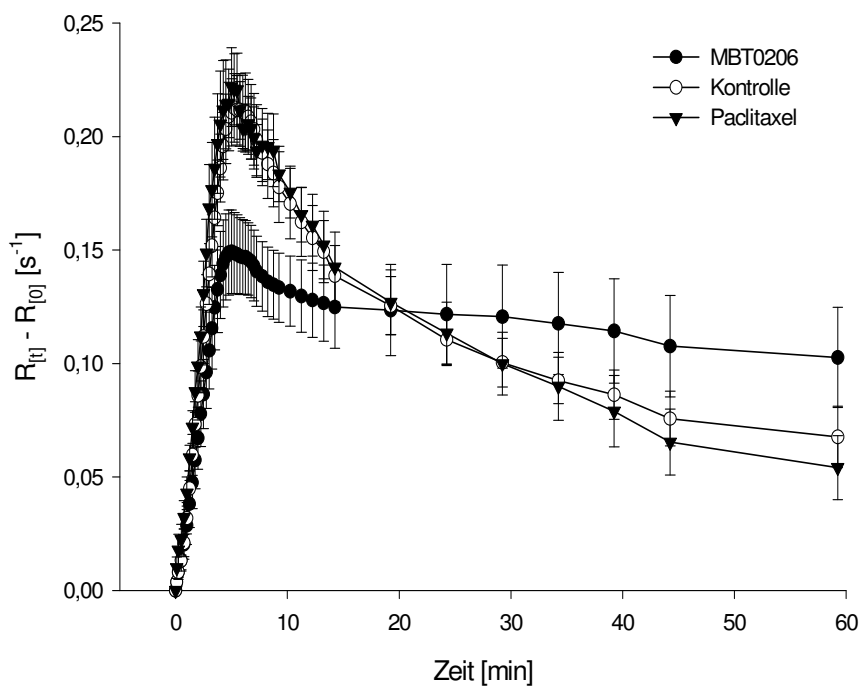


Abb. 18: Konzentrations-Zeit-Kurven der verschiedenen Gruppen gemessen im Tumor über einen Zeitraum von 60 min. Darstellung als Mittelwerte \pm SEM. Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe: Kontrolle n=7, Paclitaxel n=6, MBT0206 n=7.

1.1.2.3 Perfusion-like-Parameters

Die Berechnung von Perfusion-like-Parameters anhand der Konzentrations-Zeit-Kurven im Herz und im Tumor sind in **Abb. 19** dargestellt. Der initiale Anstieg der Konzentrations-Zeit-Kurven im Tumor als einem Maß für die Perfusion des Tumors ging in der mit MBT0206 therapierten Gruppe gegenüber den beiden anderen Gruppen geringfügig, aber nicht signifikant, zurück (**Abb. 19A**).

Das im Tumor erreichte Maximum, welches gegen die im arteriellen Blut gemessene maximale Kontrastmittel-Konzentration korrigiert wurde, zeigte eine signifikante Verringerung in der mit MBT0206 behandelten Gruppe gegenüber der Paclitaxel-Gruppe (**Abb. 19B**).

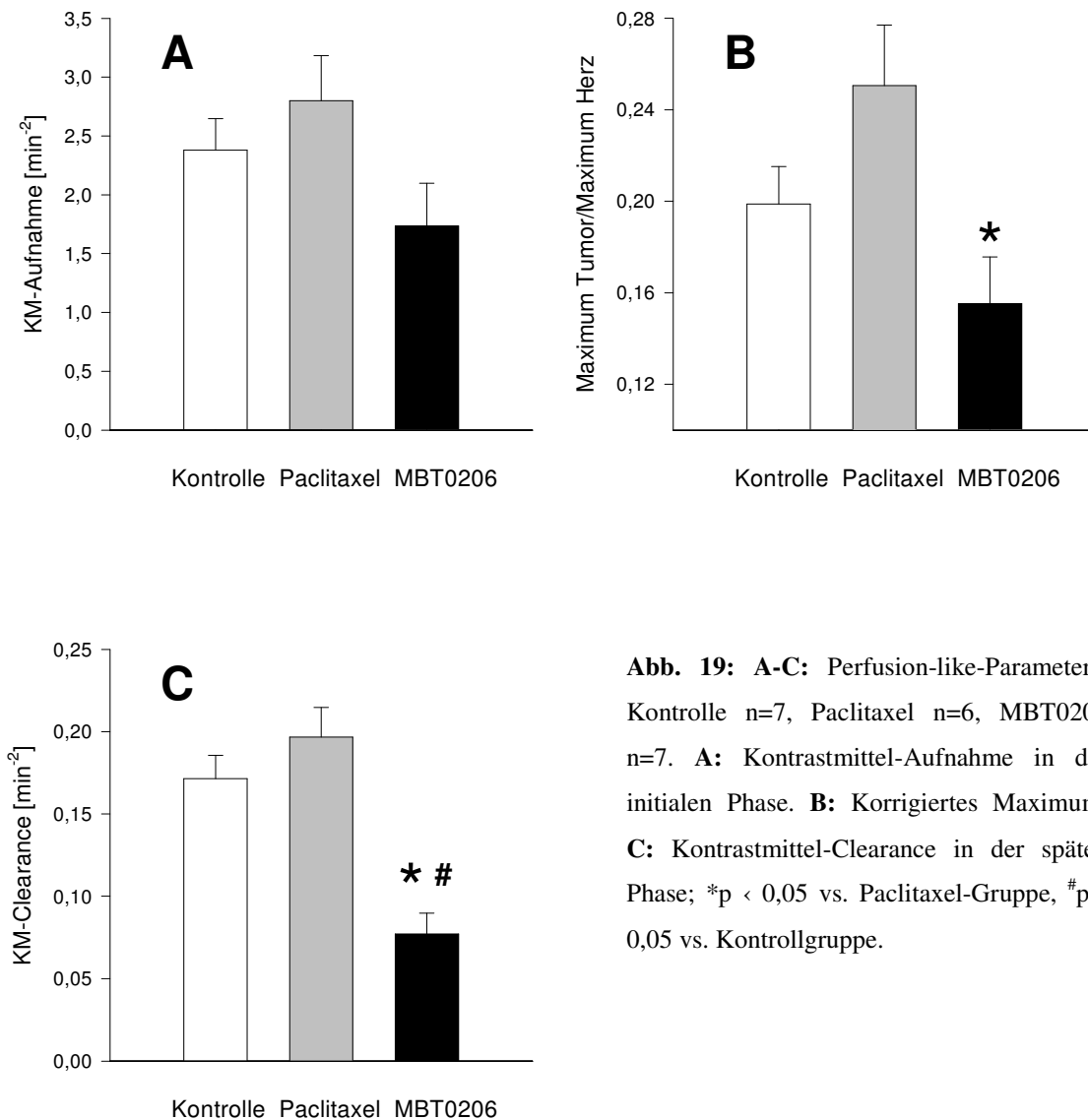


Abb. 19: A-C: Perfusion-like-Parameters, Kontrolle n=7, Paclitaxel n=6, MBT0206 n=7. **A:** Kontrastmittel-Aufnahme in der initialen Phase. **B:** Korrigiertes Maximum. **C:** Kontrastmittel-Clearance in der späten Phase; *p < 0,05 vs. Paclitaxel-Gruppe, #p < 0,05 vs. Kontrollgruppe.

Die Kontrastmittel-Clearance, das Abfluten des Kontrastmittels aus dem Tumor zeigte eine mehr als 2,3 fache und damit signifikante Verlangsamung sowohl gegenüber der Kontroll- als auch gegenüber der Paclitaxel-Gruppe (**Abb. 19C**).

1.1.2.4 Quantitative Parameter

Für die Berechnung von Intratumoralem Blutvolumen, Intratumoralem Blutfluss und Permeabilitäts-Oberflächen-Produkt sowie für die Bestimmung der relativen Anteile des Kontrastmittels im Plasma und im interstitiellen Raum wurde das bereits beschriebene tracerkinetische 2-Kompartment Model eingesetzt. Grundlage der Berechnung waren dabei die Konzentrations-Zeit-Kurven, die im linken Ventrikel und im jeweiligen Tumor gemessen wurden. Die Ergebnisse der einzelnen Parameter sind in **Tab. 3** dargestellt.

	<i>rBV</i>	<i>rBF</i>	<i>PS/V</i>	<i>f_p</i>	<i>f_i</i>
MBT0206	13,8 ± 2,0* [#]	15,3 ± 3,5	0,13 ± 0,07	10,9 ± 1,5* [#]	22,6 ± 3,6
Paclitaxel	23,0 ± 2,3	8,6 ± 1,8	0,05 ± 0,02	18,1 ± 1,8	24,0 ± 6,6
Kontrolle	20,0 ± 2,0	10,3 ± 1,8	0,08 ± 0,03	15,8 ± 1,5	20,9 ± 7,9

Tab. 2: Übersicht über die mittels Tracerkinetischem 2-Kompartment Model errechneten quantitativen Parameter, dargestellt als Mittelwerte ± SEM. Intratumorales Blutvolumen *rBV* in ml/100g Tumorgewebe, Intratumoraler Blutfluss *rBF* in ml/min/100g Tumorgewebe, Permeabilitäts-Oberflächen-Produkt *PS/V* in 1/min, relativer Plasmaanteil im untersuchten Gewebe *f_p* in %, relativer Anteil des interstitiellen Volumens im untersuchten Gewebe *f_i* in %. *p < 0,05 gegen Paclitaxel; #p < 0,05 gegen Kontrolle

1.1.2.4.1 Intratumorales Blutvolumen (rBV)

Wie aus **Tab. 3** hervorgeht kam es unter Therapie mit MBT0206 zu einer signifikanten Reduktion des relativen Plasmaanteils f_p im untersuchten Tumorgewebe (f_p : $10,9 \pm 1,5$ %) sowohl gegenüber der Kontrollgruppe (f_p : $15,8 \pm 1,5$ %) als auch im Vergleich mit der Paclitaxel-Gruppe (f_p : $18,1 \pm 1,8$ %). In Übereinstimmung damit zeigte sich auch beim rBV als einem Maß für die Größe des Tumorgefäßsystems ein deutlicher Unterschied zwischen den einzelnen Untersuchungsgruppen. Während das rBV in der mit Paclitaxel behandelten Gruppe (rBV : $23,0 \pm 2,3$ ml/100g Tumorgewebe, n=6) gegenüber der Kontrollgruppe (rBV : $20,0 \pm 2,0$ ml/100g Tumorgewebe, n=7) tendenziell erhöht war zeigte sich in der MBT0206-Gruppe (rBV : $13,8 \pm 2,0$ ml/100g Tumorgewebe, n=7) eine signifikante Reduktion des Intratumoralen Blutvolumens sowohl gegenüber der Kontroll-, als auch gegenüber der Paclitaxel-Gruppe.

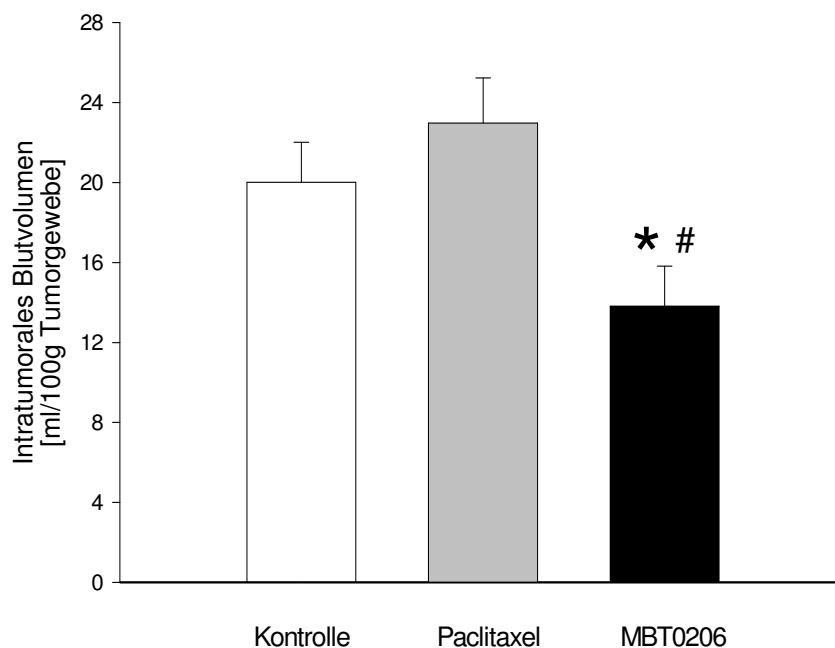


Abb. 20: Intratumorales Blutvolumen berechnet nach dem 2-Kompartiment Modell nach Brix et al. Mittelwerte \pm SEM: *p < 0,05 gegen Paclitaxel; #p < 0,05 gegen Kontrolle.

1.1.2.4.2 Intratumoral Blutfluss (rBF)

Bei der Betrachtung des Intratumoralen Blutflusses in **Abb. 21**, der Perfusion des Tumors, ergab sich für die Tiere, die eine Therapie mit MBT0206 (rBF : $8,6 \pm 1,8$ ml/min/100g Tumorgewebe, $n=7$) erhalten hatten, nur eine geringe Reduktion gegenüber den Kontrolltieren (rBF : $10,3 \pm 1,8$ ml/min/100g Tumorgewebe, $n=7$). Signifikanz wurde nicht erreicht. Unter Therapie mit freiem Paclitaxel (rBF : $15,3 \pm 3,5$ ml/min/100g Tumorgewebe, $n=6$) wurde im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen ein tendenziell höherer intratumoraler Blutfluss gemessen.

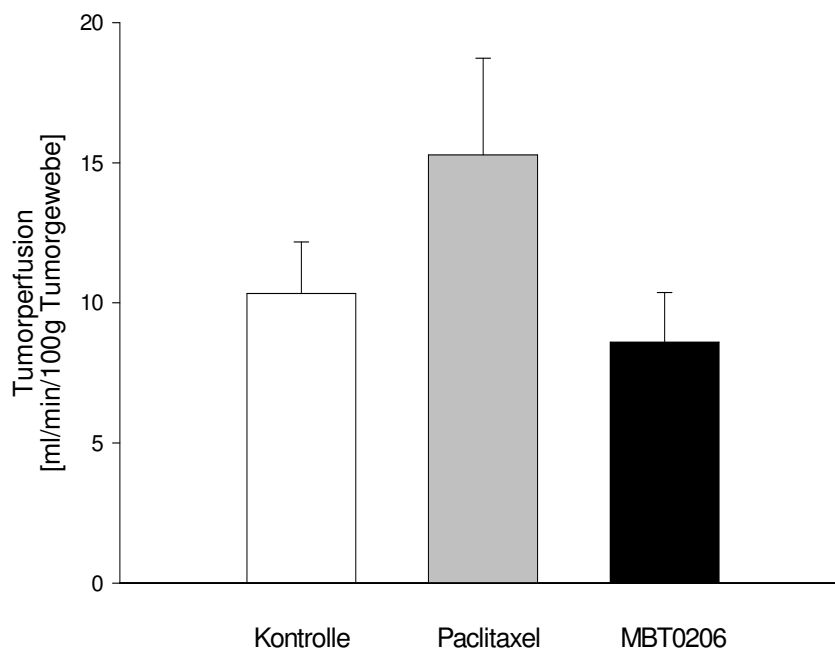


Abb. 21: Tumorperfusion berechnet nach dem 2-Kompartiment Modell nach Brix et al. Mittelwerte \pm SEM.

1.1.2.4.3 Permeabilitäts-Oberflächen-Produkt (PS/V)

Wie bereits dargestellt ergab sich für den relativen Plasmaanteil f_p am untersuchten Gewebe eine signifikante Verringerung in der MBT0206-Gruppe (f_p $10,9 \pm 1,5$) gegenüber den beiden anderen Gruppen (f_p Paclitaxel: $18,1 \pm 1,8$; f_p Kontrolle: $15,8 \pm 1,5$) (**Tab. 3**). Zu großen Unterschieden bei der relativen Betrachtung des interstitiellen Volumenanteils f_i am untersuchten Tumorgewebe kam es jedoch nicht (f_i MBT0206: $22,6 \pm 3,6$ %; f_i Paclitaxel: $24,0 \pm 6,6$ %; f_i Kontrolle: $20,9 \pm 7,9$ %). Die Ergebnisse zeigen, dass es bei gleich bleibendem interstitiellem Volumen und einer Reduktion des Plasmavolumens zu einem erhöhten Übertritt des Kontrastmittels aus dem Plasma ins Interstitium gekommen ist. Dies wiederum impliziert eine Zunahme der endothelialen Permeabilität. Dies schlägt sich tendenziell auch in der Berechnung des Permeabilitäts-Oberflächen-Produktes, welches in **Abb. 22** dargestellt ist, nieder. Ein signifikanter Anstieg des PS/V in der MBT0206-Gruppe (PS/V : $0,13 \pm 0,07$ 1/min, $n=7$) zeigt sich gegenüber der Kontrollgruppe (PS/V : $0,08 \pm 0,03$ 1/min, $n=7$) und auch gegenüber der Paclitaxel-Gruppe (PS/V : $0,05 \pm 0,02$ 1/min, $n=5$) allerdings nicht.

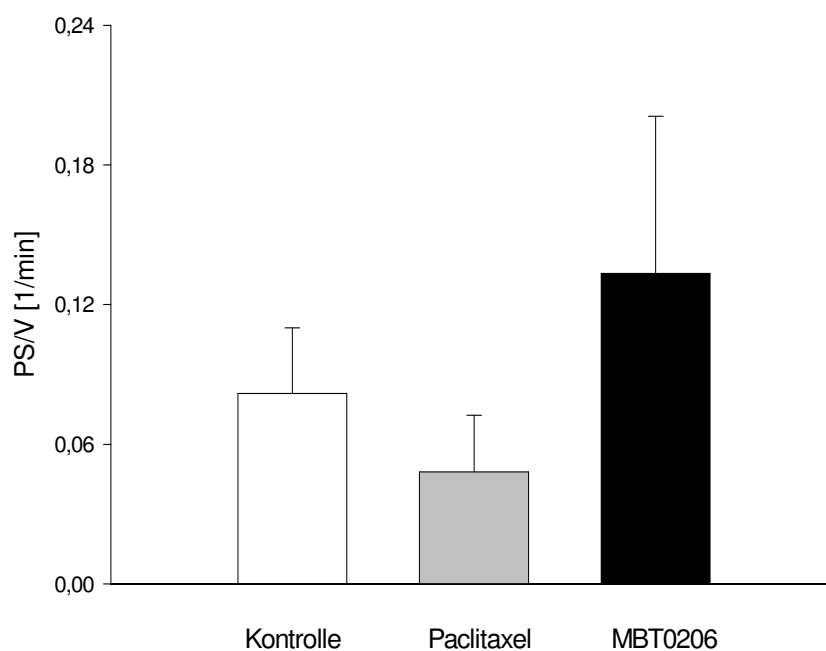
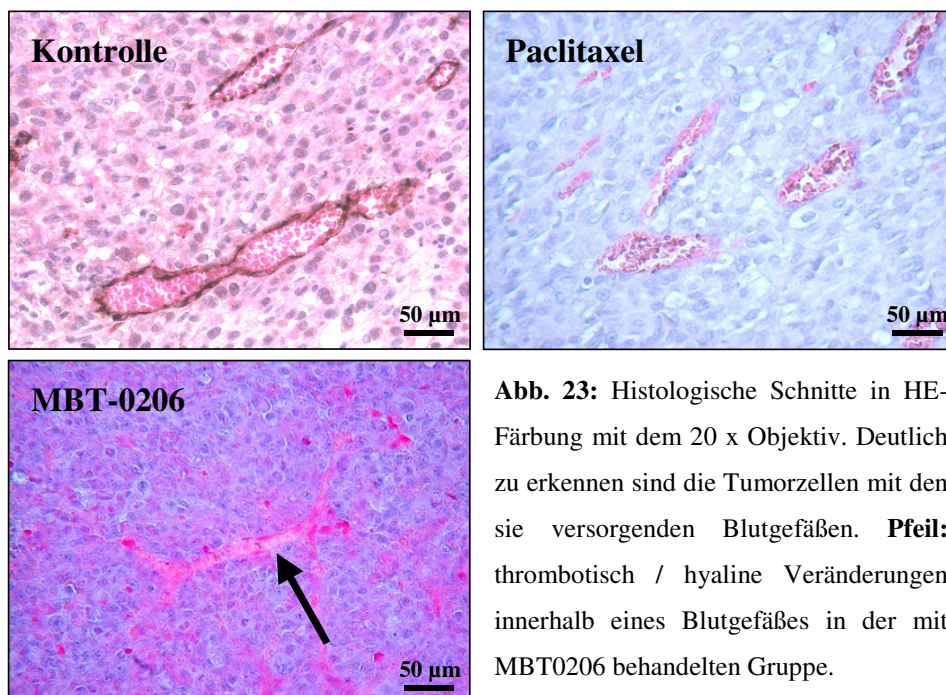


Abb. 22: Permeabilitäts-Oberflächen-Produkt als Maß für die endotheliale Durchlässigkeit der Tumorgefäße, berechnet nach dem 2-Kompartiment Modell nach Brix et al. Mittelwerte \pm SEM.

