Entwicklung modularer Trägersysteme zur selektiven Thermoablation und Immuntherapie von Tumoren und Metastasen

M Wöltje¹, N Wetterling^{2,3,4}, K-W Lin⁵, W Parak⁵, A Temme^{2,3,4}, Ch Cherif¹, D Aibibu¹

¹Institut für Textilmaschinen und Textile Hochleistungswerkstofftechnik (ITM), Technische Universität Dresden, Dresden

²Sektion Experimentelle Neurochirurgie/Tumorimmunologie Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie/Tumorimmunologie Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden, Dresden

Primärtumore werden nach ihrer Diagnose chirurgisch entfernt. Danach folgen Chemotherapie, Strahlentherapie oder kombinierte Radio-Chemotherapie, um eventuelle Metastasen zu beseitigen. Alle diese adjuvanten Therapien sind jedoch mit Nebenwirkungen verbunden, da sie gesunde Zellen schädigen. Außerdem sind nicht alle Tumorzellen für eine adjuvante Tumortherapie empfänglich. Daher kommt es in den meisten Fällen zu einem Wiederauftreten des Tumors. Für eine effektive gezielte Therapie von Tumoren und Metastasen wurde deshalb ein Trägersystem entwickelt, das eine selektive Lokalisierung von Metastasen und eine Zerstörung durch thermische Ablation ermöglicht.

Krebserkrankungen stellen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar, mit mehr als 220.000 Todesfällen im Jahr. Jeder zweite Einwohner Deutschlands muss damit rechnen, mindestens einmal in seinem Leben an einem bösartigen Tumor zu erkranken. 2018 wurden rund 260.000 Männer und 234.000 Frauen mit der Diagnose Krebs konfrontiert. Sie waren zum Zeitpunkt der Diagnose im Mittel 70 Jahre alt. Aufgrund der demographischen Entwicklung in Deutschland wird die Zahl der jährlich neu diagnostizierten Krebserkrankungen bis 2025 um 52.000 Fälle auf ca. 523.000 zunehmen. Die 10-Jahres-Prävalenz von Krebserkrankungen steigt bis 2025 rechnerisch um 243.000 Fälle auf knapp 2,9 Millionen Personen an [1]. Im Laufe einer Krebserkrankung können bereits 0,5 cm große primäre Tumoren Krebszellen freisetzen, die abhängig von der Tumorart über die Lymphgefäße oder das vaskuläre System

streuen und sekundäre Tumoren (Metastasen) in weit entfernten Organen bilden, wie Lunge, Leber oder Gehirn [2]. In den allermeisten Fällen werden primäre solide Tumoren erst spät diagnostiziert und können bei guter Zugänglichkeit operativ entfernt werden. Eine chirurgische Entfernung ist bei großen Metastasen möglich, falls sie gut lokalisierbar und zugänglich sind. Schwer lokalisierbare und unzugängliche Metastasen können dagegen weiter wachsen oder sich im Körper ausbreiten und so zu einem Rückfall der Krebserkrankung (Rezidiv) führen. Deshalb folgt nach chirurgischer Entfernung eine adjuvante Therapie, um im Körper verbliebene Zellen des Primärtumors, aber auch bereits vorhandene Metastasen zu eliminieren. In fast allen Fällen handelt sich hierbei um konventionelle Verfahren, wie Chemotherapie, Radiotherapie oder eine kombinierte Radio-Chemotherapie. Alle adjuvanten Therapieformen

³Nationales Centrum für Tumorerkrankungen Dresden (NCT/UCC), Dresden

⁴Deutsches Konsortium für Translationale Krebsforschung (DKTK), Dresden

⁵Institut für Nanostruktur- und Festkörperphysik (INF), Universität Hamburg, Hamburg

sind jedoch aufgrund der Schädigung gesunder Zellen mit Nebenwirkungen verbunden. Außerdem sind nicht alle Tumorzellen sensibel für die adjuvante Tumortherapie. Durch die Heterogenität des Tumors bzw. der Metastasen und durch die genotoxische Wirkung der Therapien können resistente Tumorzellen entstehen, die zu einem Rezidiv führen und letztendlich das Schicksal des Patienten bestimmen [3].

Einen weiteren Ansatz zur Tumorbekämpfung stellt die Hyperthermie-Therapie oder Thermoablation dar. Hyperthermie ist ein Verfahren, bei dem die starke Erhitzung des Körpergewebes Tumorzellen abtötet oder ihre Versorgung mit lebensnotwendigen Substanzen verhindern soll. Dabei wird der Tumor durch eine injizierte Sonde oder durch lokal in den Tumor injizierte Ferrofluide durch Anlegen eines alternierenden Magnetfelds erwärmt. Die Wirksamkeit der Hyperthermie wird zurzeit in Kombination mit der Strahlen- oder Chemotherapie in klinischen Studien untersucht [4-6].