1.1.3 Ergebnisse der histologischen Untersuchungen

Nach Abschluss der Messungen im MRT wurden die Versuchstiere getötet und die Tumore entnommen und fixiert. In einem zweiten Schritt schloss sich dann die histologische Aufbereitung mittels HE und CD31-Färbung an. Die Betrachtung der in HE gefärbten Schnittpräparate in **Abb. 23** mit einem 20 x Objektiv zeigt deutlich, dass es zu morphologischen Unterschieden in den einzelnen Versuchsgruppen gekommen ist. Die histologischen Schnitte der Paclitaxel- sowie der Kontrollgruppe zeigen in den allermeisten angeschnittenen Gefäßabschnitten freie, für Erythrozyten durchgängige, Gefäße. Dem gegenüber kam es in der mit MBT0206 therapierten Gruppe in einer großen Zahl der angeschnittenen Gefäßbereiche zu thrombotisch hyalinen Veränderungen im Gefäßlumen.



Bei Verwendung des 40 x Objektivs in **Abb. 24** zeigen sich in der MBT0206-Gruppe darüber hinaus in die thrombotischen Areale migrierte Makrophagen, die eine Entstehung der Thrombosen post mortem ausschließen.

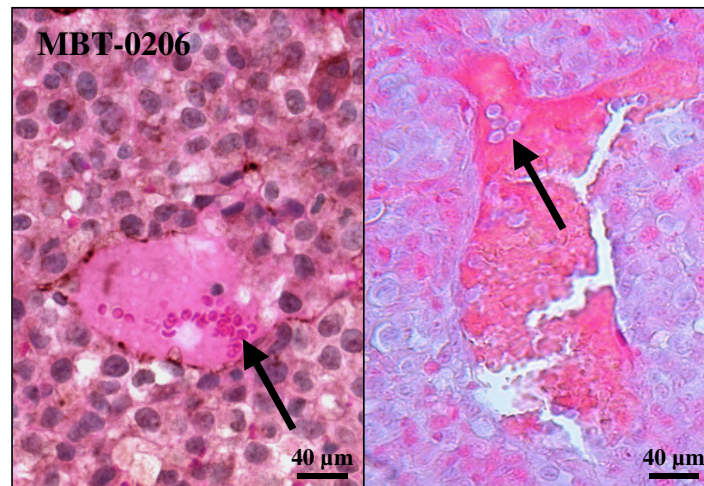


Abb. 24: Histologische Schnitte, untersucht mit dem 40 x Objektiv, aus der mit MBT0206 behandelten Gruppe.
Pfeil links: Kompletter Verschluss eines Tumorgefäßes. **Pfeil rechts:** In das thrombotierte Gefäß eingewanderte Makrophagen.

Auch die mittels CD31-Färbung und digitaler Bildbearbeitung erfasste Gefäßdichte zeigte deutliche Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wie in **Abb. 25** zu sehen ist. Die mit MBT0206 behandelten Tiere ($0,8 \pm 0,1$ % Gefäßfläche/Gesamtbildfläche, $n=5$) zeigten dabei eine mehr als 50 %ige Verringerung der Gefäßdichte gegenüber der Kontrollgruppe ($1,8 \pm 0,2$ % Gefäßfläche/Gesamtbildfläche, $n=6$). Eine signifikante Reduktion der Gefäßdichte konnte auch gegenüber den mit Paclitaxel ($1,4 \pm 0,1$ % Gefäßfläche/Gesamtbildfläche, $n=6$) therapierten Tieren gemessen werden.

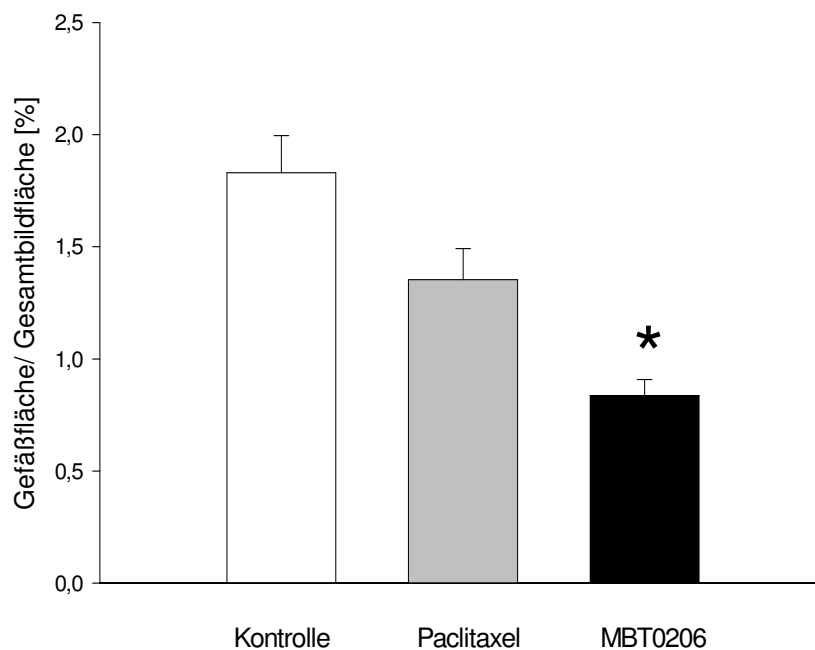


Abb. 25: Gefäßdichte in den mit CD31 markierten Schnittpräparaten. Die Gefäßfläche wurde mittels digitaler Bildverarbeitung in % der Gesamtbildfläche dargestellt. Mittelwerte \pm SEM: * $p < 0,05$ gegen Kontrolle und Paclitaxel. Anova on Ranks, post hoc Dunn's Test.

Unter Therapie mit MBT0206 ($3,8 \pm 0,8$ Thrombosen/ $0,1 \text{ mm}^2$ Gefäßfläche, $n=5$) erhöhte sich die Zahl der Thrombosen im Gesichtsfeld bezogen auf die gesamte Gefäßquerschnittsfläche im untersuchten Gesichtsfeld signifikant gegenüber beiden anderen Gruppen wie **Abb. 26** zeigt. Auch unter Paclitaxel-Therapie ($1,5 \pm 0,7$ Thrombosen/ $0,1 \text{ mm}^2$ Gefäßfläche, $n=5$) kam es zu einer tendenziellen Zunahme der Thrombosenzahl gegenüber der Kontrollgruppe ($1,0 \pm 0,8$ Thrombosen/ $0,1 \text{ mm}^2$ Gefäßfläche, $n=5$).

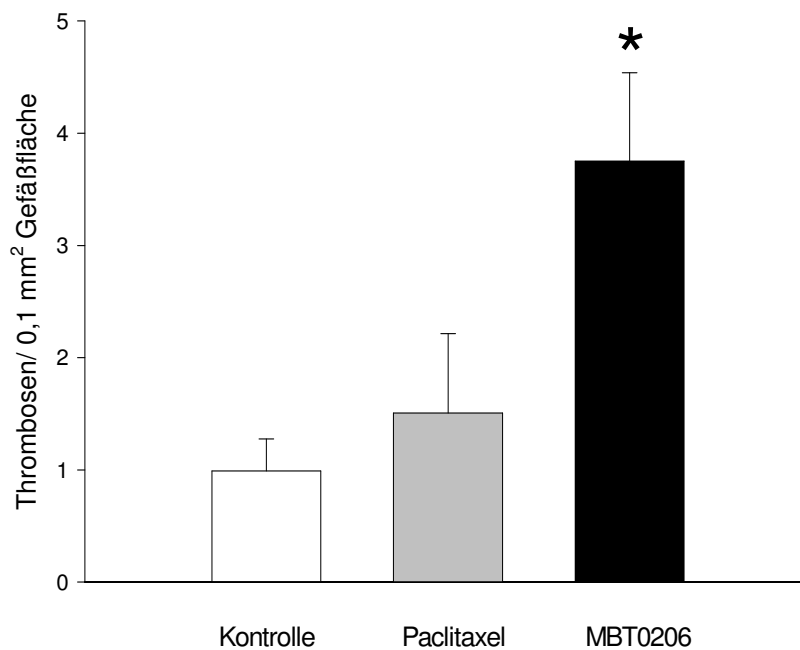


Abb. 26: Thrombosenzahl im HE-Schnitt. Mittelwerte \pm SEM: * $p < 0,05$ gegen Kontrolle und Paclitaxel. Anova on Ranks, post hoc Dunn's Test.

1.2 Studie II

1.2.1 Konzentrations-Zeit-Kurven im arteriellen Blut

Ausgangspunkt aller Berechnungen waren wie in Studie I die Konzentrations-Zeit-Kurven, die sowohl im arteriellen Blut als auch im Tumor gemessen wurden. Während der 60-minütigen Messung im MRT wurden wiederum 49 T_1 -Zeiten gemessen und nach Umrechnung in die Relaxivität als ΔR gegen die Zeit aufgetragen. Als Kontrastmittel kam das makromolekulare Gadolinium-Albumin mit einem Molekulargewicht von 66000 D zum Einsatz. Die Konzentrations-Zeit-Kurven, die im arteriellen Blut im linken Ventrikel gemessen wurden, unterschieden sich dabei nur sehr gering. **Abb. 27** zeigt die Kurvenverläufe der einzelnen Versuchstiere.

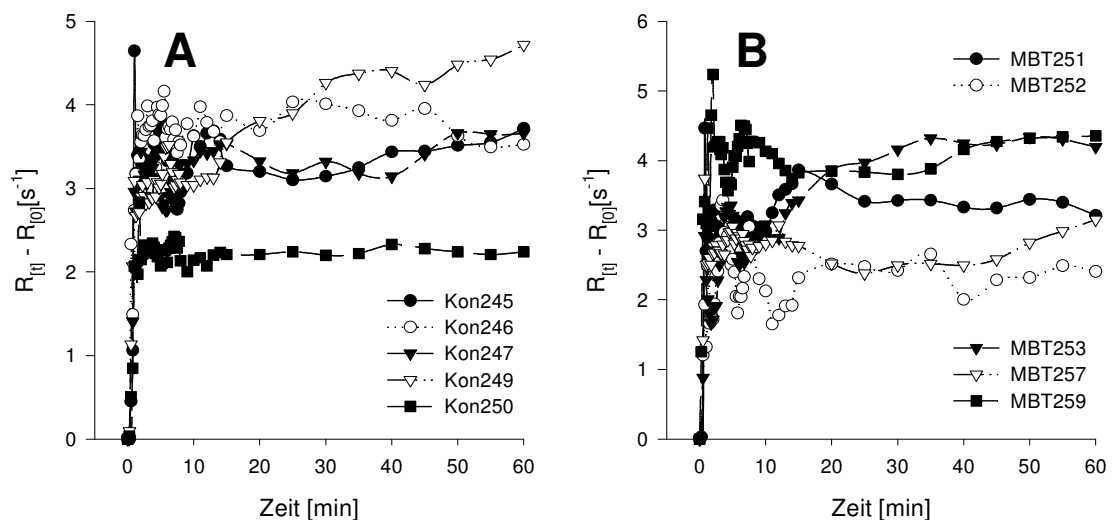


Abb. 27: **A:** Konzentrations-Zeit-Kurven der einzelnen Kontrolltiere. **B:** Konzentrations-Zeit-Kurven der mit MBT2026 behandelten Versuchstiere. Gemessen wurde im linken Ventrikel über einen Zeitraum von 60 min. Das makromolekulare Kontrastmittel Gadolinium-Albumin wurde in Form eines Bolus (ca. 10 s) zu Beginn der Messung injiziert.

Die Mittelwertskurven im arteriellen Blut, die in **Abb. 28** dargestellt sind zeigen, wie in Studie I, dass auch bei Verwendung des makromolekularen Kontrastmittels keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen zustande kommen. Nach dem initialen steilen Anstieg zeigt die Konzentration, im Rahmen der Messgenauigkeit, über den Untersuchungszeitraum annähernd konstante Werte. Vergleicht man allerdings die

Kurvenverläufe im arteriellen Blut aus Studie I und II, wird deutlich, welchen Einfluss die Molekülgröße des Kontrastmittels auf die Relaxivität im Plasma hat. Fällt die Relaxivität nach Ende der Kontrastmittel-Applikation in Studie I sofort wieder ab, so bleibt diese in Studie II über den gesamten Messzeitraum von 60 min auf einem konstanten Niveau.

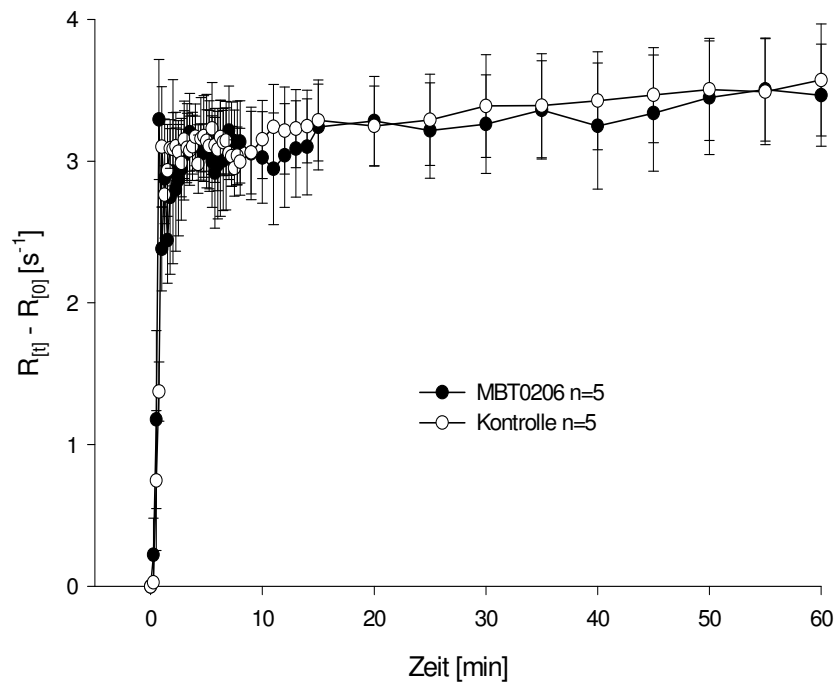


Abb. 28: Konzentrations-Zeit-Kurven der beiden Versuchsgruppen, gemessen im linken Ventrikel über einen Zeitraum von 60 min. Mittelwerte \pm SEM. Verwendet wurde das makromolekulare Kontrastmittel Gadolinium-Albumin.

1.2.2 Konzentrations-Zeit-Kurven im Tumorgewebe

Die Messung der Konzentrations-Zeit-Kurven im Tumor ergab für beide Gruppen annähernd gleiche Kurvenverläufe (**Abb. 29**). Abgesehen von Versuchstier Kon245 zeigt sich für die Tiere der Kontrollgruppe eine tendenziell geringere Steigung in der späten Phase der Messung. Im Vergleich mit der im Tumor gemessenen Konzentrations-Zeit-Kurve aus Studie I konnte kein initiales Maximum, nach dessen Erreichen die Relaxivität ΔR wieder abnimmt, festgestellt werden. Es zeigte sich dagegen eine stetige Zunahme der Relaxivität, deren Maximum bis zum Ende der Messung nicht erreicht wird.

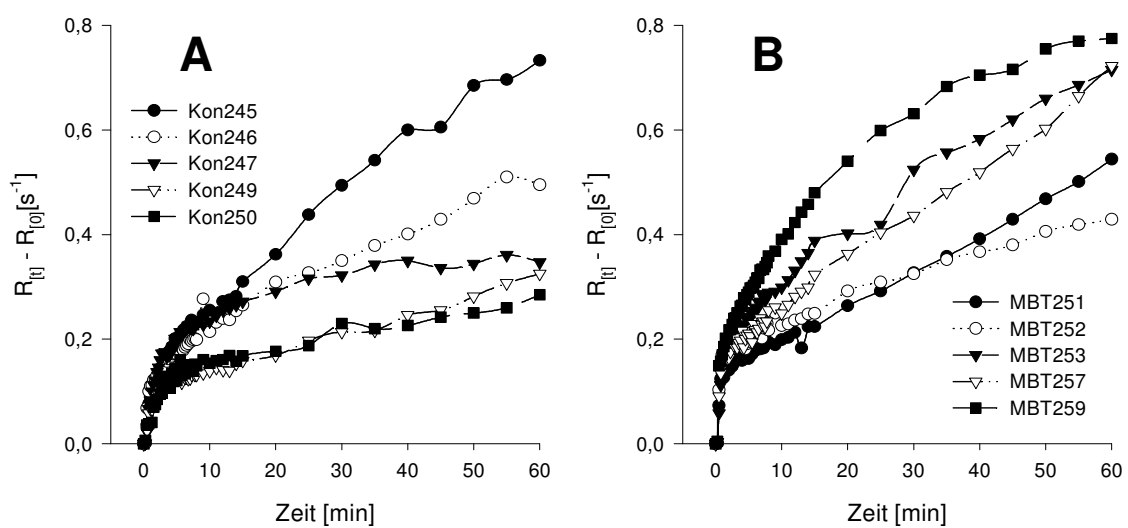


Abb. 29: Konzentrations-Zeit-Kurven der einzelnen Versuchstiere gemessen im Tumor über 60 min. Als Kontrastmittel wurde Gadolinium-Albumin verwendet. **A:** Versuchstiere der Kontrollgruppe **B:** Versuchstiere der MBT0206-Gruppe.

Die Mittelwertskurven, die in **Abb. 30** dargestellt sind, zeigten für die MBT0206-Gruppe eine tendenziell größere Steigung in der späten Phase der Messung.

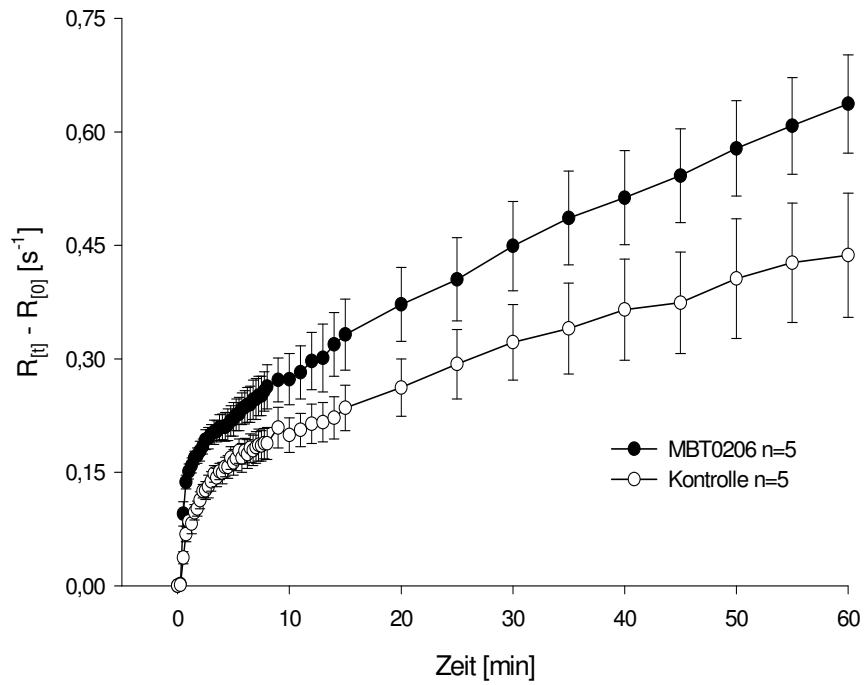


Abb. 30: Konzentrations-Zeit-Kurven aufgetragen als Mittelwerte \pm SEM. Gemessen wurde die Konzentration an Gadolinium-Albumin im Tumor über einen Zeitraum von 60 min.

1.2.3 Steigung der Regressionsgeraden in der späten Phase

Um Aussagen über eine mögliche Änderung der Permeabilität für makromolekulare Substanzen machen zu können, wurde an alle Konzentrations-Zeit-Kurven, die im Tumor gemessen wurden, in der späten Phase eine Regressionsgerade angelegt und deren Steigung bestimmt. **Abb. 31A** zeigt exemplarisch die Regressionsgeraden der Mittelwertskurven in der späten Phase ab der 12. min (Geradengleichung: MBT0206: $y = 0,00749x + 0,2096$; Kontrolle: $y = 0,00508x + 0,1554$). In **Abb. 31B** sind dagegen die Steigungen der einzelnen Versuchstiere aus der Kontrollgruppe ($0,0048 \pm 0,0057 \Delta R/\Delta t$) sowie aus der MBT0206-Gruppe ($0,0071 \pm 0,0008 \Delta R/\Delta t$) in einem Box Plot dargestellt. Bei relativ großer Streuung der Werte zeigt sich tendenziell eine Erhöhung der Permeabilität für Gadolinium-Albumin in der mit MBT0206 behandelten Gruppe.

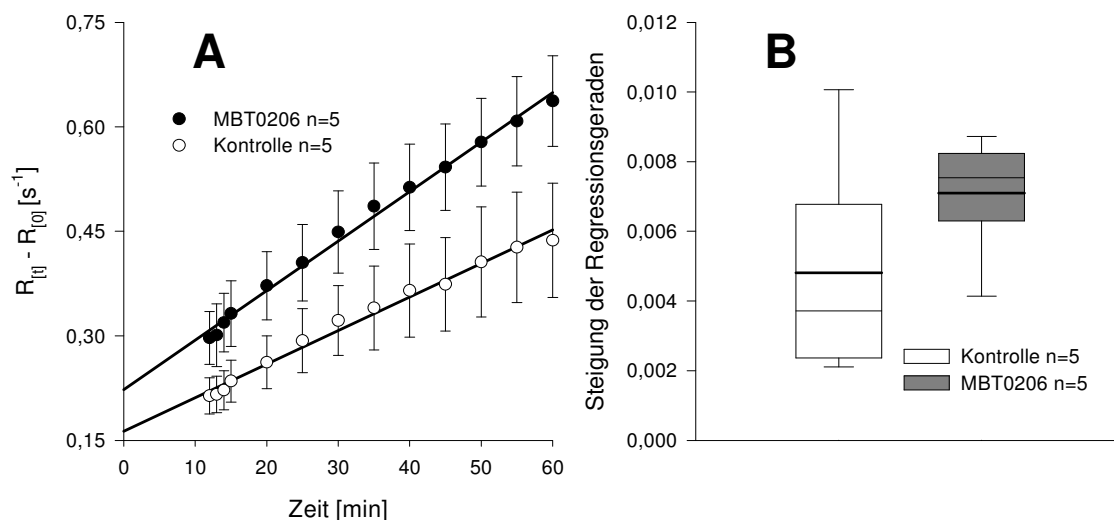


Abb. 31: **A:** Lineare Regressionsgerade der Mittelwerte der beiden Versuchsgruppen \pm SEM zu den einzelnen Meßzeitpunkten ab Minute 12. **B:** Steigungen der Regressionsgeraden ($\Delta R/\Delta t$) der einzelnen Versuchstiere aufgetragen in einem Box-Plot, der jeweilige Mittelwert ist als dicke Linie dargestellt.

2. Ergebnisse der klinischen Studie

Da auf Grund der geringen Fallzahl und des sehr inhomogenen Patientenguts eine systematische Darstellung der Ergebnisse nicht möglich ist, werden im Folgenden die Untersuchungsergebnisse von 2 Patienten einzeln dargestellt.

2.1 Patient I

Bei Patient I handelte es sich um einen 50 Jahre alten Mann mit einer ausgedehnten nuchalen Metastase eines Plattenepithelkarzinoms. Zustand nach histologisch gesichertem Oro-/Hypopharynx-Karzinom (T4 N3 M0 G3). Erstdiagnose im November 2002. Bis zum Einschluss in die vorliegende Studie hatte er nach primärer Radiochemotherapie mit einer Bestrahlungsintensität von 69 Gy, eine diagnostische Stützendoskopie, und daran anschließend eine Neck dissektion mit radikaler Entfernung des Tumors im März 2003 erhalten. Therapie und dMRT Messungen im Rahmen der LipoPac[®] Studie erhielt der Patient Ende September 2003. **Abb. 32** zeigt zwei axiale MRT-Schnitte in unterschiedlichen Sequenzen in Höhe der Mandibula. Deutlich zu erkennen ist eine ausgedehnte nuchale Lymphknotenmetastase rechts mit inhomogener Binnenstruktur die sich massiv unter die Haut vorwölbt. Im Rahmen der Studie erhielt der Patient 3 x 16 mg/kg KG LipoPac[®] an Tag 1, 3 und 5.

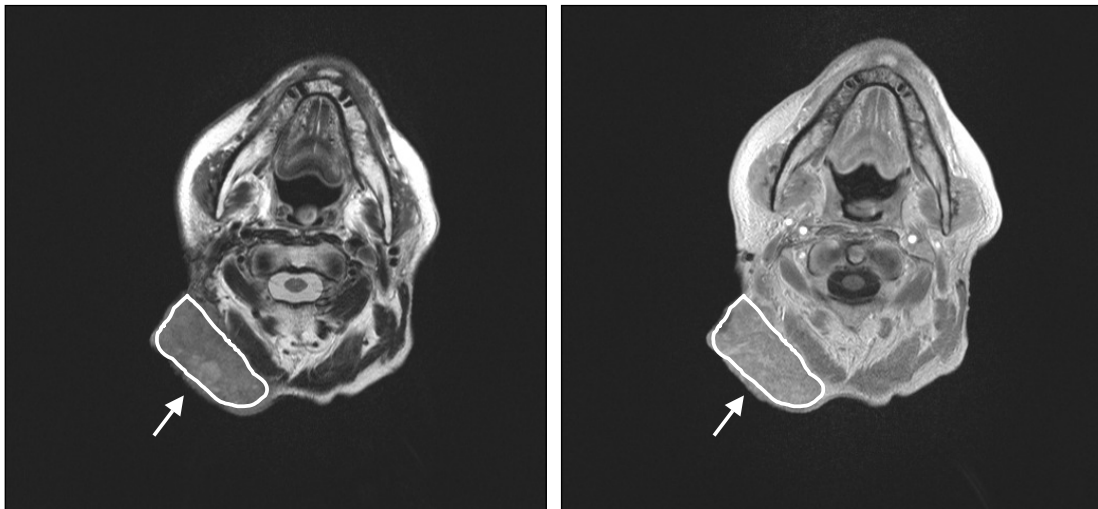


Abb. 32: MRT Bilder in axialer Ebene auf Höhe der Mandibula. **Links:** T₂ gewichtete Aufnahme vor Kontrastmittel-Applikation. **Rechts:** T₁ gewichtete Aufnahme nach Kontrastmittel-Gabe (Gadolinium-DTPA). **Pfeile:** ausgedehnte Lymphknotenmetastase rechts zervical. Im markierten Tumorareal wurden mittels dMRT gemessen.

2.1.1 Konzentrations-Zeit-Kurven in arteriellem Blut und Tumorgewebe

Während der 12 min und 32 s dauernden Messung wurden in 4 unterschiedlichen Schichten jeweils 470 T_1 -Zeiten im zeitlichen Abstand von 1,6 s gemessen. In **Abb. 33A** und **33B** sind die im arteriellen Blut sowie im Tumorgewebe gemessene Relaxivität ΔR gegen die Zeit in s aufgetragen. Im arteriellen Blut kommt es dabei sowohl vor als auch in den zwei Messungen nach Therapie zu keinen nennenswerten Unterschieden im Verlauf der Kurven. Im Tumorgewebe zeigt sich aber bereits an Tag 7 eine Verringerung des Maximums gegenüber Tag 0, noch deutlicher ist der Effekt an Tag 14. Hier konnte ein deutlich geringeres Maximum sowie ein langsames Abfluten des Kontrastmittels aus dem Tumor gemessen werden.

2.1.2 Quantitative Parameter

Abb. 33A, B und **C** zeigen die nach Brix et al. ausgewerteten quantitativen Parameter (Brix et al. 2004). Das Intratumorale Blutvolumen zeigt initial einen Anstieg um 30 % an Tag 7, fällt aber in den nächsten 7 Tagen auf 61 % des Ausgangswertes an Tag 0 ab. Auch der intratumorale Blutfluss, also die Perfusion, steigt an Tag 7 leicht um 9 % an, zeigt dann aber einen massiven Abfall an Tag 14 auf nur noch 36 % des Ausgangsniveaus. Das Permeabilitäts-Oberflächen-Produkt fällt an Tag 7 um mehr als 45 %, steigt dann allerdings wieder um wenige Prozent auf über 64 % des Ausgangswertes an.

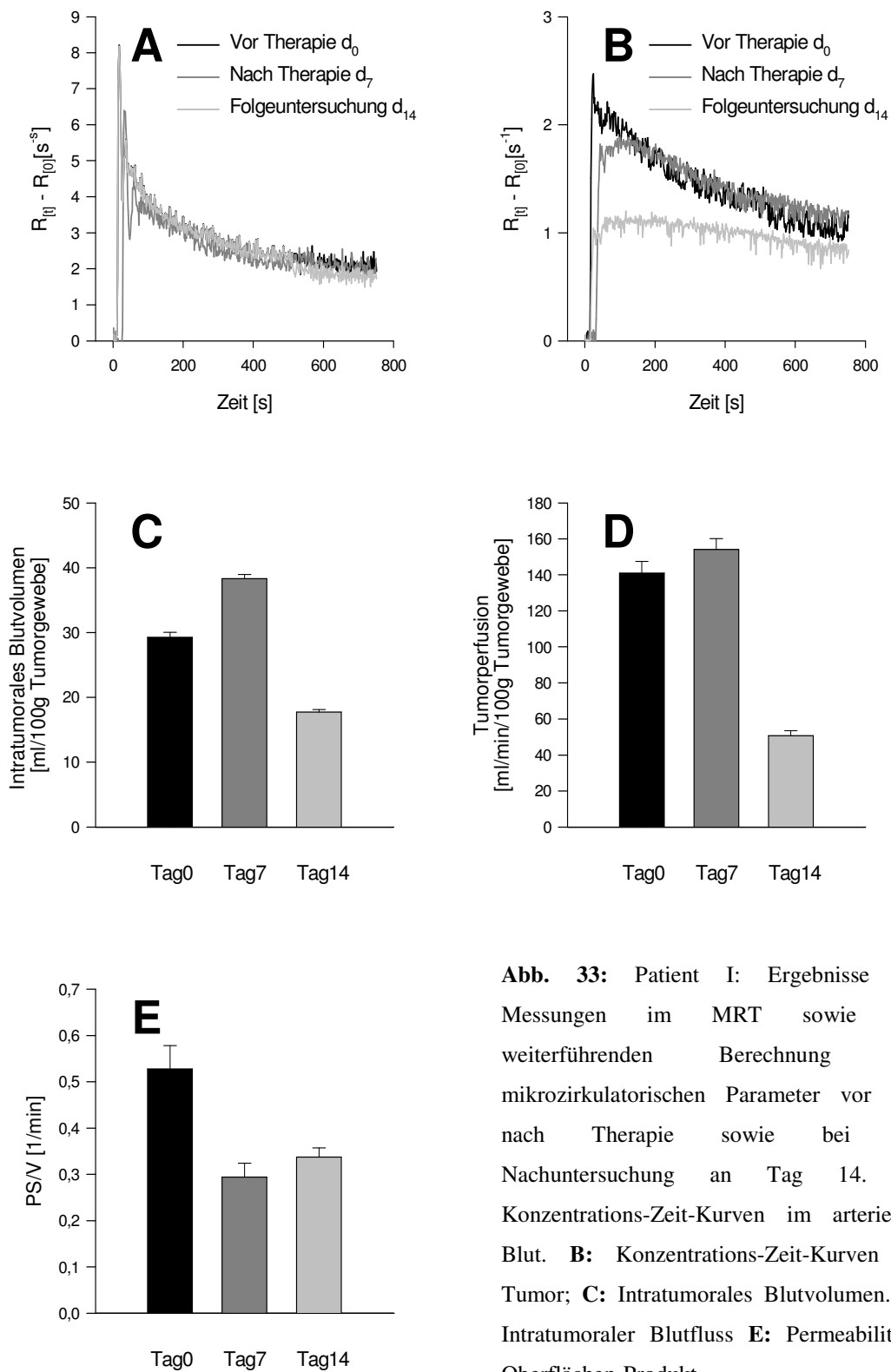


Abb. 33: Patient I: Ergebnisse der Messungen im MRT sowie der weiterführenden Berechnung der mikrozirkulatorischen Parameter vor und nach Therapie sowie bei der Nachuntersuchung an Tag 14. **A:** Konzentrations-Zeit-Kurven im arteriellen Blut. **B:** Konzentrations-Zeit-Kurven im Tumor; **C:** Intratumorales Blutvolumen. **D:** Intratumoraler Blutfluss **E:** Permeabilitäts-Oberflächen-Produkt.

2.2 Patient II

Bei Patient II handelte es sich um einen 64 Jahre alten Mann mit einem ausgedehnten Zweitkarzinom von Hypopharynx-Ösophagus (Histologie: geringgradig differenziertes Plattenepithelkarzinom). Bereits im Februar 1998 war ein histologisch gesichertes Plattenepithelkarzinom des Hypopharynx (pT1 pN2 pMo R0) diagnostiziert worden. Die damalige Therapie umfasste die Tumorresektion über eine laterale Pharyngotomie sowie eine Neckdissektion beidseits im März 1998. Postoperativ erhielt er eine Radiochemotherapie von April bis Juli 1998. Die Therapie im Rahmen der LipoPac[®] Studie erhielt der Patient im Mai 2004. Die in **Abb. 34** gezeigten MRT Bilder führen einen axialen Schnitt in Höhe der Lungenspitzen. Der mittels dMRT gemessene Tumorbezirk befindet sich retrotracheal mit einer Ausbreitung nach kaudal bis weit ins Mediastinum. Im Rahmen der Studie erhielt Patient II 3 x die Dosis von 32 mg/kg KG LipoPac[®].

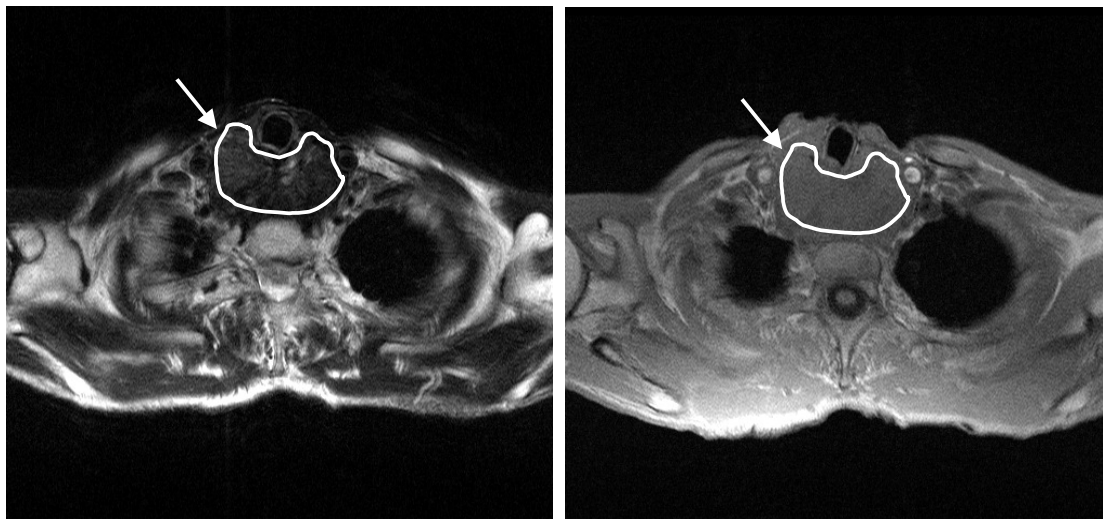


Abb. 34: MRT Bilder im axialen Schnitt auf Höhe der Apex pulmonis. Tumor im retrotrachealen Raum mit Ausdehnung vom Hypopharynx bis ins mittlere Mediastinum. **Links:** T₂ gewichtete Sequenz vor Kontrastmittel-Gabe. **Rechts:** T₁ gewichtete Sequenz nach Kontrastmittel-Applikation (Gadolinium-DTPA). **Pfeile:** markiertes Tumorareal in dem mittels dMRT gemessen wurde.

2.2.1 Konzentrations-Zeit-Kurven in arteriellem Blut und Tumorgewebe

Abb. 35 zeigt die Konzentrations-Zeit-Kurven im arteriellen Blut sowie im Tumorgewebe. Gegenüber Patient I fällt auf, dass die Konzentrations-Zeit-Kurven an Tag 14 im arteriellen Blut sowie alle Messungen im Tumorgewebe starke Schwankungen in der Relaxivität ΔR

aufweisen. Ein Vergleich der Kurvenverläufe fällt aus diesem Grunde schwer. Um die Berechnung der quantitativen Parameter zu erleichtern wurden die Kurven mit Hilfe des Programms FlexPro 6.0 (Weisang GmbH & Co. KG, Deutschland) gemittelt und erst dann zur Berechnung freigegeben.

2.2.2 Quantitative Parameter

Bei Betrachtung des Intratumoralen Blutvolumens zeigt sich an Tag 7 eine Reduktion um mehr als ein Drittel, an Tag 14 zeigt sich aber bereits wieder ein Anstieg auf 78 % des Ausgangswertes. Der Intratumorale Blutfluss verringert sich um 15 % an Tag 7 auf 43 % des Ausgangswertes an Tag 14. Auch das Permeabilitäts-Oberflächen-Produkt zeigt eine deutliche Abnahme nach Therapie, es sinkt an Tag 7 auf 85 %, an Tag 14 sogar weiter auf 54 % des Ausgangswertes an Tag 0 ab.