Trotz vieler Fortschritte in der Krebsmedizin gibt es bisher keine kostengünstige und effektive adjuvante Therapie für Krebserkrankungen, die zu einer Heilung führt. Erste immuntherapeutische Ansätze beschränken sich lediglich auf einige wenige Tumorarten bzw. sind durch individuelle Herstellungsverfahren mit hohen Kosten belastet und somit nicht breit einsetzbar. Daraus leitet sich aus medizinischer und aus wirtschaftlicher Sicht die Notwendigkeit ab, eine neuartige, breit anwendbare kostengünstigere Therapie zur selektiven und wirksamen Zerstörung von Tumorzellen bzw. Metastasen zu entwickeln, die letztendlich zu einer langfristigen Heilung führt.

Im Rahmen der hier präsentierten Arbeiten wurde deshalb ein biokompatibles und modulares Trägersystem entwickelt, um selektiv eine kombinierte Thermoablation und Immuninduktion in Tumorzellen bzw. Metastasen zu erreichen. Konzeptionell sollte die Thermoablation zur Zerstörung der Tumorzelle mit

Freisetzung von Tumor-Antigenen führen, während die simultane Wirkung eines Gefahrsignals in einer Freisetzung von Entzündungsmediatoren und der Aktivierung des Immunsystems gegen Tumor-Antigene resultiert (Abb. 1). Damit unerwünschte Nebeneffekte auf gesunde Zellen und Organe des Patienten ausgeschlossen werden und zur gezielten Wirkstoffanreicherung in den Tumorzellen bzw. Metastasen, wurden molekulare Zielsuchköpfe integriert. Als Trägersystem zur selektiven Behandlung von Tumorzellen wurden nanoskalige Träger entwickelt, die aus einem Kern aus Eisenoxidpartikeln (superparamagentic iron oxide nanoparticles, SPION) und einem Mantel aus Seidenprotein bestanden. Die Proteinummantelung ermöglicht die chemische Ankopplung von Wirkstoffen bzw. den Zielsuchköpfen. Als exemplarische molekulare Zielstruktur für die Zielsuchköpfe wurden die Tumormarker "Prostata Stammzell-Antigen (PSCA) und "Prostataspezifische Membran-Antigen (PSMA) ausgewählt, da diese beiden Tumormarker Primärtumoren und Metastasen des Nierenzellkarzinoms, des Prostatakarzinoms, des Harnblasenkarzinoms und von Bauchspeicheldrüsenkrebs abdecken, an denen nach Angaben des Robert Koch-Institutes alleine in Deutschland ca. 87.000 Patienten pro Jahr erkranken. Weltweit erkrankten im Jahr 2017/18 etwa 2,5 Millionen Menschen neu an diesen Tumoren. Die Inzidenz an diesen Tumoren zu erkranken, ist in den Industrienationen signifikant höher. Dies kann u.a. an einer hohen Dunkelziffer in der Anzahl nicht-diagnostizierter Tumorpatienten in Drittweltstaaten liegen [7-10].

Derzeitige Therapiekonzepte für das metastasierte Nierenzellkarzinom konzentrieren sich auf die zielgerichtete Hemmung der Tumorangiogenese, der Gefäßneubildung zur Versorgung der Tumoren mit Sauerstoff und Nährstoffen. Da die meisten Patienten jedoch eine Resistenz entwickeln, bleibt die Prognose weiterhin ungünstig [11,12].

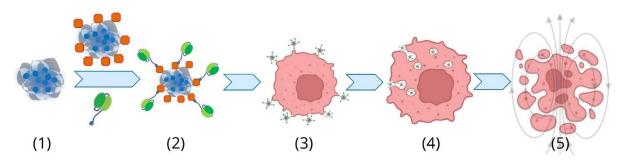


Abb. 1: Schematische Darstellung der Wirkungsweise der neuartigen modularen Trägersysteme. Zunächst werden die Nanopartikel aus Seide und einem Kern aus SPION (*superparamagentic iron oxide nanoparticles*) (1) mit den entsprechenden Suchköpfen funktionalisiert (2). Nach der Bindung der Suchköpfe an die entsprechenden Tumorantigene (3) werden die Trägersysteme in die Zelle transportiert (4). Anschließend erfolgt die Thermoablation bzw. die selektive Zerstörung der Tumorzellen im elektromagnetisches Wechselfeld (5).