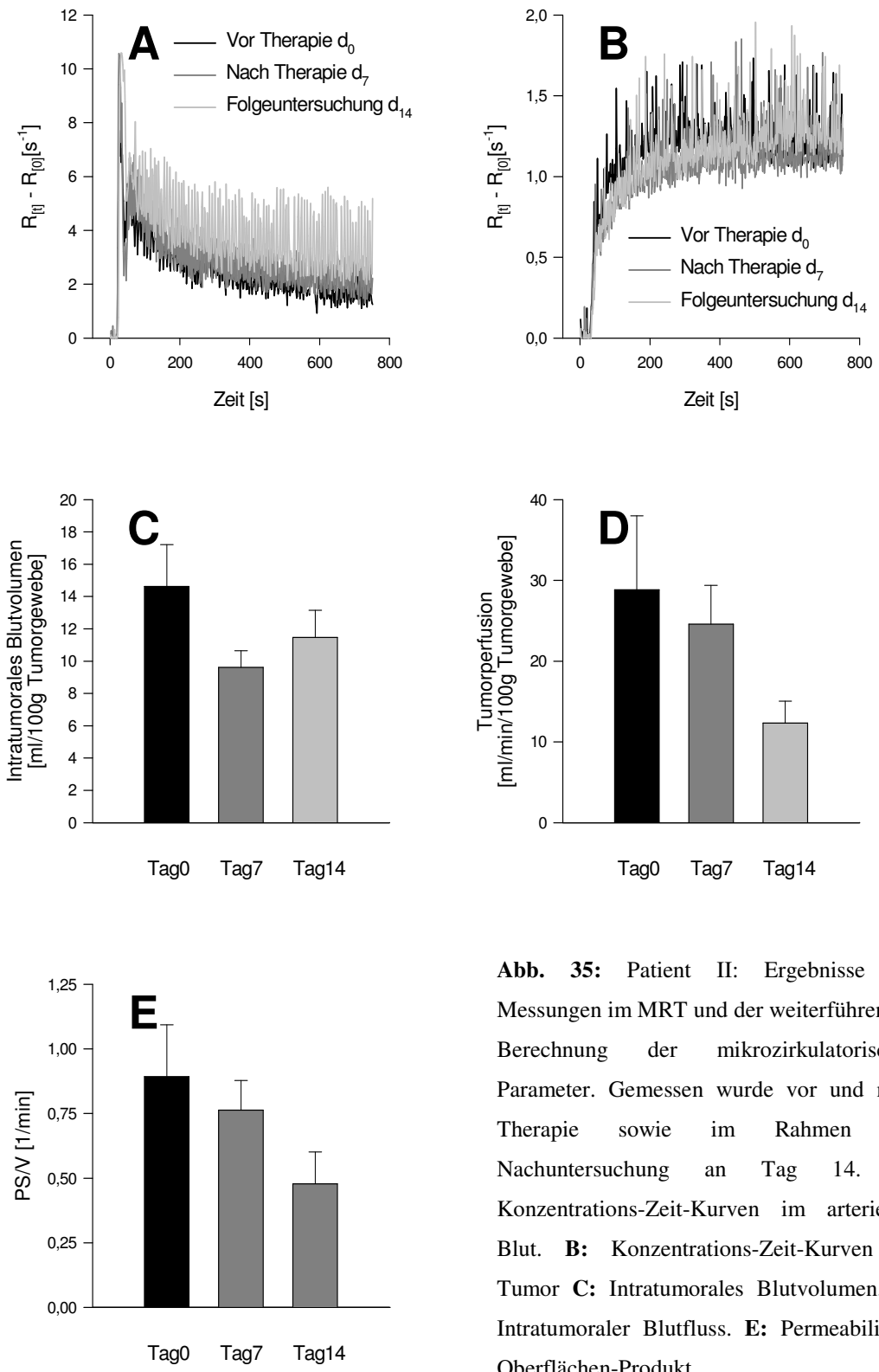


Abb. 35: Patient II: Ergebnisse der Messungen im MRT und der weiterführenden Berechnung der mikrozirkulatorischen Parameter. Gemessen wurde vor und nach Therapie sowie im Rahmen der Nachuntersuchung an Tag 14. **A:** Konzentrations-Zeit-Kurven im arteriellen Blut. **B:** Konzentrations-Zeit-Kurven im Tumor **C:** Intratumorales Blutvolumen. **D:** Intratumoraler Blutfluss. **E:** Permeabilitäts-Oberflächen-Produkt.

IV. Diskussion

1. Diskussion der experimentellen Studien

Grundlage der vorliegenden experimentellen Arbeit war die bereits in mehreren Studien untersuchte gute Wirksamkeit von Paclitaxel in kationischen Liposomen (MBT0206) im Hinblick auf Veränderungen der Mikrozirkulation sowie des Wachstums von soliden Tumoren (Schmitt-Sody *et al.* 2001). Da mikrozirkulatorische Parameter unter Therapie mit MBT0206 bisher nur am Modell der Rückenhautkammer am Syrischen Goldhamster *in vivo* untersucht wurden (Eichhorn *et al.* 2004; Strieth *et al.* 2004), sollten im Rahmen dieser Arbeit mikrozirkulatorische Veränderungen mit Hilfe der dMRT auch am subkutan implantierten A-Mel-3 *in vivo* verifiziert werden. Dabei musste, vor dem möglichen Einsatz des Verfahrens in einer klinischen Studie, auch geklärt werden, in wie weit die dMRT in Verbindung mit einem niedermolekularen (Studie I), bzw. makromolekularem Kontrastmittel (Studie II), überhaupt in der Lage ist, Veränderungen in der Mikrozirkulation zu detektieren. Im Folgenden sollen nun Methodik und Ergebnisse der experimentellen als auch der klinischen Studie zuerst getrennt diskutiert und anschließend in Zusammenschau bearbeitet werden.

1.1 Methodik

1.1.1 Subkutanes Tumormodell

1.1.1.1 Das amelanotische Hamstermelanom A-Mel-3

Das in dieser Arbeit verwendete amelanotische Hamstermelanom A-Mel-3 wurde 1961 erstmals von Fortner *et al.* beschrieben (FORTNER *et al.* 1961). Der Tumor zeichnet sich durch eine weit über 90% liegende Angehrate, schnelles Wachstum sowie frühzeitige Metastasierung aus. Spontanregressionen konnten bisher nicht beobachtet werden. Bereits in frühen Stadien kommt es zur Metastasierung des A-Mel-3 in die axillären und inguinalen Lymphknoten. Periaortale, pelvine und thorakale Lymphknotengruppen sind weitaus seltener betroffen. Organmetastasen in Lunge, Niere und Leber finden sich bei subkutaner Implantation erst in weit fortgeschrittenen Tumorstadien.

1.1.1.2 Messung des subkutanen Tumorwachstums

Um die quantitativen mikrozirkulatorischen Parameter, die mittels dMRT unter Therapie mit MBT0206 und Paclitaxel erhoben wurden, auch vor dem Hintergrund einer Beeinflussung des Wachstums einordnen zu können, wurde das Tumolvolumen ab Beginn der Therapie dokumentiert. Die Volumenberechnung für das amelanotische Hamstermelanom A-Mel-3, einem halbellsoidförmigen Tumor, wurde von Weiss et al. etabliert und validiert (Weiss *et al.* 1990). Bei der Vermessung von kleinen Tumoren zu Behandlungsbeginn spielt die Messungsgenauigkeit von $\pm 0,5$ mm eine nicht unwesentliche Rolle, da sie dreifach in die Volumenberechnung eingeht. Mit zunehmender Versuchsdauer hat die Messungsgenauigkeit aber nur noch einen untergeordneten Einfluss auf die Berechnung des Tumolvolumens.

1.1.2 Versuchsprotokoll und Durchführung der Messung

Aus den Wachstumsstudien von Weiss et al. war bekannt, dass unbehandelte Tiere, bei annähernd gleicher Zahl an subkutan implantierten Tumorzellen (ca. $4 - 6 \times 10^6$ Zellen; Vitalität 95 %), zwischen den Versuchstagen 3 und 10 ein stabiles reproduzierbares Tumorgefäßsystem entwickeln. Dieses Gefäßsystem nimmt über die Zeit deutlich an Größe zu. Ab ca. dem 10. Tag kommt es dann zu vermehrter Nekrosebildung in zentralen Anteilen des Tumors, da hier eine ausreichende Versorgung der Tumorzellen, aufgrund der sehr stark proliferierenden Randbereiche, nicht mehr gegeben ist. Um diesen Erkenntnissen gerecht zu werden, wurde an Tag 5 mit der jeweiligen Therapie begonnen, die Messung im MRT fand an Tag 8 statt. Um einen möglichen Einfluss der Tumorgröße auf die mikrozirkulatorischen Parameter zu minimieren, wurden die Tiere der Kontrollgruppe größenkorreliert zur MBT0206-Gruppe bereits an Tag 6 im MRT gemessen.

Um die Versuchstiere nicht über die Maßen hinaus zu belasten und auch die Verteilung des Kontrastmittels im Tumor nicht durch die unmittelbar vorausgehende Gabe der jeweiligen Therapiesubstanz zu beeinträchtigen, wurde die eigentliche Therapie bereits an Tag 7 beendet. Es wurde in den einzelnen Gruppen jeweils drei Mal therapiert, um einen möglichst maximalen Effekt zu erzielen.

Bei der Durchführung der Messungen im MRT mussten die Tiere mittels Inhalationsnarkose narkotisiert werden, um Bewegungsartefakte zu minimieren. Auf der anderen Seite sollte die Narkose möglichst oberflächlich sein, um Beeinflussungen des arteriellen Mitteldrucks und damit auch der Verteilung des Kontrastmittels im Körper möglichst gering zu halten. In vorangegangenen Versuchen, die in der Arbeitsgruppe durchgeführt wurden, konnte mittels invasiver arterieller Blutdruckmessung gezeigt werden, dass bei oberflächlicher

Inhalationsnarkose der Perfusionsdruck der Tumoren nicht beeinflusst wird. Auch die Applikation des jeweiligen Kontrastmittels hatte keinen Einfluss auf die Makrohämodynamik (Pahernik *et al.* 2001). Auf Grund dieser Erkenntnisse wurde im Rahmen dieser Studie auf eine invasive Blutdruckmessung verzichtet. Dass sich für die Versuchstiere der einzelnen Gruppen vergleichbare makrohämodynamische Verhältnisse ergaben, zeigen die annähernd gleichen Konzentrations-Zeit-Kurven im arteriellen Blut.

Trotz optimaler Narkose konnten minimale Fehler durch Bewegungsartefakte bei der Messung innerhalb des linken Ventrikels, die durch die normale Herztätigkeit entstanden, nicht komplett ausgeschlossen werden. In Mausmodellen, in denen neben einer schnelleren Herzfrequenz darüber hinaus nur ein sehr kleines Messareal im linken Ventrikel zur Verfügung steht, wurde dazu übergegangen, die Aquisition der Bilder an den EKG-Verlauf anzupassen. Standardisiert wurde EKG getriggert nur am Ende der Diastole gemessen (Pickup, Zhou, and Glickson 2003; Zhou *et al.* 2004). Am im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Hamstermodell sind die nicht an das EKG angepassten Aufnahmen nach den Untersuchungen von Pahernik *et al.* aber ausreichend genau (Pahernik *et al.* 2001).

1.1.3 dMRT und Tracerkinetische Modelle

Die Anfänge der Magnet-Resonanz-Tomographie gehen weit bis in die Mitte des letzten Jahrhunderts zurück. 1952 erhielten Bloch und Purcell für ihre Arbeiten zur „Entwicklung neuer Präzisionsmethoden des Kernmagnetismus (Nuclear Magnetic Resonance NMR)“ den Nobelpreis für Physik. Bis 1970 wurde diese Technik vor allem auf dem Gebiet der Physik und Chemie zur Strukturanalyse zum Einsatz gebracht. Erst 1971 konnte Damadian unterschiedliche NMR-Relaxationszeiten für Tumoren und gesundes Gewebe messen. Die Möglichkeit, die MRT als Diagnosemethode einzusetzen, war geboren (Damadian 1971). Damadian war es auch, der 1977 die erste Ganzkörperaufnahme eines Menschen durchführte. Er benötigte damals eine reine Meßzeit von 4 h 45 min. Bis dies aber möglich war wurde die MRT-Bildgebung mit Hilfe von Gradienten-Feldern 1973 durch P. Lauterbur und die Einführung der Phasen- und Frequenzkodierung unter Verwendung der Fouriertransformation durch Ernst 1975 weiter optimiert (Lauterbur 1989). Zeitgleich mit Damadians erster Ganzkörperaufnahme entwickelte Mansfield das Echo-Planar-Imaging (EPI) welches zu einer weiteren Verbesserung der Bildqualität führte (Mansfield and Maudsley 1977). Für ihre Arbeiten erhielt Ernst 1991 den Nobelpreis für Physik, 12 Jahre später wurden auch Lauterbur und Mansfield für ihre Errungenschaften auf dem Gebiet der Bildgebung mit Magnetresonanz mit dem Nobelpreis für Medizin geehrt. Heute stellt die

MRT-Bildgebung mit ca. 60 Mio. Untersuchungen pro Jahr weltweit und mehr als 25000 MRT-Geräten auf der ganzen Welt ein Routineverfahren der klinischen Diagnostik dar.

Lange Jahre wurde die MRT ausschließlich zur Darstellung rein anatomisch-morphologischer Strukturen verwendet. Seit den 90ziger Jahren des letzten Jahrhunderts wird sie darüber hinaus aber auch zur Messung dynamischer Vorgänge eingesetzt. Der cerebrale Blutfluss sowie die cerebrale Verstoffwechslung von Sauerstoff (Kim *et al.* 1999) können in der Zwischenzeit genauso gemessen werden wie die Glomeruläre-Filtrations-Rate der Niere (El Diasty *et al.* 2005). Die Messung dynamischer Vorgänge kann dabei auch im Hinblick auf Veränderungen der Mikrozirkulation von Tumoren angewendet werden.

Dabei hat die dMRT bei der Beurteilung vaskulärer Strukturen durchaus Vorteile gegenüber anderen bildgebenden Verfahren wie der Positronen Emissions Tomographie (PET), der Computer Tomographie (CT), dem Ultraschall und der Single Photonen Emissions Computer Tomographie (SPECT). dMRT-Verfahren sind nicht-invasiv, ohne Strahlenbelastung für den Patienten und sehr sensitiv im Bezug auf Veränderungen in der Mikrozirkulation. Darüber hinaus finden MRT-Geräte im Gegensatz zu PET- und SPECT-Geräten zunehmend auch in kleineren Kliniken sowie in Praxen Verbreitung. Da die Datenaquisition bei der dMRT in einem zeitlich überschaubaren Rahmen bleibt, könnte dieses Verfahren in Zukunft routinemäßig an Patienten mit soliden Tumoren zur Diagnostik und Therapiekontrolle zum Einsatz kommen (Padhani 2002).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit berechneten rein deskriptiven Parameter, initialer Anstieg, korrigiertes Maximum und Kontrastmittel-Clearance, die als Perfusion-like-Parameters eingeführt wurden (Hawighorst *et al.* 1998; Mayr *et al.* 1996), könnten im klinischen Alltag in der Verlaufskontrolle durchaus Anwendung finden, da sie aus den Konzentrations-Zeit-Kurven schnell und einfach zu berechnen sind. Genaue, quantitative Aussagen über einzelne Parameter der Mikrozirkulation, wie Tumorperfusion, können sie jedoch nicht leisten, da sie von anderen Faktoren wie den Volumenverhältnissen zwischen intra- und extravasalem Kompartiment oder der Gefäßpermeabilität zusätzlich beeinflusst werden (Lyng *et al.* 1998). Eine Möglichkeit der quantitativen Berechnung mikrozirkulatorischer Parameter bietet dagegen das im Rahmen der Studie I weiterführend verwendete 2-Kompartiment-Modell von Brix *et al.* (Brix *et al.* 1999). Dieses Modell bietet die Möglichkeit, quantitative Aussagen über mikrozirkulatorische Parameter zu treffen. Verwendet werden können sowohl dynamische CT- als auch MRT-Daten, die mit Hilfe von niedermolekularem Kontrastmittel erhoben wurden. In vorausgegangenen Arbeiten, z.B. von Miles *et al.*, konnte die Perfusion verschiedener Gewebstypen und Organe ausreichend genau

quantitativ gemessen werden (Miles 1991). Für eine Charakterisierung von Tumorblutgefäßen und die Erfassung von Veränderungen im Bereich der Mikrozirkulation unter antivaskulärer Therapie ist die alleinige Berechnung der Perfusion, die sich hauptsächlich aus der initialen Kontrastmittel-Aufnahme im Gewebe sowie der maximalen Kontrastmittel-Anreicherung im arteriellen Blut ergibt, aber nicht ausreichend. Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete 2-Kompartiment-Modell berücksichtigt dagegen sowohl die kapilläre Perfusion als auch die bidirektionalen Austauschvorgänge am Gefäßendothel des Tumors. Aussagen über die Gefäßpermeabilität, einem sehr wichtigen Parameter für die Beurteilung von antivaskulären Therapieeffekten, als auch über die Volumina der verschiedenen Kompartimente werden über die Analyse der Konzentrations-Zeit-Kurven in der späten Phase der Messung möglich. In Studie I wurde nach Ende der 4-minütigen Kontrastmittel-Applikation dafür weitere 56 min gemessen. Die Aspekte der Permeabilität wurden dabei basierend auf Modellen von Tofts et al. entwickelt (Tofts and Kermode 1991; Tofts, Berkowitz, and Schnall 1995; Tofts *et al.* 1999).

Die Zerlegung der in normalem Gewebe gemessenen Konzentrations-Zeit-Kurven in ein Plasma- und ein interstitielles Kompartiment zeigte im tracerkinetischen Modell nach Brix, dass die initiale Phase fast ausschließlich vom Kontrastmittel im intravaskulären Kompartiment bestimmt, und nur in sehr geringem Umfang durch die Permeabilität beeinflusst wird. Folglich kann die Perfusion von normalem Gewebe in der initialen Phase auch mit einem reinen Perfusions-Modell wie dem von Miles et al. ausreichend genau berechnet werden. In Geweben mit einer hohen Permeabilität der Gefäße, wie dies in Tumoren auf Grund der nur sehr bruchstückhaft ausgebildeten Basalmembran sowie der zum Teil großen interzellulären Lücken der Fall ist, ist ein reines Perfusions-Modell dem 2-Kompartiment-Modell aber unterlegen. Ist die Kontrastmittel-Anreicherung in einem solchen Gewebe stärker von der Permeabilität abhängig, so kommt es in den einfacheren Modellen zu einer Überschätzung des Blutflusses. Das Modell nach Brix berücksichtigt dagegen bereits in der initialen Phase die Diffusion des Kontrastmittels ins Interstitium und verhindert damit die Überbewertung des Blutflusses innerhalb des untersuchten Gewebes. Auch in der späteren Phase, also dem langsamen Abfluten des Kontrastmittels aus dem Gewebe, kann das hier verwendete Modell Vorteile gegenüber reinen Permeabilitäts-Modellen zeigen. Während bei diesen Ansätzen hauptsächlich die interstitielle Anreicherung im Vordergrund steht, schließt der komplexere Ansatz von Brix et al. den Beitrag des intravasalen Kompartimentes mit in die Berechnungen ein. In einer CT-Studie von 1999 an Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren konnte gezeigt werden, wie wichtig die Berücksichtigung des intravasalen Kompartimentes

bei der Betrachtung der Signalintensitäten im untersuchten Gewebe ist (Brix *et al.* 1999). Unterschiede zwischen den Signalintensitäten, die über dem Tumor gemessen wurden, gingen hauptsächlich auf Unterschiede im intravaskulären und nicht im interstitiellen Kompartiment zurück. Gute Übereinstimmung mit bisherigen Studien (Ruotsalainen *et al.* 1997; Senda *et al.* 1992) ergaben sich für einzelne der quantitativen Parameter, die aus den Konzentrations-Zeit-Kurven im Tumorgewebe berechnet wurden. Bemerkenswert muss allerdings, dass es bei der Berechnung des Blutflusses im Muskel- und Tumorgewebe zu relativ hohen Werten kam. Andere Parameter wie der relative Volumenanteil des Plasmas f_P , der relative Volumenanteil des Interstitiums f_I und das Permeabilitäts-Oberflächen-Produkt PS/V_P waren von dieser systemisch bedingten Überbewertung nicht betroffen. In den folgenden Jahren wurden weitere Studien basierend auf diesen Arbeiten durchgeführt und die Technik weiter verbessert (Brix *et al.* 2004).

Alle bisher diskutierten tracerkinetischen Modelle setzen den Einsatz eines niedermolekularen Kontrastmittels z. B. Gadolinium-DTPA (Magnevist[®]) voraus, dessen Verteilung durch drei Hauptfaktoren bestimmt wird. Dies ist zum einen die Durchblutung des jeweiligen Gewebes, der Transport des Kontrastmittels über die Gefäßwand hinaus ins Interstitium und die durch Diffusion bedingte Verteilung in diesem Raum. Der Anteil dieser Substanzen, der beim ersten Durchfluss durch ein Gewebe ins Interstitium übertritt, beträgt je nach Gefäßpermeabilität zwischen 50 % und 100 % (Gillies *et al.* 2002). Dies gilt für die meisten Gewebearten, abgesehen vom Gehirn, den Testes sowie der Retina, wo die Gefäße zusätzlich eine Schrankenfunktion besitzen und so einen Übertritt von Kontrastmittel und anderen Substanzen in den extravasalen extrazellulären Raum verhindern. Die Verteilung von makromolekularen Kontrastmitteln zeigt dagegen eine völlig andere Charakteristik: Während es in normalen Geweben zu keiner nennenswerten Extravasation von Makromolekülen kommt, konnte die Hyperpermeabilität von Tumorgefäßen für makromolekulare Substanzen in mehreren Studien gezeigt werden (Gerlowski and Jain 1986; Marzola *et al.* 2003). In der Studie von Marzola *et al.* wurde Gadolinium-DTPA-Albumin mit einem Molekulargewicht von ca. 94 000 D in einem Mausmodell mit humanem Kolon-Karzinom verwendet. Die mittels dMRT gemessene endotheliale Permeabilität für das Makromolekül war im Tumorrand signifikant gegenüber dem Muskelgewebe erhöht. Gerlowski und Jain konnten im Modell der Hasen-Ohr-Kammer sogar für Fluoreszenz markiertes Dextran mit einem noch größeren Molekulargewicht von ca. 150 000 D eine 8-fach erhöhte Permeabilität im Tumorgewebe, hier dem VX2-Karzinom, gegenüber ausgereiftem Granulationsgewebe feststellen.

Vor dem Hintergrund, dass bereits heute in mehreren klinischen Studien makromolekulare Chemotherapeutika (Greenwald *et al.* 2003; Schoemaker *et al.* 2002; Meerum Terwogt *et al.* 2001; Seymour *et al.* 2002) zum Einsatz kommen, sowie der Möglichkeit, in Zukunft Vaskular Targeting Therapie mit dieser Chemotherapie zu verbinden, wurde in Studie II der experimentellen Arbeit die Veränderung der Permeabilität für eine makromolekulare Substanz unter Vaskular Targeting Therapie mit MBT0206 untersucht. Als Kontrastmittel wurde hierzu in Studie II Gadolinium-Albumin mit einem Molekulargewicht > 66000 D verwendet. Eine therapiebedingt erhöhte Permeabilität der Tumorgefäße auch für Makromoleküle würde den Transport vieler Chemotherapeutika direkt an die Tumorzelle wesentlich verbessern. Eine endotheliale Barriere wäre dann auch für diese Therapeutika nicht mehr zu überwinden. Dass die dMRT auch in Verbindung mit makromolekularen Kontrastmitteln in der Lage ist, Veränderungen am Tumorendothel zu detektieren, konnte in mehreren Studien gezeigt werden. Pham *et al.* konnte in einer präklinischen Studie mit VEGF-Antikörpern an Ratten mit humanem MB-MDA-435 Karzinom, einem Brust-Adenokarzinom, einen deutlichen Effekt zeigen. Unter Therapie kam es binnen 24 h zu einer massiven Reduktion der endothelialen Permeabilität (Pham *et al.* 1998). Auch neuere Untersuchungen konnten ähnliche Effekte beim Einsatz makromolekularer Albumin basierter Kontrastmittel in Verbindung mit der dMRT nachweisen. Unter Therapie mit SU11248, einer wiederum antiangiogenetischen Substanz, kam es zum Rückgang der Gefäßpermeabilität vor allem im Bereich des proliferierenden Tumorrandes (Marzola *et al.* 2005). Die verringerte Permeabilität ist in beiden Fällen auf die zunehmende Reifung der Gefäße, die unter antiangiogenetischer Therapie beobachtet werden kann, zurückzuführen.

Neben den bereits erwähnten möglichen Bindungspartnern für paramagnetische Tracer, dem Albumin, bieten sich für den experimentellen Einsatz z. B. auch Polylysin oder Dextran an. Für den Einsatz am Menschen werfen diese Kontrastmittel allerdings verschiedenste Probleme sowohl in immunologischer Hinsicht als auch beim Abbau und der Elimination aus dem Körper auf (Schmiedl *et al.* 1987). Auch ultrakleine super-paramagnetische Eisenoxid Partikel mit 20-30 nm Durchmesser werden bereits als makromolekulare Kontrastmittel eingesetzt (Turetschek *et al.* 2001b; Turetschek *et al.* 2001a). Trotz der Vielzahl unterschiedlichster Ansätze konnte bisher keine der Substanzen die klinische Zulassung als Kontrastmittel erlangen.

1.1.4 Histologie

Aussagen über die morphologischen Veränderungen innerhalb des neoplastischen Gewebes wurden über die histologische Aufbereitung der entnommenen Tumore möglich. Hierzu kamen zwei verschiedene Färbemethoden zum Einsatz. Zur morphologischen Beurteilung des Gewebes sowie zur Quantifizierung der Thrombosenzahl wurde die Hematoxylin-Eosin-Färbung (HE) verwendet. Um die Gefäßdichte mittels digitaler Bildverarbeitung bestimmen zu können, wurde dagegen immunhistochemisch mit CD31-Antikörpern gefärbt. Die immunhistochemische Färbung ist hervorragend geeignet, Blutgefäße in formalinfixierten und in Paraffin gebetteten Präparaten sichtbar zu machen. CD31-Antikörper binden sehr gut an die Endotheloberfläche von Tumorgefäßen, auch wenn diese noch sehr unreif sind, und reagieren darüber hinaus nicht mit lymphatischem Gewebe. Sie können aber in sehr geringem Umfang durchaus mit Fibroblasten und im Plasma vorkommenden Zellen reagieren. Antikörper gegen Faktor VIII (von Willebrand Faktor) und CD34 binden in ähnlichem Umfang an Endothelzellen des Tumors, gehen aber im Falle von Faktor VIII darüber hinaus Bindung mit lymphatischem Gewebe ein. Es kann also zu einer Überschätzung der tatsächlichen Gefäßdichte kommen. Uzzan et al. zeigten in einer Metaanalyse von 87 Studien über die Gefäßdichte als prognostischem Faktor bei Frauen mit Brustkrebs, dass ein idealer Marker zur Bestimmung der Gefäßdichte bisher nicht gefunden ist. In fast allen Studien wurde aber mit den drei bereits genannten Gefäßmarkern gearbeitet (Uzzan *et al.* 2004). Weitere Antikörper gegen Vimentin, Lectin, alkalische Phosphatase sowie Typ IV Kollagen zeigen dagegen nur eine sehr geringe Spezifität und Sensibilität und spielen daher zum Nachweis der Tumorangiogenese nur eine untergeordnete Rolle. Um eine möglichst hohe Standardisierung bei der Auswertung zu erreichen, wurden die einzelnen Schnitte im Rahmen der vorliegenden Arbeit mittels digitaler Bildbearbeitung mit einem 20 x Objektiv erfasst und mit einer RGB Threshold Technik in ein binäres Bild umgerechnet. Daran schloss sich die Berechnung der CD31 positiven Pixel im Verhältnis zur Gesamtbildfläche an. In Vorversuchen wurden dabei hervorragende Werte im Vergleich zur manuellen Auswertung durch eine unabhängige Person erzielt. Unterschiede bei der wiederholten Bearbeitung desselben Präparatausschnittes treten im automatisierten Untersuchungsverfahren im Gegensatz zur teils subjektiven Auswertung durch einen Untersucher nicht auf. Um Bereiche mit sehr hoher bzw. sehr niedriger Gefäßdichte, die in Tumoren durchaus nebeneinander vorkommen, im Bezug auf den gesamten Tumor nicht zu über- bzw. unterschätzen, wurden aus jedem Tumor 4 Schnittpräparate und daraus jeweils 4

Gesichtsfelder untersucht. Es wurde darauf geachtet, die Präparate aus unterschiedlichen Tumorarealen auszuwählen, um nach Mittlung einen möglichst repräsentativen Wert für die Gefäßdichte des jeweiligen Tumors zu erreichen.

Auch die Untersuchung der in HE gefärbten Schnittpräparate im Hinblick auf die Zahl der Thrombosen wurde mit Hilfe der digitalen Bildverarbeitung durchgeführt, um durch den Untersucher bedingte Einflüsse zu minimieren. Studien in unterschiedlichsten Tumormodellen konnten zeigen, dass Thrombosen innerhalb des Tumors direkt durch Vascular Targeting Therapie hervorgerufen werden und so einen wichtigen Parameter für die Beurteilung der Wirksamkeit der jeweiligen Substanz darstellen (Blakey *et al.* 2002; Ohizumi *et al.* 1999). Um Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen bestimmen zu können, wurde daher die Anzahl der Thrombosen im Verhältnis zur gesamten Gefäßquerschnittsfläche im Gesichtsfeld bestimmt. Dies geschah durch zwei unabhängige verblindete Personen.

1.2 Ergebnisse

1.2.1 Studie I

Vor dem Hintergrund, eine wirkungsvolle Vascular Targeting Substanz für den klinischen Gebrauch zu entwickeln, konnten Kationische Liposomen als ein ideales Transportvehikel für cytotoxische Substanzen etabliert werden (Campbell *et al.* 2002; Dass 2003; Krasnici *et al.* 2003; Thurston *et al.* 1998). Die selektive Anreicherung am Endothel des Tumors kommt hierbei ladungsvermittelt zustande. Auch wenn der genaue Bindungsmechanismus bislang nicht im Detail geklärt werden konnte, ist davon auszugehen, dass negativ geladene Strukturen auf der Oberfläche der Tumorendothelzellen wie Phosphatidylserine (Ran *et al.* 2002) sowie hyperglycosilierte und hypersialierte Membranproteine eine Wechselwirkungen mit den positiv geladenen Liposomen eingehen. Neutrale oder anionische Liposomen konnten diesen Effekt nicht hervorrufen. Interaktionen der kationischen Liposomen mit negativ geladenen Strukturen finden aber nicht ausschließlich am Tumorendothel statt. Kurzzeitige Bindungen an zelluläre Blutbestandteile wie Granulozyten, Erythrozyten und Thrombozyten konnten ebenso nachgewiesen werden wie die Anheftung an normales Endothel, vor allem in der Lunge (Sakurai *et al.* 2001b; Sakurai *et al.* 2001a). Eichhorn *et al.* konnten am Hamstermodell zeigen, dass sich durch eine partielle Absättigung möglicher Bindungsstellen durch die Voraugabe von Protamin, einem mehrfach positiv geladenen Makromolekül, eine signifikant erhöhte Anreicherung der kationischen Liposomen am

Tumorendothel erzielen lässt (Eichhorn *et al.* 2004). Vor dem Hintergrund einer möglichst hohen Anreicherung von MBT0206 am Tumorendothel könnte die Gabe von Protamin in Zukunft durchaus in den Versuchsablauf integriert werden.

In den beiden vorliegenden experimentellen Studien wurde als zytotoxische Substanz Paclitaxel verwendet, welches in kationische Liposomen enkapsuliert wurde. Ausschlaggebend für die Enkapsulierung von Paclitaxel in eine liposomale Formulierung war zum einen die gute Wirksamkeit von Paclitaxel bei unterschiedlichen Tumorarten. In der Klinik unter dem Handelsnamen Taxol[®] bekannt, kommt Paclitaxel hier z. B. beim Ovarial-Karzinom (Abu-Rustum *et al.* 1997), beim kleinzelligen Bronchial-Karzinom (Ettinger 1996; Ettinger 1999) sowie bei Tumoren im Kopf-Hals-Bereich (Cordes, Plasswilm, and Sauer 1999; Smith, Thornton, and Allen 1995) zum Einsatz. Zum anderen besitzt Paclitaxel aber noch eine zweite Eigenschaft, die es für eine Enkapsulierung in Liposomen befähigt: seine Lipophilie. Sie ist Voraussetzung für einen stabilen Einbau in die Lipiddoppelmembran der Liposomen. Zwar können auch hydrophile Substanzen in Liposomen eingeschlossen werden, jedoch nur unter Einbußen im Bezug auf die Stabilität der Substanz bei gleichzeitig erhöhtem technischem Aufwand. Auf Grund der guten Verträglichkeit der Liposomen werden diese in der Zwischenzeit für den Transport unterschiedlichster Substanzklassen in der Klinik zum Einsatz gebracht (Goyal *et al.* 2005).

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Substanz MBT0206 wurde von der Firma Munich Biotech AG, Forstenriederstraße 10, 82061 Neuried, Deutschland synthetisiert und charakterisiert. Untersuchungen zum Wachstum sowie zur Mikrozirkulation wurden im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Priv. Doz. Dr. med. Marc Dellian am Institut für Chirurgische Forschung, Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilian-Universität München, Marchioninistraße 15, 81377 München, Deutschland durchgeführt. Die Wirksamkeit der entstandenen Substanz MBT0206 konnte an verschiedenen Tiermodellen mit unterschiedlichsten Untersuchungsmethoden, wie Intravitalmikroskopie (Strieth *et al.* 2004) oder Immunhistochemie (Kunstfeld *et al.* 2003), in der Vergangenheit gezeigt werden. Angesichts der weiterführenden klinischen Phase Ib/II Studie, die im Rahmen dieser Arbeit anhand zweier Case-Reports diskutiert werden wird, sollte in den experimentellen Studien die dynamische MRT als ein nicht-invasives Monitorverfahren, mit der Möglichkeit Veränderungen der Mikrozirkulation in einem frühen Stadium detektieren zu können, getestet werden. Voraussetzung für die Berechnung der rein deskriptiven Perfusion-like-Parameters sowie der quantitativen Parameter nach dem Tracerkinetischen Modell nach Brix *et al.* (Brix *et al.* 1999) waren die Messung der Konzentrations-Zeit-Kurven im arteriellen

Blut sowie im Tumorgewebe nach einer systemischen Applikation eines paramagnetischen Kontrastmittels. Die Konzentrationen von Gadolinium-DTPA zu den einzelnen Messzeitpunkten wurden auf der Basis der gemessenen T_1 -Relaxations-Zeiten berechnet. Zwischen der Gadolinium-DTPA Konzentration im untersuchten Gewebe und der mittels MRT gemessenen T_1 -Zeit am Modell des amelanotischen Hamstermelanoms A-MEL-3 besteht dabei eine hervorragende Korrelation (Pahernik *et al.* 2001).

Die rein deskriptiven Perfusion-like-Parameters Initialer Anstieg, Maximale Kontrastmittel-Anreicherung im Tumor sowie die Kontrastmittel-Clearance wurden berechnet, um Unterschiede im Kurvenverlauf der Konzentrations-Zeit-Kurven auch quantitativ beurteilen zu können. Der Initiale Anstieg zeigte dabei in allen drei Gruppen keine nennenswerten Unterschiede, wohingegen die Maximale Kontrastmittel-Anreicherung im Tumor der mit MBT0206 therapierten Gruppe signifikant gegenüber der Paclitaxel-Gruppe verringert war. Beim Abfluten des Kontrastmittels aus dem Tumor, der Kontrastmittel-Clearance, kam es in der MBT0206 Gruppe zu einer signifikanten Verlangsamung gegenüber den beiden anderen Gruppen. Bereits diese einfache Betrachtung der Konzentrations-Zeit-Kurven macht deutlich, dass es unter der Vascular Targeting Therapie zu Schädigungen am Gefäßsystem und damit zu Veränderungen in der Mikrozirkulation des Tumors gekommen sein muss. In einem zweiten Schritt wurden nun auch quantitative Parameter, die eine Charakterisierung der mikrozirkulatorischen Gegebenheiten innerhalb des Tumors zulassen, anhand des 2-Kompartiment-Modells nach Brix *et al.* berechnet (Brix *et al.* 2004; Brix *et al.* 1999). Dieses Modell berücksichtigt, wie bereits im Methodikteil diskutiert, sowohl die arterielle Blutversorgung des zu untersuchenden Gewebes als auch die Austauschvorgänge des Kontrastmittels zwischen dem intravasalen und dem interstitiellen Kompartiment. Es stellt damit eine Mischung aus dem Perfusions-Modell nach Miles (Miles 1991) und dem Permeabilitäts-Modell nach Tofts (Tofts *et al.* 1995) dar und ermöglicht die Quantifizierung von Intratumoralem Blutvolumen, Intratumoralem Blutfluss und Permeabilitäts-Oberflächen-Produkt sowie der Volumina des intravasalen und interstitiellen Kompartimentes.

Unter Therapie mit MBT0206 kam es zu einer Reduktion des Intratumoralen Blutvolumens um ca. 30% im Gegensatz zu den untherapierten Kontrolltieren. Die mit Paclitaxel behandelten Tiere zeigten demgegenüber keine wesentliche Veränderung des Intratumoralen Blutvolumens gegenüber der Kontrollgruppe. Diese Verringerung, steht im Einklang mit den Veränderungen die mittels Histologie gezeigt werden konnten. Die Reduktion des Blutvolumens innerhalb des Tumors der mit enkapsuliertem Paclitaxel behandelten Tiere kann auf den signifikanten Rückgang der Gefäßdichte, die mittels CD-31-Färbung

quantifiziert wurde, zurückgeführt werden und steht darüber hinaus mit Ergebnissen aus einer Intravitalmikroskopischen Studie im Einklang, die eine Reduktion der funktionellen Gefäßdichte unter Therapie mit MBT0206 feststellen konnte (Strieth *et al.* 2004). Auch die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen mit Hilfe der HE-Färbung untermauern die Aussagen der dMRT-Daten. Die massive signifikante Zunahme der Thrombosenzahl innerhalb der MBT0206-Gruppe führt dazu, dass zusätzlich zur verringerten Gefäßdichte auch bestehende Gefäßabschnitte nicht mehr perfundiert werden und so dem Antransport nutritiver Substanzen nicht mehr zur Verfügung stehen. Ein möglicher Mechanismus, der der Thrombenbildung zugrunde liegen könnte, ist die Zerstörung proliferierender Endothelzellen durch die ladungsvermittelte Anheftung der Liposomen und der cytotoxischen Wirkung des in die Endothelzellen aufgenommenen Paclitaxels. Die durch die Zerstörung der Endothelzellen an die Oberfläche tretende prokoagulatorische subzelluläre Matrix könnte dabei den entscheidenden Stimulus darstellen. Darüber hinaus scheinen auch die kationischen Liposomen an sich in der Lage zu sein, Thrombozyten zu aktivieren und so als zusätzlicher prokoagulatorischer Faktor zu wirken.

Im Gegensatz zum Intratumoralen Blutvolumen, welches durch die hier vorgestellte Vascular Targeting Therapie signifikant reduziert werden konnte, zeigte sich bei der Berechnung des Intratumoralen Blutflusses keine Veränderung in der MBT0206-Gruppe im Vergleich mit den Kontrolltieren. Demgegenüber konnte eine tendenzielle Zunahme des Blutflusses innerhalb der Tumore der mit Paclitaxel behandelten Gruppe beobachtet werden. Grundsätzlich müssen Intratumorales Blutvolumen und Intratumoraler Blutfluss aber nicht zwangsläufig gleichläufige Veränderungen zeigen. Während das Intratumorale Blutvolumen einen statischen Parameter der Mikrozirkulation bezeichnet, welcher letztendlich die Größe des vorhandenen Blutgefäßsystems bzw. dessen kontrastgebendes Volumen darstellt, beschreibt der Intratumorale Blutfluss einen dynamischen Parameter, der sich unabhängig davon, durch verschiedenste Faktoren ändern kann. Wichtige Einflussgrößen sind dabei die Morphologie der Gefäße, deren Durchmesser sowie die dreidimensionale Architektur des gesamten Gefäßnetzwerkes. Darüber hinaus besteht eine maßgeblich Abhängigkeit des Intratumoralen Blutflusses von der Funktionalität der untersuchten Tumorgefäße, der Permeabilität des Endothels sowie dem Entwicklungsgrad. Besonders der Verlust an unreifen Gefäßen sowie die Thrombenbildung innerhalb größerer Gefäßabschnitte mit der Entstehung von Pendelflussverhältnissen auf der einen und hyperperfundierten Gefäßabschnitten bis hin zur Shunt-Perfusion auf der anderen Seite könnten die auf den ersten Blick konträr zueinander stehenden Ergebnisse von Intratumoralem Blutvolumen und Blutfluss erklären.