Der modulare Aufbau des infusionsfähigen Trägersystems ermöglicht (i) eine gezielte Behandlung der Tumorzellen durch die Verwendung molekularer Tumor-selektiver Zielsuchköpfe (Einzelkettenantikörper, Peptid-Liganden), (ii) die Induktion einer Anti-Tumor-Immunantwort des Patienten durch Anlieferung von therapeutischen Mustererkennung-Rezeptor-Agonisten wie TLR 3-Agonisten und (iii) eine interstitielle Thermoablation der Krebszellen nach Anlegen eines Magnetwechselfeldes ermöglichen. Mit Hilfe der Elektrosprühtechnologie wurden Seidenprotein und Fe₃O₄-Nanopartikel in der benötigten Konzentration und Form zu Trägersystemen versprüht werden (Abb.2).

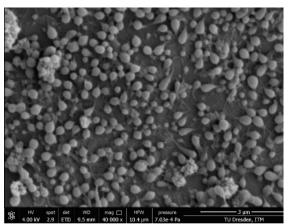


Abb. 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Trägersysteme aus Seide und SPION.

Hierbei war wichtig, dass der geforderte maximale Durchmesser von 400 nm nicht überschritten werden durfte, damit die Zellen die Trägersysteme noch aufnehmen können.

Dies wurde mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 272 \pm 50 nm bis 291 \pm 59 nm erfolgreich umgesetzt.

Gleichzeitig wurden molekulare Zielsuchköpfe (tumorspezifische Targeting-Sonden) gegen das PSCA- und das PSMA-Antigen entwickelt, die für die tumorspezifische Wirkung der Trägersysteme verantwortlich sein sollten. Die tumorspezifische Targeting-Sonden gegen das PSCA- und PSMA-Antigen detektieren spezifisch PSCA bzw. PSMA exprimierende Tumorzellen. Die durch die Targeting-Sonden kreuzvernetzen PSCA- bzw. PSMA-Rezeptoren konnten außerdem erfolgreich die Endozytose von Nanopartikeln induzieren. Darüber hinaus wurden für die Untersuchung der Wirkung der Trägersystem, deren spezifische Bindung an Tumorzellen, die Induktion einer Immunantwort und die Auswirkung der Behandlung mit elektromagnetischer Strahlung zur Thermoablation erfolgreich geeignete Zellkulturmodellen entwickelt. In diesen Zelllinien zeigte sich, dass die produzierten Zielsuchköpfe und der für die Induktion einer Immunantwort notwendige doppelsträngige TLR3-Agonist voll funktionsfähig waren. So konnte gezeigt werden, dass sich sowohl der Zielsuchkopf als Komponente des modularen Trägersystems zum "Targeting" von PSCA-positiven Tumorzellen eignet, als auch der TLR-Agonist die Freisetzung pro-inflammatorischer Moleküle induziert, was in einer Typ I-Interferon-Antwort resultierte.

Im nächsten Schritt erfolgte die Untersuchung der Wärmetransferkapazität der Fe₃O₄-funktionalisierten Trägersysteme mit drei unterschiedlichen Strahlungsintensitäten (191 Gauss, 307 Gauss und 450 Gaus, alle bei 303 kHz) (Abb. 3). Eine Fe₃O₄-Ausgangskonzentration von 30 mg/ml ergab eine Temperaturinduktion von maximal 29,8°C (Abb. 3). Dies entspricht einem Temperaturunterschied zur Ausgangstemperatur von 9,8°C und zeigt deutlich die Eignung der elektrogesprühten Trägersysteme aus Seide mit integrierten Fe₃O₄-Nanopartikeln eine Temperaturinduktion im elektromagnetischen Feld zu vermitteln.

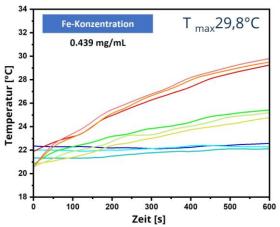


Abb. 3: Analyse des Einflusses der Wärmeinduktion in elektrogesprühten Trägersystemen in Abhängigkeit der Bestrahlungszeit und der Strahlungsenergie.