Neben cytotoxischen Effekten auf proliferierende Tumorzellen konnte auch für den herkömmlichen Wirkstoff Paclitaxel eine antiangiogenetische Aktivität nachgewiesen werden (Grant *et al.* 2003). Diese Wirksamkeit in Bezug auf die Hemmung der Ausbildung neuer den Tumor versorgender Blutgefäße kann die nicht unerhebliche Verringerung der Gefäßdichte in den mittels CD-31 gefärbten histologischen Schnitten erklären, die in der Paclitaxel-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe gefunden wurden. Allerdings scheinen diese antiangiogenetischen Effekte, die sich in der histologischen Auswertung zeigen, nicht ausreichend zu sein um zu einer Beeinträchtigung der Funktion des Tumorgefäßsystems, wie sie mit der dMRT gemessen wurde, zu führen. Der Intratumorale Blutfluss war in der mit Paclitaxel behandelten Gruppe sogar größer als in den beiden anderen Gruppen. Wie Padera *et al.* zeigen konnten, kann der mechanische Druck, den proliferierende Tumorzellen auf die versorgenden Blutgefäße ausüben, zu einer Reduktion des Blutflusses innerhalb dieser Gefäße führen (Padera *et al.* 2004). Die über die cytotoxischen Effekte von Paclitaxel vermittelte Dekompression der Tumorgefäße könnte die gegenüber Kontroll- und MBT0206-Gruppe erhöhte Perfusion erklären. Ein erhöhter Blutfluss ist dabei in Übereinstimmung mit Untersuchungen von Strieth *et al.* sowie Griffon-Etienne *et al.* zu sehen, die zeigen konnten, dass es unter Therapie mit Taxanen zu einer signifikanten Zunahme der Gefäßdurchmesser sowie einer erhöhten Erythrozytenfließgeschwindigkeit innerhalb des Tumors kam (Griffon-Etienne *et al.* 1999; Strieth *et al.* 2004).

Als weiterer sehr wichtiger die Mikrozirkulation charakterisierender Parameter wurde im Rahmen der Studie I das Permeabilitäts-Oberflächen-Produkt berechnet, welches Aussagen über die Gefäßpermeabilität im untersuchten Gewebe zulässt. Nur unter Therapie mit MBT0206 kam es dabei zu einem tendenziellen, allerdings nicht signifikanten Anstieg im Vergleich zur Kontrollgruppe. Darüber hinaus war auch die Clearance von Gadolinium-DTPA in der späten Phase um den Faktor 2,3 gegenüber der Paclitaxel- sowie der Kontrollgruppe verzögert. Die Beobachtungen könnten dabei auf eine effiziente Zerstörung der Tumorendothelzellen durch die mit Paclitaxel beladenen kationischen Liposomen zurückgeführt werden. Die so aus dem Endothelverband herausfallenden zerstörten Zellen führen zu einer erhöhten Permeabilität der Tumorgefäße und lassen eine Extravasation von Kontrastmittel in größerem Umfang zu. Zur Reduktion der Kontrastmittel-Clearance können zusätzlich zur erhöhten Permeabilität der Gefäße auch Veränderungen des interstitiellen Gewebedruckes sowie die Beeinträchtigung des lymphatischen Abflusses unter Therapie mit MBT0206 beigetragen haben.

1.2.2 Studie II

Nachdem in Studie I nach Therapie mit MBT0206 deutliche Effekte mit Hilfe des *niedermolekularen* Kontrastmittels im MRT gemessen werden konnten, sollte in Studie II die Änderung der Gefäßpermeabilität auch für ein *makromolekulares* Kontrastmittel untersucht werden. Unterschiedlich waren in den beiden Studien lediglich die Art des Kontrastmittels sowie dessen Applikationsform. In Studie I wurde das niedermolekulare Gadolinium-DTPA mit einem Molekulargewicht von 548 D in Form eines 4minütigen prolongierten Bolus appliziert. In Studie II kam dagegen das makromolekulare Gadolinium-Albumin mit einem Molekulargewicht von ca. 66 000 D, also dem mehr als hundertfachen des niedermolekularen Kontrastmittels, zur Anwendung. Gadolinium-Albumin wurde zu Beginn der Messung in Form eines Bolus verabreicht. Voraussetzung für die rein deskriptive Beurteilung der Permeabilität waren wiederum die im linken Ventrikel sowie die im Tumor gemessenen Konzentrations-Zeit-Kurven. Die Betrachtung der Steigungen der an die Kurven angelegten Regressionsgeraden in der späten Phase der Messung, als einem Parameter für die Permeabilität der Tumorgefäße für das makromolekulare Kontrastmittel, ergab keine nennenswerten Unterschiede zwischen der Kontrolle und der MBT0206 Gruppe. Tendenziell konnte zwar in der mit MBT0206 therapierten Gruppe eine erhöhte Permeabilität gemessen werden, aufgrund der breiten Streuung in der Kontrollgruppe konnte aber kein eindeutiges Ergebnis erzielt werden. Trotzdem stehen die Ergebnisse der beiden experimentellen Studien nicht unbedingt in einem Widerspruch zueinander. De Lussanet et al. konnten in einem subkutanen Tumormodell, mit LS 174T Kolon-Karzinom des Menschen, an der Maus zeigen, dass Austauschvorgänge über das Tumorendothel stark von der Grösse des verwendeten Kontrastmittels abhängen (de Lussanet *et al.* 2005). Verwendet wurden in der Studie Kontrastmittel mit einem Molekulargewicht von 0,7 kD, also annähernd der Größe des Gadolinium-DTPA, 3,0 kD, 12 kD sowie 51 kD. Letzteres wies einen Durchmesser von 5 – 6 nm auf, was ungefähr der Größe einiger Serumproteine entspricht. Die Arbeitsgruppe um de Lussanet konnte zeigen, dass zwischen Molekulargewicht und der Menge an Kontrastmittel, die aus dem Blut ins Interstitium übertritt, hier als K^{PS} bezeichnet, eine inverse Beziehung besteht. Eine Verdopplung des Molekulargewichtes führt dabei zu einer Verringerung des K^{PS} um ca. 25 %. (Padhani 2003). Bei der Verwendung von Kontrastmittel mit einem Molekulargewicht von mehr als 66 kD wie in Studie II wäre es also durchaus denkbar, dass Schäden am Endothel, die durch die Therapie mit MBT0206 entstanden sind, auf Grund der Größe des Kontrastmittels nicht ausreichend zu detektieren sind. Einzelne Zellen zwar durch

die cytotoxischen Eigenschaften von MBT0206 aus dem Endothelzellverband der Tumorgefäße eliminiert werden, die Gefäßstruktur, im Bezug auf makromolekulare Substanzen, aber noch soweit erhalten bleibt, dass diese nicht in höherem Maße als in der Kontrollgruppe extravasieren. Die durch die Applikation von MBT0206 hervorgerufenen Schäden an den Tumorgefäßen führen also zu einer Erhöhung der Permeabilität für das niedermolekulare Kontrastmittel Gadolinium-DTPA, sind aber wohl nicht ausreichend um auch eine deutliche Zunahme der Permeabilität für das makromolekulare Gadolinium-Albumin hervorzurufen.

2. Diskussion der klinischen Studie

Aufgrund der guten Ergebnisse aus mehreren präklinischen Studien sowie aus zwei klinischen Studien konnte MBT0206 bzw. LipoPac[®] auch bei Tumoren im Kopf-Hals-Bereich Eingang in eine klinische Ib/II Studie finden. Da die vorangegangenen klinischen Studien mit ähnlichen Dosierungen und vergleichbaren Therapieschemata durchgeführt wurden, wurde eine Patientenzahl von 6 als ausreichend erachtet um die Verträglichkeit und darüber hinaus evt. Therapieeffekte zu untersuchen. Neben der Überwachung der Blutparameter sowie der herkömmlichen CT-gestützten Größenmessung des Tumors wurde die dMRT als ein weiteres Monitorverfahren mit in die Studie aufgenommen. Ausschlaggebend war hierfür die Möglichkeit, Veränderungen wichtiger mikrozirkulatorischer Parameter unter Therapie nicht-invasiv darzustellen zu können, wie dies im experimentellen Teil der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte. Gegenstand der zwei Case-Reports aus der klinischen Studie, die hier diskutiert werden sollen, sind ausschließlich die Ergebnisse der dMRT sowie die Berechnung der Parameter der Mikrozirkulation. Methodik und Ergebnisse der laborchemischen Analyse sowie die Auswertung der CT-Bilder sind Gegenstand einer anderen Dissertation.

2.1 Methodik

Die Methodik des Vascular Targeting sowie der dMRT mit der anschließenden Berechnung des Tracerkinetischen Modells nach Brix wurden bereits im Rahmen der experimentellen Studien diskutiert.

2.1.1 Vergleichbarkeit der Patienten

In die vorliegende Phase Ib/II Studie wurden Patienten aufgenommen, die nach heutigem Stand des medizinischen Wissens bereits die maximale zur Verfügung stehende Therapie

erhalten hatten. Dies beinhaltete bei Patient I zunächst eine primäre Radiochemotherapie an die sich die radikale Resektion des Tumors sowie eine beidseitige Neck dissektion anschloss. Bei Patient II wurde primär eine Tumorsektion mit beidseitiger Neck dissektion durchgeführt. Postoperativ erhielt er eine Radiochemotherapie. Da sich sowohl die Lokalisation der Tumore als auch deren Therapie bis zum Eintritt in die LipoPac[®] Studie deutlich unterschieden, machte dies die Vergleichbarkeit der Patienten zueinander sehr schwierig. Gerade die mittels dMRT zu detektierenden Veränderungen in der Mikrozirkulation der Tumore sind stark von der vorangegangenen Therapie sowie von der histologischen Diagnose abhängig. Die Vernarbung des Gewebes nach Bestrahlung sowie die Ausbildung größerer Nekroseareale unter Chemotherapie machen die Beurteilung der im Tumor auftretenden mikrozirkulatorischen Veränderungen unter Therapie mit LipoPac[®] extrem schwierig. Darüber hinaus spielt der Grad der Vaskularisierung der Tumore eine entscheidende Rolle für den möglichen Erfolg einer gegen das Gefäßsystem eines Tumors gerichteten Therapie. Bei stark vaskularisierten Tumoren ist von einer höheren Effizienz der Vascular Targeting Therapie auszugehen als bei schlecht vaskularisierten Tumoren. Da die Patienten aber nicht anhand möglichst gut zu vergleichender Voraussetzungen für eine Messung im MRT, sondern nach den im Methodenteil beschriebenen Ein- bzw. Ausschlusskriterien in die Studie aufgenommen wurden, war ein systematischer Vergleich zwischen den einzelnen Patienten nicht möglich. Von einer Darstellung aller Patienten wurde deshalb abgesehen und nur jeweils ein Patient pro Versuchsgruppe exemplarisch vorgestellt. Für alle Patienten gleich war die gute Verträglichkeit von LipoPac[®] unabhängig davon welche Dosis des Wirkstoffes sie erhalten hatten. Zu starken Nebenwirkungen, wie sie bei der Gabe von Paclitaxel als Einzelsubstanz in Verbindung mit dem Lösungsmittel Cremophor[®] sehr häufig sind, kam es nicht.

2.1.2 Versuchsprotokoll und Durchführung der Messung

Die Patienten, wurden wie im Methodenteil beschrieben, nach einer Baseline Messung an Tag 0 wiederholt an Tag 7 und Tag 14 gemessen. Therapiert wurde an Tag 1, 3 und 5. Während der Messungen im MRT, die mit den entsprechenden Scout-Scans bis zu 25 min dauerten, wurden die Patienten dazu angehalten, sich möglichst nicht zu bewegen, um möglichst scharfe Bilder zu erzielen. Da der Tumorbereich sowie der Herzbereich nicht wie im Tiermodell in einer Schicht geschnitten werden konnte, wurden die Konzentrations-Zeit-Kurven im arteriellen Blut nicht im linken Ventrikel, sondern in der A. carotis interna bzw. externa gemessen. Daraus ergaben sich aber Schwierigkeiten bei der späteren Auswertung,

denn bereits minimale Bewegungen des Patienten führten dazu, dass das Messareal in späteren Bildern außerhalb der Arterie zu liegen kam. Da das Siemens System nicht wie das Bruker System der Tierstudien in der Lage war, einzelne Pixel über die Zeit auszuwerten, sondern nur ein relativ großes Messfenster zur Verfügung stellt, welche die Größe der Arterie zum Teil leicht überschritt, wurden alle Bilder in das Windows kompatible Format jpeg konvertiert und dann an einem externen Windows[®]-PC mit Hilfe des Programms KS400 (Zeiss, Jena, Germany) bearbeitet. Hier war es wiederum möglich, einzelne Pixel, die im Zentrum der Arterie lagen und so gegen leichte Bewegungen des Patienten stabil waren, über die Zeit auszuwerten und im Anschluss als Konzentrations-Zeit-Kurve darzustellen. Trotz der Konversion auf ein anderes System konnten aber kleinere Fehler nicht vermieden werden.

Als weiteres Problem der weiterführenden Berechnung nach dem 2-Kompartiment-Modell nach Brix et al. stellte sich die sehr schnelle Kontrastmittel-Applikation heraus. Bei einem durchschnittlichen Gewicht der Patienten von ca. 70 kg wurde die gesamte Menge in einem Zeitraum von ca. 5 – 6 s appliziert. Es konnte also maximal 3 – 4 Mal während des initialen Anstiegs gemessen werden. Für eine möglichst genaue Beschreibung der Kontrastmittel-Konzentrationen im mathematischen Modell sollte das initiale Anfluten des Kontrastmittels aber langsamer geschehen, um die Verteilung auf die beiden Kompartimente besser beschreiben zu können. Dies war neben den technischen Voraussetzungen der Hauptgrund, weshalb in der tierexperimentellen Studie I die Kontrastmittel-Applikation in Form eines prolongierten Bolus von 4 min stattfand.

2.2 Ergebnisse

Nach Therapie mit MBT0206 kam es in der präklinischen Studie zu einer signifikanten Reduktion des intratumoralen Blutvolumens bei annähernd gleichem intratumoralem Blutfluss. Das Permeabilitäts-Oberflächen-Produkt nahm tendenziell zu.

Bei beiden Patienten konnten nach Therapie mit LipoPac[®] Veränderungen in der Mikrozirkulation der Tumore festgestellt werden. Deutlich unterschieden werden müssen die Veränderungen, die nach Ende des Zyklus an Tag 7 gemessen werden konnten, von den Ergebnissen, die an Tag 14 im Rahmen der Folgeuntersuchung erhoben wurden.

Patient I zeigte am Ende der Studie eine deutliche Verringerung des intratumoralen Blutvolumens und darüber hinaus eine massive Reduktion des intratumoralen Blutflusses, auch wenn beide Parameter initial einen leichten Anstieg zeigten. Dies deckt sich grob mit den Erwartungen, die aus der präklinischen Studie entstanden. Konträr zur Tierstudie zeigt

das Permeabilitäts-Oberflächen-Produkt bei Patient I allerdings eine deutliche Abnahme nach Therapie. Die gleiche Tendenz im Bezug auf die Endpunkte an Tag 14 zeigen auch die Ergebnisse von Patient II.

Denkbar wäre es, dass es unter Therapie mit LipoPac[®] zu einer starken Zerstörung bzw. Thrombosierung vor allem der unreifen stark durchlässigen Gefäße gekommen ist. Das intratumorale Blutvolumen daher abnimmt und die verbleibenden vom Aufbau bereits gut strukturierten Gefäße insgesamt zu einer Abnahme des Permeabilitäts-Oberflächen-Produktes führen. Ähnliche Ergebnisse ergaben Untersuchungen die Galbraith et al. mit Hilfe der dMRT an Ratten und weiterführend an 16 Patienten durchführte. Unter Therapie mit einer der führenden Vascular Targeting Substanzen Combretastatin A4 Phosphat kam es zu einer Reduktion von k^{trans} um 67 % in den Tumoren am Kleintier und zu einer Verringerung von 29 % - 37 % in den humanen Tumoren (Galbraith *et al.* 2003). Die Konstante k^{trans} beschreibt in diesem Modell den anteiligen Übertritt von Gadolinium-DTPA vom Plasma in den extravasalen extrazellulären Raum und ist sowohl durch die Veränderungen der endothelialen Permeabilität als auch der Perfusionsverhältnisse abhängig.

Mit der Zerstörung größerer wenn auch unreifer Gefäßabschnitte wäre darüber hinaus auch die deutliche Reduktion des intratumoralen Blutflusses die sich bei beiden Patienten zeigte erklärbar.

V. Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Vascular Targeting, die selektive Schädigung bereits bestehender Tumorgefäße, könnte in Zukunft zu einer weiteren Therapieoption im Kampf gegen solide Tumore werden. An der Schwelle zur klinischen Anwendung stellt sich hier die Frage nach geeigneten, den Patienten möglichst nicht belastenden Monitorverfahren. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die in vivo gezeigten guten Vascular Targeting Eigenschaften von Paclitaxel in kationischen Liposomen (MBT0206) nicht invasiv mittels dynamischer Magnet-Resonanz-Tomographie nachzuweisen. Untersucht wurden mikrozirkulatorische Veränderungen unter Therapie am subcutan implantierten Hamstermelanom A-Mel-3. Hierzu wurde ein experimenteller Magnet-Resonanz-Tomograph mit einer Feldstärke von 9,4 Tesla verwendet, der eine hohe räumliche und zeitliche Auflösung der Bilder ermöglichte. Unter Verwendung eines nieder- und eines makromolekularen Kontrastmittels konnten die Konzentrations-Zeit-Kurven im arteriellen Blut sowie im Tumor über einen Zeitraum von 60 min gemessen werden. Sie waren die Grundlage der weiterführenden Berechnung verschiedener tracerkinetischer Modelle. Nach Ende der Messungen wurden die Tumore zur histologischen Aufarbeitung entnommen. Zur Beurteilung der Gefäßdichte wurde eine CD31-Färbung, zur Beurteilung der Thrombosenzahl eine HE-Färbung verwendet.

Die Evaluation der Konzentrations-Zeit-Kurven mit Hilfe von Perfusion-like-Parameters ergab folgende Ergebnisse:

- Signifikante Verringerung des Kurvenmaximums in den Tumoren der mit MBT0206 therapierten Gruppe gegenüber der Kontrolle.
- Signifikante Verlangsamung der Kontrastmittel-Clearance aus dem Tumor um den Faktor 2,3 in der MBT0206-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die wesentlichen Ergebnisse der Berechnung nach dem 2-Kompartiment-Model nach Brix und Mitarbeitern waren:

- Signifikante Reduktion des intratumoralen Blutvolumens (rBV) unter Therapie mit MBT0206 im Vergleich zur Paclitaxel und Kontrollgruppe.
- Geringe Zunahme des Permeabilitäts-Oberflächen-Produktes und damit der endothelialen Durchlässigkeit unter Therapie mit MBT0206.