Was bedeutet dies für die Wirkung im Tumor? Die spezifische Absorptionsrate (SAR) ist ein Maß für die Leistung pro Masse einer Substanz, die Energie aufnimmt und wird in Watt pro Kilogramm Gewebe (W/kg) angegeben. Sie lässt sich zusammen mit den spezifischen Eigenschaften des Mediums und der Magnetitkonzentration (Fe₃O₄) berechnen, wenn die Temperaturerhöhung (ΔT) einer Lösung bekannt ist:

Gleichung (1)
$$SAR = C x \frac{mL\ddot{o}sung}{mMagnetit} x \frac{\Delta T}{\Delta t}$$

Hierbei ist C die spezifische Wärmekapazität der Lösung (für Wasser typischerweise C \approx 4,18 J/(gK), m_{Lösung} die Masse der Lösung (in g; 1 ml Wasser hat 1 g Masse), m_{Magnetit} die Masse des Magnetits in der Lösung (in g), hier

0,000439 g. ΔT beschreibt hier die Temperaturerhöhung (in K oder °C) hier 8,8 K und Δt die Zeit, über die die Temperaturerhöhung auftrat (in Sekunden), hier 600.

Für die in Abb. 2 gezeigten Trägersysteme ergibt sich nach Einsetzen der Werte in die Gleichung 1 eine SAR von 139,65 W/kg.

Für die Beurteilung der möglichen biologischen Auswirkung dieser Temperaturinduktion auf Tumorgewebe, muss der Zusammenhang zwischen Temperaturerhöhung, SAR und der Perfusion w (in ml/100 g/min) betrachtet werden. Unter Gleichgewichtsbedingungen in einem Gebiet mit geringen Temperaturgradienten steht die Temperaturerhöhung ΔT (in °C) im Gewebe mit einem Leistungseintrag SAR und der Perfusion in einem einfachen Zusammenhang:

Gleichung (2)
$$\Delta T = 1.5 x \frac{SAR}{W}$$
 [13]

Der Koeffizient 1,5 ergibt sich aus den physikalischen Konstanten (thermische Leitfähigkeit, Dichte, Wärmekapazität) in der sog. *Bioheat-Transfer-Gleichung*, die den Zusammenhang zwischen Temperatur, SAR und Perfusion in einem Organismus beschreibt [14].

Bei einer Temperaturinduktion im Gewebe wird über 40°C die Aufrechterhaltung der Zellhomöostase unterbrochen. Schon ein Anstieg der Temperatur im Gewebe auf 42°C bis 45°C (Hyperthermie) lässt die Zellen sensibler auf zerstörende Einwirkungen wie zum Beispiel Chemotherapeutika oder Bestrahlung reagieren, führt aber auch bei längerer Anwendung (< 60 Minuten) nicht zwangsläufig zur Zerstörung aller Zellen. Erst eine Temperatureinwirkung von 45°C über einen Zeitraum von 60 Minuten führt zu einem irreversiblen Zellschaden. Temperaturen zwischen 50°C und 60°C über einen kurzen Zeitraum appliziert (< 3 Minuten) führen zur Koagulation und somit zu vollständigem Zelltod. Zwischen 60°C und 100°C kommt es sofort zu einer irreversiblen Proteindenaturierung [15].

Für eine Abschätzung der möglichen Wirkung der entwickelten Trägersysteme wurde die

induzierte Wärmeentwicklung im Tumor anhand Gl.2 berechnet. Gemäß Gl. 2 kann bei einem SAR von 139,65 W/kg Gewebe, die mit der entwickelten Elektrosprühtechnologie erreicht wird, ein Tumor mit einer typischen Perfusion von 10 ml/100 g/min (unter Hyperthermie) um 20,95°C aufgeheizt werden. Nach Addition diese 20,95°C zur systemischen Temperatur von 37,5°C ergibt sich eine

Tumortemperatur von insgesamt 58,45°C. Überträgt man diese Berechnung auf unterschiedliche Tumorarten, so zeigt sich der Nutzen solcher Trägersysteme bei der Bekämpfung von Zellen dieser Tumoren (Tab. 1).

Tab.: 1. Berechnete, durch Trägersysteme im Tumorgewebe induzierte Temperaturerhöhung während der Behandlung mit elektromagnetischer Strahlung (450 Gauss, 303 KHz).

Tumorarten	Perfusionsrate	Errechnete Temperaturerhöhung
	(ml/100g/min)	ΔT (°C) im Tumorgewebe
Mamakarzinom	15 - 30 ^[16,17]	51,5 – 44,5
Prostatakarzinom	16 – 29 ^[18]	50,5 – 44,5
Adenokarzinom des Bauchspeicheldrüsenganges	20 - 32 ^[19]	48,0 - 44,0
Kolonkarzinom (Grad 4)	16 - 32 ^[20]	50,5 – 44,0

Danksagung

Das IGF-Vorhaben 01IF21905N der Forschungsvereinigung DE-CHEMA (Deutsche Gesellschaft für Chemische Technik und Biotechnologie e. V.) wurde über die

Bundesministerium für Wirtschaft und Klimaschutz

Gefördert durch:

die Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsunternehmen (AiF) und dem Deutschen Zentrum für Luft- und Raumfahrt (DLR) Projektträger im Rahmen des Programms zur Förderung der industriellen Gemeinschaftsforschung und -entwicklung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Klimaschutz aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

Das Institut für Textilmaschinen und Textile Hochleistungswerkstofftechnik (ITM) und die Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie/Sektion Experimentelle Neurochirurgie/Tumorimmunologie (NCH) dankt den genannten Institutionen für die Bereitstellung der finanziellen Mittel. Der Abschlussbericht und weiterführende Informationen sind am ITM

der TU Dresden und am NTC am Universitätsklinikum Dresden erhältlich.