Um die Ergebnisse, die mittels dMRT erhoben wurden, richtig einordnen zu können, wurden histologische Untersuchungen angeschlossen. Diese erbrachten folgende Ergebnisse:

- Signifikante Reduktion der Gefäßdichte in den CD31 gefärbten Schnitten in der MBT0206-Gruppe gegenüber der Kontroll- und Paclitaxel-Gruppe.
- Signifikanter Anstieg der Thrombosenzahl in den HE gefärbten Tumorschnittpräparaten unter Vascular Targeting Therapie mit MBT0206 gegenüber beiden anderen Gruppen.

Die durch die Enkapsulierung von Paclitaxel in kationische Liposomen entstandene Vascular Targeting Substanz ist also in der Lage das Blutgefäßsystem am subkutan implantierten Tumor selektiv zu schädigen. Neben der Reduktion der Gefäßdichte und des intratumoralen Blutvolumens kam es zu einem leichten Anstieg der mikrovaskulären Permeabilität sowie zu einer Zunahme der intratumoralen Thrombosen. Paclitaxel in kationischen Liposomen stellt somit eine neue vielversprechende Substanz für das Vascular Targeting dar.

Die dynamische Magnet-Resonance-Tomographie in Verbindung mit dem niedermolekularen Kontrastmittel Gadolinium-DTPA war in der Lage die mikrozirkulatorischen Veränderungen nicht-invasiv in ausreichendem Maße zu detektieren und ist somit als Monitorverfahren für klinische Studien geeignet.

In einer weiterführenden klinischen Studie (Phase Ib/II) an Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren zeigte Paclitaxel in kationischen Liposomen neben einer guten Verträglichkeit auch eine Beeinflussung der Tumormikrozirkulation. Diese Veränderungen konnten mittels der am Tiermodell etablierten dMRT-Technik nicht-invasiv registriert werden. Die Methodik aus dem Tiermodell konnte somit gut in die klinische Studie übertragen werden. Ein direkter Vergleich mit der präklinischen Studie war aber auf Grund der geringen Patientenzahl und der starken Heterogenität der Tumore nur sehr bedingt möglich.

In der vorliegenden Arbeit wurde damit erstmals die Wirksamkeit von Vascular Targeting mit Paclitaxel in kationischen Liposomen mittels dynamischer Magnet-Resonance-Tomographie am subkutanen Tumormodell nachgewiesen. Die Ergebnisse bilden die Grundlage für weiterführende Untersuchungen zum Monitoring und Scheduling von Vascular Targeting Therapien. Um die Möglichkeiten der dynamischen Magnet-Resonance-Tomographie auch im klinischen Bereich ausschöpfen zu können, sind weitere Studien mit einer größeren Patientenzahl notwendig. Eine Standardisierung der tracerkinetischen Modelle und ihrer Parameter wäre vor dem Hintergrund einer besseren Vergleichbarkeit der Studien wünschenswert.

VI. Literaturverzeichnis

1. Abu-Rustum NR, Aghajanian C, Barakat RR, Fennelly D, Shapiro F, Spriggs D (1997) Salvage weekly paclitaxel in recurrent ovarian cancer. *Semin. Oncol.*, 24: S15.
2. Alessi P, Ebbinghaus C, Neri D (2004) Molecular targeting of angiogenesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 1654: 39-49.
3. Algire GH, Chalkley HW (1945) Vascular reactions of normal and malignant tissue in vivo. *J. Natl. Cancer Inst.*, 6: 73-85.
4. Augustin HG, Kozian DH, Johnson RC (1994) Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. *Bioessays*, 16: 901-906.
5. Baguley BC (2003) Antivascular therapy of cancer: DMXAA. *Lancet Oncol.*, 4: 141-148.
6. Balkwill F, Mantovani A (2001) Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*, 357: 539-545.
7. Beauregard DA, Pedley RB, Hill SA, Brindle KM (2002) Differential sensitivity of two adenocarcinoma xenografts to the anti-vascular drugs combretastatin A4 phosphate and 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid, assessed using MRI and MRS. *NMR Biomed.*, 15: 99-105.
8. Beerepoot LV, Radema SA, Witteveen EO, Thomas T, Wheeler C, Kempin S, Voest EE (2006) Phase I clinical evaluation of weekly administration of the novel vascular-targeting agent, ZD6126, in patients with solid tumors. *J. Clin. Oncol.*, 24: 1491-1498.
9. Bergers G, Benjamin LE (2003) Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer*, 3: 401-410.
10. Bergers G, Song S, Meyer-Morse N, Bergsland E, Hanahan D (2003) Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J. Clin. Invest*, 111: 1287-1295.
11. Bhujwala ZM, Artemov D, Natarajan K, Solaiyappan M, Kollars P, Kristjansen PE (2003) Reduction of vascular and permeable regions in solid tumors detected by macromolecular contrast magnetic resonance imaging after treatment with antiangiogenic agent TNP-470. *Clin. Cancer Res.*, 9: 355-362.
12. Bilenker JH, Flaherty KT, Rosen M, Davis L, Gallagher M, Stevenson JP, Sun W, Vaughn D, Giantonio B, Zimmer R, Schnall M, O'Dwyer PJ (2005) Phase I trial of combretastatin a-4 phosphate with carboplatin. *Clin. Cancer Res.*, 11: 1527-1533.
13. Blakey DC, Westwood FR, Walker M, Hughes GD, Davis PD, Ashton SE, Ryan AJ (2002) Antitumor activity of the novel vascular targeting agent ZD6126 in a panel of tumor models. *Clin. Cancer Res.*, 8: 1974-1983.

14. Bray F, Sankila R, Ferlay J, Parkin DM (2002) Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995. *Eur. J. Cancer*, 38: 99-166.
15. Brekken RA, Thorpe PE (2001) Vascular endothelial growth factor and vascular targeting of solid tumors. *Anticancer Res.*, 21: 4221-4229.
16. Brigham KL, Meyrick B, Christman B, Magnuson M, King G, Berry LC, Jr. (1989) In vivo transfection of murine lungs with a functioning prokaryotic gene using a liposome vehicle. *Am. J. Med. Sci.*, 298: 278-281.
17. Brix G, Bahner ML, Hoffmann U, Horvath A, Schreiber W (1999) Regional blood flow, capillary permeability, and compartmental volumes: measurement with dynamic CT--initial experience. *Radiology*, 210: 269-276.
18. Brix G, Kiessling F, Lucht R, Darai S, Wasser K, Delorme S, Griebel J (2004) Microcirculation and microvasculature in breast tumors: pharmacokinetic analysis of dynamic MR image series. *Magn Reson. Med.*, 52: 420-429.
19. Campbell RB, Fukumura D, Brown EB, Mazzola LM, Izumi Y, Jain RK, Torchilin VP, Munn LL (2002) Cationic charge determines the distribution of liposomes between the vascular and extravascular compartments of tumors. *Cancer Res.*, 62: 6831-6836.
20. Clark RA, DellaPelle P, Manseau E, Lanigan JM, Dvorak HF, Colvin RB (1982) Blood vessel fibronectin increases in conjunction with endothelial cell proliferation and capillary ingrowth during wound healing. *J. Invest Dermatol.*, 79: 269-276.
21. Cordes N, Plasswilm L, Sauer R (1999) Interaction of paclitaxel (Taxol) and irradiation. In-vitro differences between tumor and fibroblastic cells. *Strahlenther. Onkol.*, 175: 175-181.
22. D'Amore PA, Thompson RW (1987) Mechanisms of angiogenesis. *Annu. Rev. Physiol*, 49: 453-464.
23. Damadian R (1971) Tumor detection by nuclear magnetic resonance. *Science*, 171: 1151-1153.
24. Dass CR (2003) Improving anti-angiogenic therapy via selective delivery of cationic liposomes to tumour vasculature. *Int. J. Pharm.*, 267: 1-12.
25. de Lussanet QG, Langereis S, Beets-Tan RG, van Genderen MH, Griffioen AW, van Engelshoven JM, Backes WH (2005) Dynamic contrast-enhanced MR imaging kinetic parameters and molecular weight of dendritic contrast agents in tumor angiogenesis in mice. *Radiology*, 235: 65-72.
26. Degani H, Chetrit-Dadiani M, Bogin L, Furman-Haran E (2003) Magnetic resonance imaging of tumor vasculature. *Thromb. Haemost.*, 89: 25-33.
27. Denekamp J (1999) The tumour microcirculation as a target in cancer therapy: a clearer perspective. *Eur. J. Clin. Invest*, 29: 733-736.

28. Dinse GE, Umbach DM, Sasco AJ, Hoel DG, Davis DL (1999) Unexplained increases in cancer incidence in the United States from 1975 to 1994: possible sentinel health indicators? *Annu. Rev. Public Health*, 20: 173-209.
29. Dye RB, Fink SP, Williams RC, Jr. (1993) Taxol-induced flexibility of microtubules and its reversal by MAP-2 and Tau. *J. Biol. Chem.*, 268: 6847-6850.
30. Eichhorn ME, Strieth S, Krasnici S, Sauer B, Teifel M, Michaelis U, Naujoks K, Dellian M (2004) Protamine enhances uptake of cationic liposomes in angiogenic microvessels. *Angiogenesis.*, 7: 133-141.
31. El Diasty TA, El Ghar ME, Shokeir AA, Gad HM, Wafa EW, El Azab ME, El Din AB, Ghoneim MA (2005) Magnetic resonance imaging as a sole method for the morphological and functional evaluation of live kidney donors. *BJU. Int.*, 96: 111-116.
32. Ettinger DS (1996) Single-agent paclitaxel in the treatment of small cell lung cancer. *Semin. Oncol.*, 23: 16-17.
33. Ettinger DS (1999) Concurrent paclitaxel-containing regimens and thoracic radiation therapy for limited-disease small cell lung cancer. *Semin. Radiat. Oncol.*, 9: 148-150.
34. Folkman J (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.*, 285: 1182-1186.
35. Folkman J (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.*, 1: 27-31.
36. FORTNER JG, MAHY AG, SCHRODT GR (1961) Transplantable tumors of the Syrian (golden) hamster. I. Tumors of the alimentary tract, endocrine glands and melanomas. *Cancer Res.*, 21(6)Pt 2: 161-198.
37. Galbraith SM, Maxwell RJ, Lodge MA, Tozer GM, Wilson J, Taylor NJ, Stirling JJ, Sena L, Padhani AR, Rustin GJ (2003) Combretastatin A4 phosphate has tumor antivascular activity in rat and man as demonstrated by dynamic magnetic resonance imaging. *J. Clin. Oncol.*, 21: 2831-2842.
38. Gerlowski LE, Jain RK (1986) Microvascular permeability of normal and neoplastic tissues. *Microvasc. Res.*, 31: 288-305.
39. Gillies RJ, Raghunand N, Karczmar GS, Bhujwala ZM (2002) MRI of the tumor microenvironment. *J. Magn Reson. Imaging*, 16: 430-450.
40. Goetz A (1987) Quantitative Analyse der Tumormikrozirkulation im amelanotischen Hamstermelanom A-MEL-3. Medizinische Dissertation an der Universität München.
41. Goldman E (1907) The growth of malignant disease in man and the lower animals with special reference to the vascular system. *Lancet*, 2: 1236-1240.
42. Gordon MS, Margolin K, Talpaz M, Sledge GW, Jr., Holmgren E, Benjamin R, Stalter S, Shak S, Adelman D (2001) Phase I safety and pharmacokinetic study of

- recombinant human anti-vascular endothelial growth factor in patients with advanced cancer. *J. Clin. Oncol.*, 19: 843-850.
43. Goyal P, Goyal K, Kumar SG, Singh A, Katare OP, Mishra DN (2005) Liposomal drug delivery systems--clinical applications. *Acta Pharm.*, 55: 1-25.
 44. Grant DS, Williams TL, Zahaczewsky M, Dicker AP (2003) Comparison of antiangiogenic activities using paclitaxel (taxol) and docetaxel (taxotere). *Int. J. Cancer*, 104: 121-129.
 45. Greenwald RB, Choe YH, McGuire J, Conover CD (2003) Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 55: 217-250.
 46. Griffon-Etienne G, Boucher Y, Brekken C, Suit HD, Jain RK (1999) Taxane-induced apoptosis decompresses blood vessels and lowers interstitial fluid pressure in solid tumors: clinical implications. *Cancer Res.*, 59: 3776-3782.
 47. Hammersen F, Endrich B, Messmer K (1985) The fine structure of tumor blood vessels. I. Participation of non-endothelial cells in tumor angiogenesis. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.*, 4: 31-43.
 48. Hammes HP, Brownlee M, Jonczyk A, Sutter A, Preissner KT (1996) Subcutaneous injection of a cyclic peptide antagonist of vitronectin receptor-type integrins inhibits retinal neovascularization. *Nat. Med.*, 2: 529-533.
 49. Hawighorst H, Weikel W, Knapstein PG, Knopp MV, Zuna I, Schonberg SO, Vaupel P, van Kaick G (1998) Angiogenic activity of cervical carcinoma: assessment by functional magnetic resonance imaging-based parameters and a histomorphological approach in correlation with disease outcome. *Clin. Cancer Res.*, 4: 2305-2312.
 50. Hori K, Saito S (2003) Microvascular mechanisms by which the combretastatin A-4 derivative AC7700 (AVE8062) induces tumour blood flow stasis. *Br. J. Cancer*, 89: 1334-1344.
 51. Hori K, Saito S, Kubota K (2002) A novel combretastatin A-4 derivative, AC7700, strongly stanches tumour blood flow and inhibits growth of tumours developing in various tissues and organs. *Br. J. Cancer*, 86: 1604-1614.
 52. Hua J, Sheng Y, Pinney KG, Garner CM, Kane RR, Prezioso JA, Pettit GR, Chaplin DJ, Edvardsen K (2003) Oxi4503, a novel vascular targeting agent: effects on blood flow and antitumor activity in comparison to combretastatin A-4 phosphate. *Anticancer Res.*, 23: 1433-1440.
 53. Huang X, Molema G, King S, Watkins L, Edgington TS, Thorpe PE (1997) Tumor infarction in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature. *Science*, 275: 547-550.
 54. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F (2004) Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.*, 350: 2335-2342.

55. Jain RK (1994) Barriers to drug delivery in solid tumors. *Sci. Am.*, 271: 58-65.
56. Jain RK (1996) Delivery of molecular medicine to solid tumors. *Science*, 271: 1079-1080.
57. Jain RK (2001) Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 46: 149-168.
58. Kim SG, Rostrup E, Larsson HB, Ogawa S, Paulson OB (1999) Determination of relative CMRO₂ from CBF and BOLD changes: significant increase of oxygen consumption rate during visual stimulation. *Magn Reson. Med.*, 41: 1152-1161.
59. Krasnici S, Werner A, Eichhorn ME, Schmitt-Sody M, Pahernik SA, Sauer B, Schulze B, Teifel M, Michaelis U, Naujoks K, Dellian M (2003) Effect of the surface charge of liposomes on their uptake by angiogenic tumor vessels. *Int. J Cancer*, 105: 561-567.
60. Kunstfeld R, Wickenhauser G, Michaelis U, Teifel M, Umek W, Naujoks K, Wolff K, Petzelbauer P (2003) Paclitaxel encapsulated in cationic liposomes diminishes tumor angiogenesis and melanoma growth in a "humanized" SCID mouse model. *J Invest Dermatol.*, 120: 476-482.
61. Lauterbur PC (1989) Image formation by induced local interactions. Examples employing nuclear magnetic resonance. 1973. *Clin. Orthop. Relat Res.*, 3-6.
62. Llovet JM, Bruix J (2003) Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival. *Hepatology*, 37: 429-442.
63. Lyng H, Dahle GA, Kaalhus O, Skretting A, Rofstad EK (1998) Measurement of perfusion rate in human melanoma xenografts by contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Magn Reson. Med.*, 40: 89-98.
64. Mansfield P, Maudsley AA (1977) Medical imaging by NMR. *Br. J. Radiol.*, 50: 188-194.
65. Margolin K, Gordon MS, Holmgren E, Gaudreault J, Novotny W, Fyfe G, Adelman D, Stalter S, Breed J (2001) Phase Ib trial of intravenous recombinant humanized monoclonal antibody to vascular endothelial growth factor in combination with chemotherapy in patients with advanced cancer: pharmacologic and long-term safety data. *J. Clin. Oncol.*, 19: 851-856.
66. Marzola P, Degrassi A, Calderan L, Farace P, Nicolato E, Crescimanno C, Sandri M, Giusti A, Pesenti E, Terron A, Sbarbati A, Osculati F (2005) Early antiangiogenic activity of SU11248 evaluated in vivo by dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging in an experimental model of colon carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 11: 5827-5832.
67. Marzola P, Farace P, Calderan L, Crescimanno C, Lunati E, Nicolato E, Benati D, Degrassi A, Terron A, Klapwijk J, Pesenti E, Sbarbati A, Osculati F (2003) In vivo mapping of fractional plasma volume (fpv) and endothelial transfer coefficient (Kps)

in solid tumors using a macromolecular contrast agent: correlation with histology and ultrastructure. *Int. J. Cancer*, 104: 462-468.

68. Mayr NA, Yuh WT, Magnotta VA, Ehrhardt JC, Wheeler JA, Sorosky JI, Davis CS, Wen BC, Martin DD, Pelsang RE, Buller RE, Oberley LW, Mellenberg DE, Hussey DH (1996) Tumor perfusion studies using fast magnetic resonance imaging technique in advanced cervical cancer: a new noninvasive predictive assay. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 36: 623-633.
69. McDonald DM, Choyke PL (2003) Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic. *Nat. Med.*, 9: 713-725.
70. McLean JW, Fox EA, Baluk P, Bolton PB, Haskell A, Pearlman R, Thurston G, Umemoto EY, McDonald DM (1997) Organ-specific endothelial cell uptake of cationic liposome-DNA complexes in mice. *Am. J. Physiol*, 273: H387-H404.
71. Meerum Terwogt JM, Bokkel Huinink WW, Schellens JH, Schot M, Mandjes IA, Zurlo MG, Rocchetti M, Rosing H, Koopman FJ, Beijnen JH (2001) Phase I clinical and pharmacokinetic study of PNU166945, a novel water-soluble polymer-conjugated prodrug of paclitaxel. *Anticancer Drugs*, 12: 315-323.
72. Merrill RM, Weed DL (2001) Measuring the public health burden of cancer in the United States through lifetime and age-conditional risk estimates. *Ann. Epidemiol.*, 11: 547-553.
73. Miles KA (1991) Measurement of tissue perfusion by dynamic computed tomography. *Br. J. Radiol.*, 64: 409-412.
74. Modi S, Prakash JJ, Domb AJ, Kumar N (2006) Exploiting EPR in polymer drug conjugate delivery for tumor targeting. *Curr. Pharm. Des*, 12: 4785-4796.
75. Morgan B, Thomas AL, Dreves J, Hennig J, Buchert M, Jivan A, Horsfield MA, Mross K, Ball HA, Lee L, Mietlowski W, Fuxuis S, Unger C, O'Byrne K, Henry A, Cherryman GR, Laurent D, Dugan M, Marme D, Steward WP (2003) Dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging as a biomarker for the pharmacological response of PTK787/ZK 222584, an inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases, in patients with advanced colorectal cancer and liver metastases: results from two phase I studies. *J. Clin. Oncol.*, 21: 3955-3964.
76. Mross K, Dreves J, Muller M, Medinger M, Marme D, Hennig J, Morgan B, Lebwohl D, Masson E, Ho YY, Gunther C, Laurent D, Unger C (2005) Phase I clinical and pharmacokinetic study of PTK/ZK, a multiple VEGF receptor inhibitor, in patients with liver metastases from solid tumours. *Eur. J. Cancer*, 41: 1291-1299.
77. Nanda A, St Croix B (2004) Tumor endothelial markers: new targets for cancer therapy. *Curr. Opin. Oncol.*, 16: 44-49.
78. Naumov GN, Akslen LA, Folkman J (2006) Role of angiogenesis in human tumor dormancy: animal models of the angiogenic switch. *Cell Cycle*, 5: 1779-1787.