Literatur

- [1] M. Schlander, K. Hernandez-Villafuerte, C. Thielscher, *Forum* **2018**, *33*, 330.
- [2] C. L. Chaffer, R. A. Weinberg, *Science* (*New York, N.Y.*) **2011**, *331*, 1559.
- [3] S. Gkountela, B. Szczerba, C. Donato, N. Aceto, *ESMO open* **2016**, *1*, e000078.
- [4] G. Bruggmoser, S. Bauchowitz, R. Canters, H. Crezee, M. Ehmann, J. Gellermann, U. Lamprecht, N. Lomax, M. B. Messmer, O. Ott, S. Abdel-Rahman, M. Schmidt, R. Sauer, A. Thomsen, R. Wessalowski, G. van Rhoon, *Strahlentherapie und Onkologie Organ der Deutschen Rontgengesellschaft ...* [et al] **2012**, 188 Suppl 2, 198.
- [5] M. K. Angele, M. Albertsmeier, N. J. Prix, P. Hohenberger, S. Abdel-Rahman, N. Dieterle, M. Schmidt, U. Mansmann, C. J. Bruns, R. D. Issels, K.-W. Jauch, L. H. Lindner, *Annals of surgery* **2014**, *260*, 749-54; discussion 754-6.

- [6] R. D. Issels, L. H. Lindner, J. Verweij, R. Wessalowski, P. Reichardt, P. Wust, P. Ghadjar, P. Hohenberger, M. Angele, C. Salat, Z. Vujaskovic, S. Daugaard, O. Mella, U. Mansmann, H. R. Dürr, T. Knösel, S. Abdel-Rahman, M. Schmidt, W. Hiddemann, K.-W. Jauch, C. Belka, A. Gronchi, JAMA oncology 2018, 4, 483.
- [7] P. Rawla, T. Sunkara, V. Gaduputi, World J Oncol 2019, 10, 10.
- [8] P. Rawla, World J Oncol 2019, 10, 63.
- [9] U. Capitanio, K. Bensalah, A. Bex, S. A. Boorjian, F. Bray, J. Coleman, J. L. Gore, M. Sun, C. Wood, P. Russo, *European Urology* 2019, 75, 74.
- [10] A. Richters, K. K. H. Aben, L. A. L. M. Kiemeney, World J Urol 2019, 68, 394.
- [11] Y. Allory, S. Culine, A. de La Taille, *Pathobiology* **2011**, *78*, 90.
- [12] B. I. Rini, M. B. Atkins, *The Lancet Oncology* **2009**, *10*, 992.
- [13] P. Ghadjar, S. Zschaeck, P. Wust, in Kompendium Internistische Onkologie (Ed.: H.-J. Schmoll), Springer Berlin Heidelberg.
 Berlin, Heidelberg 2020, p. 1.
- [14] P. Wust, *Thermotherapy in oncology*, UNI-MED Verlag, Bremen, London, New York **2016**.
- [15] K. F. Chu, D. E. Dupuy, *Nature reviews*. *Cancer* **2014**, *14*, 199.
- [16] D. A. Mankoff, L. K. Dunnwald, J. R. Gralow, G. K. Ellis, E. K. Schubert, J. Tseng, T. J. Lawton, H. M. Linden, R. B. Livingston, Journal of nuclear medicine official publication, Society of Nuclear Medicine 2003, 44, 1806.
- [17] K. R. Zasadny, M. Tatsumi, R. L. Wahl, *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* **2003**, *30*, 274.
- [18] N. A. Mullani, R. S. Herbst, R. G. O'Neil, K. L. Gould, B. J. Barron, J. L. Abbruzzese, *Journal of nuclear medicine official publication, Society of Nuclear Medicine* **2008**, 49, 517.
- [19] R. B. O'Malley, E. V. Soloff, A. L. Coveler, D. H. Cox, N. Desai, J. M. Busey, G. M. Valentin, C. L. Wang, *Abdom Radiol* **2021**, *46*, 1992.