79. Naumov GN, Bender E, Zurakowski D, Kang SY, Sampson D, Flynn E, Watnick RS, Straume O, Akslen LA, Folkman J, Almog N (2006) A model of human tumor dormancy: an angiogenic switch from the nonangiogenic phenotype. *J. Natl. Cancer Inst.*, 98: 316-325.
80. Nilsson F, Kosmehl H, Zardi L, Neri D (2001) Targeted delivery of tissue factor to the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis, mediates the infarction of solid tumors in mice. *Cancer Res.*, 61: 711-716.
81. Ohizumi I, Taniguchi K, Saito H, Kawata H, Tsunoda S, Makimoto H, Wakai Y, Tsutsumi Y, Nakagawa S, Utoguchi N, Kaiho S, Ohsugi Y, Mayumi T (1999) Suppression of solid tumor growth by a monoclonal antibody against tumor vasculature in rats: involvement of intravascular thrombosis and fibrinogenesis. *Int. J. Cancer*, 82: 853-859.
82. Olson TA, Mohanraj D, Roy S, Ramakrishnan S (1997) Targeting the tumor vasculature: inhibition of tumor growth by a vascular endothelial growth factor-toxin conjugate. *Int. J. Cancer*, 73: 865-870.
83. Padera TP, Stoll BR, Tooredman JB, Capen D, di Tomaso E, Jain RK (2004) Pathology: cancer cells compress intratumour vessels. *Nature*, 427: 695.
84. Padhani AR (2002) Dynamic contrast-enhanced MRI in clinical oncology: current status and future directions. *J. Magn Reson. Imaging*, 16: 407-422.
85. Padhani AR (2003) MRI for assessing antivascular cancer treatments. *Br. J. Radiol.*, 76 Spec No 1: S60-S80.
86. Pahernik S, Griebel J, Botzlar A, Gneiting T, Brandl M, Dellian M, Goetz AE (2001) Quantitative imaging of tumour blood flow by contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Br. J. Cancer*, 85: 1655-1663.
87. Pham CD, Roberts TP, van Bruggen N, Melnyk O, Mann J, Ferrara N, Cohen RL, Brasch RC (1998) Magnetic resonance imaging detects suppression of tumor vascular permeability after administration of antibody to vascular endothelial growth factor. *Cancer Invest*, 16: 225-230.
88. Pickup S, Zhou R, Glickson J (2003) MRI estimation of the arterial input function in mice. *Acad. Radiol.*, 10: 963-968.
89. Posey JA, Ng TC, Yang B, Khazaeli MB, Carpenter MD, Fox F, Needle M, Waksal H, LoBuglio AF (2003) A phase I study of anti-kinase insert domain-containing receptor antibody, IMC-1C11, in patients with liver metastases from colorectal carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 9: 1323-1332.
90. Ran S, Downes A, Thorpe PE (2002) Increased exposure of anionic phospholipids on the surface of tumor blood vessels. *Cancer Res.*, 62: 6132-6140.
91. Ran S, Thorpe PE (2002) Phosphatidylserine is a marker of tumor vasculature and a potential target for cancer imaging and therapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 54: 1479-1484.

92. Risau W (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 386: 671-674.
93. Ruotsalainen U, Raitakari M, Nuutila P, Oikonen V, Sipila H, Teras M, Knuuti MJ, Bloomfield PM, Iida H (1997) Quantitative blood flow measurement of skeletal muscle using oxygen-15-water and PET. *J. Nucl. Med.*, 38: 314-319.
94. Sakurai F, Nishioka T, Saito H, Baba T, Okuda A, Matsumoto O, Taga T, Yamashita F, Takakura Y, Hashida M (2001a) Interaction between DNA-cationic liposome complexes and erythrocytes is an important factor in systemic gene transfer via the intravenous route in mice: the role of the neutral helper lipid. *Gene Ther.*, 8: 677-686.
95. Sakurai F, Nishioka T, Yamashita F, Takakura Y, Hashida M (2001b) Effects of erythrocytes and serum proteins on lung accumulation of lipoplexes containing cholesterol or DOPE as a helper lipid in the single-pass rat lung perfusion system. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 52: 165-172.
96. Schiff PB, Horwitz SB (1981) Taxol assembles tubulin in the absence of exogenous guanosine 5'-triphosphate or microtubule-associated proteins. *Biochemistry*, 20: 3247-3252.
97. Schmiedl U, Ogan M, Paajanen H, Marotti M, Crooks LE, Brito AC, Brasch RC (1987) Albumin labeled with Gd-DTPA as an intravascular, blood pool-enhancing agent for MR imaging: biodistribution and imaging studies. *Radiology*, 162: 205-210.
98. Schmitt-Sody M, Krasnici S, Manegold PC, Sauer B, Schulze B, Teifel M, Michaelis U, Dellian M (2001) Paclitaxel encapsulated in cationic liposomes: Effect on growth and metastases of solid tumors in vivo. In: Schönleben K, ed. *Chirurgisches Forum 2001 für experimentelle und klinische Forschung*. Heidelberg: Springer, 61-63.
99. Schmitt-Sody M, Strieth S, Krasnici S, Sauer B, Schulze B, Teifel M, Michaelis U, Naujoks K, Dellian M (2003) Neovascular targeting therapy: paclitaxel encapsulated in cationic liposomes improves antitumoral efficacy. *Clin Cancer Res.*, 9: 2335-2341.
100. Schoemaker NE, van Kesteren C, Rosing H, Jansen S, Swart M, Lieverst J, Fraier D, Breda M, Pellizzoni C, Spinelli R, Grazia PM, Beijnen JH, Schellens JH, Bokkel Huinink WW (2002) A phase I and pharmacokinetic study of MAG-CPT, a water-soluble polymer conjugate of camptothecin. *Br. J. Cancer*, 87: 608-614.
101. Senda M, Fishman AJ, Weise S, Alpert NM, Correia JA, Rubin RH, Strauss HW (1992) Regional perfusion, oxygen metabolism, blood volume and immunoglobulin G accumulation at focal sites of infection in rabbits. *Eur. J. Nucl. Med.*, 19: 166-172.
102. Seymour LW, Ferry DR, Anderson D, Hesslewood S, Julyan PJ, Poyner R, Doran J, Young AM, Burtles S, Kerr DJ (2002) Hepatic drug targeting: phase I evaluation of polymer-bound doxorubicin. *J. Clin. Oncol.*, 20: 1668-1676.
103. Smith RE, Thornton DE, Allen J (1995) A phase II trial of paclitaxel in squamous cell carcinoma of the head and neck with correlative laboratory studies. *Semin. Oncol.*, 22: 41-46.

104. St Croix B, Rago C, Velculescu V, Traverso G, Romans KE, Montgomery E, Lal A, Riggins GJ, Lengauer C, Vogelstein B, Kinzler KW (2000) Genes expressed in human tumor endothelium. *Science*, 289: 1197-1202.
105. Stevenson JP, Rosen M, Sun W, Gallagher M, Haller DG, Vaughn D, Giantonio B, Zimmer R, Petros WP, Stratford M, Chaplin D, Young SL, Schnall M, O'Dwyer PJ (2003) Phase I trial of the antivascular agent combretastatin A4 phosphate on a 5-day schedule to patients with cancer: magnetic resonance imaging evidence for altered tumor blood flow. *J. Clin. Oncol.*, 21: 4428-4438.
106. Strieth S, Eichhorn ME, Sauer B, Schulze B, Teifel M, Michaelis U, Dellian M (2004) Neovascular targeting chemotherapy: encapsulation of paclitaxel in cationic liposomes impairs functional tumor microvasculature. *Int. J. Cancer*, 110: 117-124.
107. Sutherland RM (1988) Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science*, 240: 177-184.
108. Thorpe PE, Burrows FJ (1995) Antibody-directed targeting of the vasculature of solid tumors. *Breast Cancer Res. Treat.*, 36: 237-251.
109. Thurston G, McLean JW, Rizen M, Baluk P, Haskell A, Murphy TJ, Hanahan D, McDonald DM (1998) Cationic liposomes target angiogenic endothelial cells in tumors and chronic inflammation in mice. *J. Clin. Invest*, 101: 1401-1413.
110. Tofts PS, Berkowitz B, Schnall MD (1995) Quantitative analysis of dynamic Gd-DTPA enhancement in breast tumors using a permeability model. *Magn Reson. Med.*, 33: 564-568.
111. Tofts PS, Brix G, Buckley DL, Evelhoch JL, Henderson E, Knopp MV, Larsson HB, Lee TY, Mayr NA, Parker GJ, Port RE, Taylor J, Weisskoff RM (1999) Estimating kinetic parameters from dynamic contrast-enhanced T(1)-weighted MRI of a diffusible tracer: standardized quantities and symbols. *J. Magn Reson. Imaging*, 10: 223-232.
112. Tofts PS, Kermode AG (1991) Measurement of the blood-brain barrier permeability and leakage space using dynamic MR imaging. 1. Fundamental concepts. *Magn Reson. Med.*, 17: 357-367.
113. Tomayko MM, Reynolds CP (1989) Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 24: 148-154.
114. Tonnesen MG, Feng X, Clark RA (2000) Angiogenesis in wound healing. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, 5: 40-46.
115. Tozer GM, Prise VE, Wilson J, Cemazar M, Shan S, Dewhurst MW, Barber PR, Vojnovic B, Chaplin DJ (2001) Mechanisms associated with tumor vascular shut-down induced by combretastatin A-4 phosphate: intravital microscopy and measurement of vascular permeability. *Cancer Res.*, 61: 6413-6422.
116. Tozer GM, Prise VE, Wilson J, Locke RJ, Vojnovic B, Stratford MR, Dennis MF, Chaplin DJ (1999) Combretastatin A-4 phosphate as a tumor vascular-targeting agent: early effects in tumors and normal tissues. *Cancer Res.*, 59: 1626-1634.

117. Turetschek K, Huber S, Floyd E, Helbich T, Roberts TP, Shames DM, Tarlo KS, Wendland MF, Brasch RC (2001a) MR imaging characterization of microvessels in experimental breast tumors by using a particulate contrast agent with histopathologic correlation. *Radiology*, 218: 562-569.
118. Turetschek K, Roberts TP, Floyd E, Preda A, Novikov V, Shames DM, Carter WO, Brasch RC (2001b) Tumor microvascular characterization using ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles (USPIO) in an experimental breast cancer model. *J. Magn Reson. Imaging*, 13: 882-888.
119. Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M, Perret GY (2004) Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Cancer Res.*, 64: 2941-2955.
120. Weiss N, Delius M, Gambihler S, Dirschedl P, Goetz A, Brendel W (1990) Influence of the shock wave application mode on the growth of A-Mel 3 and SSK2 tumors in vivo. *Ultrasound Med. Biol.*, 16: 595-605.
121. Zhou R, Pickup S, Yankeelov TE, Springer CS, Jr., Glickson JD (2004) Simultaneous measurement of arterial input function and tumor pharmacokinetics in mice by dynamic contrast enhanced imaging: effects of transcytolemmal water exchange. *Magn Reson. Med.*, 52: 248-257.
122. Zhu N, Liggitt D, Liu Y, Debs R (1993) Systemic gene expression after intravenous DNA delivery into adult mice. *Science*, 261: 209-211.

Veröffentlichte Teilaspekte der Arbeit

Originalia:

M.E. Eichhorn, **S. Becker**, S. Strieth, A. Werner, H. Ruhstorfer, U. Michaelis, J. Griebel, G. Brix and M. Dellian (2005). Paclitaxel Encapsulated in Cationic Lipid Complexes (MBT-0206) Impairs Functional Tumor Vascular Properties as Detected by Dynamic Enhanced Magnetic Resonance Imaging. *Cancer Biol Ther.* 2006;5: 89-96.

Abstracts:

M.E. Eichhorn, **S. Becker**, S. Strieth, A. Werner, H. Ruhstorfer, U. Michaelis, J. Griebel, G. Brix, K.W. Jauch and M. Dellian (2004). Dynamic magnetic resonance tomography for monitoring the efficacy of an anti-vascular tumor therapy by paclitaxel encapsulating cationic lipid complexes. *Angiogenesis* 2004;7 Supp:18-19

M.E. Eichhorn, **S. Becker**, S. Strieth, A. Werner, B. Sauer, H. Ruhstorfer, M. Teifel, U. Michaelis, J. Griebel, G. Brix, K.W. Jauch and M. Dellian (2004). Dynamic magnetic resonance tomography for monitoring the efficacy of an anti-vascular tumor therapy by MBT-0206 (cationic lipid-complexed paclitaxel). *AACR Annual meeting 2004, Orlando, Florida.*

J. Griebel, M.E. Eichhorn, **S. Becker**, A. Werner, U. Michaelis, H. Ruhstorfer, M. Dellian, G. Brix, (2004). Dynamische Magnetresonanztomographie zum Monitoring der Effektivität einer antivaskulären Tumortherapie durch Paclitaxel enkapsuliert in kationische Lipidkomplexe. *Fortschr Röntgenstr* 2004; 176 DOI: 10.1055/s-2004-828157

M. Dellian, M.E. Eichhorn, S. Strieth, **S. Becker**, U. Michaelis, K. Naujoks, J. Griebel, G. Brix (2005). Dynamische Magnetresonanztomographie zum Monitoring der Effektivität einer antivaskulären Tumortherapie. *HNO-Informationen (Kongressabstracts)* 2005; 84 DOI: 10.1055/s-2005-869133

Buchbeiträge:

M.E. Eichhorn, **S. Becker**, S. Strieth, A. Werner, U. Michaelis, H. Ruhstorfer, J. Griebel, G. Brix, K.W. Jauch, M. Dellian (2004). Dynamische Magnetresonanztomographie zum

Monitoring der Effektivität einer antivaskulären Tumorthherapie durch Paclitaxel enkapsuliert in kationische Lipidkomplexe. *Langenbecks Arch Chir., Forumsband 2004;33:39-41*

Abschließende Bemerkung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München (Komm. Direktor: Prof. Dr. med. A. Baethmann) in der Arbeitsgruppe von Priv.-Doz. Dr. med. M. Dellian durchgeführt.

Nach Beendigung dieser experimentellen Arbeit gilt mein besonderer Dank:

Herrn **Prof. Dr. med. A. Baethmann** als kommissarischem Direktor für die freundliche Aufnahme am Institut für Chirurgische Forschung, für seine Anregungen und Ratschläge und die stets konstruktive Kritik während der Kolloquien und darüber hinaus.

Herrn **PD Dr. med. M. Dellian** für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Überlassung des Themas der vorliegenden Arbeit und für das in mich gesetzte Vertrauen. Sein wissenschaftlicher Anspruch und seine Fähigkeit Ergebnisse zu hinterfragen und so neue Gebiete zu erschließen werden mir in Zukunft Vorbild und Anreiz sein weiter experimentell zu arbeiten.

Herrn **Dr. med. M.E. Eichhorn**, meinem Betreuer, der mich mit außerordentlicher fachlicher und menschlicher Kompetenz durch alle Höhen und Tiefen des experimentellen Arbeitens begleitet hat und mir zu jeder Tages- und Nachtzeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Ihm verdanke ich nicht nur die wesentlichen Grundlagen wissenschaftlichen Denken und Handelns sondern auch die Faszination für neue Methoden und unkonventionelle Denkansätze. Sein schier unerschöpfliches Wissen nicht nur auf dem Gebiet der Angiogenese war mir Ansporn und Hilfe in ausweglos scheinenden Situationen. Für die sehr freundschaftliche Arbeitsatmosphäre sowie seine fortwährende Unterstützung die weit über die Belange dieser Arbeit hinausgehen danke ich ihm von Herzen.

Meiner Mitdotorandin **Claudia Nußbaum** sowie den wissenschaftlichen Assistenten in unserem Team Frau **Dipl. biol. Siiri Lüdemann** und Herrn **Dr. med. S. Strieth** für ihre kontinuierliche fachliche und freundschaftliche Unterstützung.

Herrn **Prof. Dr. Berg** für die Kooperation und die Möglichkeit das Kleintier-MRT im GSF Forschungszentrum Neuherberg benutzen zu können.

Herrn **Prof. Dr. G. Brix** und Herrn **Dr. Griebel** für die Berechnung des Tracerkinetischen Modells.

Herrn **H. Ruhstorfer** für Hilfestellungen und Betreuung während der Arbeiten mit dem MRT-Gerät. Neben der Hilfe bei der Durchführung der Messungen, sowie der Wartung des Gerätes, stand er mir auch in Fragen der Datenkonvertierung mit Rat und Tat zur Seite.

Herrn **PD Dr. med. Schönberg** und Herrn **Dr. med. L. Jäger**, Institut für klinische Radiologie der Universität München, für die Durchführung der Messungen der klinischen Studie. Darüber hinaus gaben Sie mir Hilfestellungen beim Umgang mit dem klinischen MRT-Gerät und in Fragen der Datenkonvertierung und Auswertung.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Sven Becker
Geburtsdatum: 18.08.1978
Geburtsort: Schramberg, Baden-Württemberg
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig, kinderlos

Anstellung:

seit 12/2006 Assistenzarzt an der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde
Klinikum Großhadern, LMU
(Direktor: Prof. Dr. Berghaus) München

seit 02/2007 Wissenschaftlicher Mitarbeiter: ICF Research Branch
der WHO am Institut für Gesundheits- und
Rehabilitationswissenschaften der LMU
(Direktor: Prof. Dr. Stucki) München

Bildungsweg:

05/2000 – 11/2006 Studium der Humanmedizin
Ludwig-Maximilians-Universität München

03/2003 **1. Staatsexamen (Note 2,0)**
03/2005 **2. Staatsexamen (Note 2,0)**
11/2006 **3. Staatsexamen (Note 2,0)**
Gesamtnote: 2,0

09/1998 – 04/2000 Franz-Anton-May-Schule des
Arbeiter-Samariter-Bundes Mannheim
Rettungsassistent (Note 2,3)

08/1990 – 06/1998 Gymnasium Schramberg
Abitur (Note 1,6) Schramberg

Praktisches Jahr

04/2006 – 06/2006 Chirurgische Klinik und Poliklinik
Klinikum Großhadern, LMU München
(Direktor: Prof. Dr. Jauch)

02/2006 – 03/2006 Department of Internal Medicine,
Royal North Shore Hospital, University of Sydney,
Australia (Direktor: Prof. Dr. Field) Sydney

12/2005 – 01/2006	Department of Medicine and Therapeutics, Prince of Wales Hospital, The Chinese University of Hong Kong, China (Direktor: Prof. Dr. Sung)	Hong Kong
08/2005 – 11/2005	Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde Klinikum Großhadern, LMU (Direktor: Prof. Dr. Berghaus)	München

Famulaturen

08/2004	Radiologische Klinik am Wellington Hospital, University of Otago, New Zealand (Direktion: Prof. Dr. Wignall)	Wellington
03/2004	Innere Medizin im Städtischen Klinikum Augustinum (Direktor: Prof. Dr. Block)	München
09/2003	Radiologische Gemeinschaftspraxis am Marienplatz/ Schnittbildzentrum im RK Krankenhaus (Direktion: Dr. Karl-Wilhelm Westenberg)	München
08/2003	Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde Klinikum Großhadern, LMU (Direktor: Prof. Dr. Berghaus)	München

Tätigkeiten neben dem Studium

seit 04/2003	Studentische Hilfskraft am Institut für Chirurgische Forschung (Direktor: Prof. Dr. Pohl), Arbeitsgruppe von PD Dr. Dellian	München
07/2000 – 11/2006	Teilzeitmitarbeiter der Firma MKT-Krankentransport OHG als Rettungsassistent auf Rettungswagen, Krankswagen sowie im Blut- und Organtransport.	München

Zivildienst

08/1998 – 09/2000	Rettungssanitäter DRK-Kreisverband-Rottweil	Rottweil
-------------------	--	----------

Kenntnisse

Englisch und Französisch (in Wort und Schrift)
Spanisch (Grundkenntnisse)

