

Aus der Klinik für Ophthalmologie
(Direktor: Prof. Dr. med. Johann Roider)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Untersuchungen zur Effizienz von Aflibercept, Ranibizumab und
Bevacizumab bei der feuchten Form der altersbedingten
Makuladegeneration mit einem *in vitro* Organkulturmodell**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
MUHAMMED ZAHID RECBER

aus
Izmir

Kiel 2018

**Meinen Eltern,
meiner Frau
und meinem Kind.**

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Alexa Klettner
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Ralph Lucius
Tag der mündlichen Prüfung: 10.09.2018
Zum Druck genehmigt, Kiel, den 10.09.2018

gez. PD Dr. Felix Treumer
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | 6 |
| 1 EINLEITUNG | 8 |
| 1.1 ALTERSBEDINGTE MAKULADEGENERATION – EPIDEMIOLOGIE, RISIKOFAKTOREN, PATHOGENESE..... | 8 |
| 1.2 STADIENEINTEILUNG UND FORMEN DER AMD..... | 9 |
| 1.3 ANGIOGENESE | 9 |
| 1.4 CHOROIDEALE NEOVASKULARISATION | 10 |
| 1.5 VEGF..... | 11 |
| 1.6 VEGF-REZEPTOREN..... | 12 |
| 1.7 MEDIKAMENTÖSE THERAPIE DER EXSUDATIVEN FORM DER AMD..... | 13 |
| 1.7.1 Bevacizumab..... | 13 |
| 1.7.2 Ranibizumab..... | 14 |
| 1.7.3 Aflibercept..... | 15 |
| 1.8 FRAGESTELLUNG DER ARBEIT | 17 |
| 2 MATERIAL UND METHODEN..... | 18 |
| 2.1 MATERIALIEN..... | 18 |
| 2.1.1 Geräte, Instrumente und Verbrauchsmaterialien..... | 18 |
| 2.1.2 Inhibitoren..... | 20 |
| 2.1.3 Chemikalien..... | 21 |
| 2.1.4 Sonstige Materialien..... | 21 |
| 2.2 METHODEN..... | 23 |
| 2.2.1 Organkultur..... | 23 |
| 2.2.2 ELISA..... | 27 |
| 2.2.3 Calcein-Test zur Bestimmung der Zellviabilität..... | 28 |
| 2.2.4 Statistik..... | 29 |
| 3 ERGEBNISSE | 30 |
| 3.1 CALCEIN-FÄRBUNG | 30 |
| 3.2 MINIMAL WIRKSAME KONZENTRATIONEN DER VEGF-INHIBITOREN..... | 31 |
| 3.3 DAUER DER VEGF-INHIBITION..... | 35 |
| 4 DISKUSSION | 37 |
| 5 ZUSAMMENFASSUNG | 44 |
| 6 LITERATURVERZEICHNIS | 45 |
| 7 VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND DIAGRAMME | 57 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 8 | TABELLENVERZEICHNIS | 58 |
| 9 | DANKSAGUNG | 59 |
| 10 | EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG | 60 |
| 11 | VERÖFFENTLICHUNGEN | 61 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------|---|
| Abb. | Abbildung |
| AMD | Altersbedingte Makuladegeneration |
| C | Celsius |
| CATT | <i>Comparison of AMD Treatments Trials</i> |
| CNV | Choroideale Neovaskularisation |
| d | Tag |
| ELISA | <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| FGF | <i>Fibroblast growth factor</i> |
| g | Gramm |
| h | Stunde |
| HIF-1 | <i>hypoxia-inducible-factor 1</i> |
| Ig | Immunglobulin |
| kDa | kilodalton |
| MARINA | <i>Minimally Classic/Occult Trial of the Anti-VEGF Antibody Ranibizumab in the Treatment of the Neovascular AMD</i> |
| mg | Milligramm |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| mmol | Millimol |
| μ | mikro |
| μg | Mikrogramm |
| μl | Mikroliter |
| NaCl | Natriumchlorid |
| nm | Nanometer |
| PDGF | <i>Platelet derived growth factor</i> |
| PEDF | <i>Pigment epithelium derived factor</i> |
| pg | Pikogramm |
| PIGF | <i>Placental growth factor</i> |

| | |
|------|--|
| pmol | Pikomol |
| VEGF | <i>Vascular endothelial growth factor</i> |
| VIEW | <i>Investigation of Efficacy and Safety in Wet AMD</i> |

1 Einleitung

1.1 Altersbedingte Makuladegeneration – Epidemiologie, Risikofaktoren, Pathogenese

Die altersbedingte Makuladegeneration (AMD) ist eine progrediente Erkrankung der Netzhaut, die im Endstadium zum Visusverlust und zur Erblindung führen kann. Die Augenerkrankung tritt bei älteren Menschen jenseits der fünften Lebensdekade ein. (1) In den westlichen Industrienationen (Europa, USA) ist die AMD die am häufigsten vorkommende irreversible Erblindungsursache. (2) Schätzungen zufolge sind ca. 50 Millionen Menschen weltweit an einer AMD erkrankt; diese Zahl wird sich voraussichtlich in den nächsten 20 Jahren verdoppeln. (3, 4) Die Anzahl der Erkrankten in Deutschland wird auf 4,5 Millionen Menschen geschätzt. (5) Mit zunehmendem Alter erhöht sich nicht nur die Wahrscheinlichkeit an einer AMD zu erkranken, sondern auch die Progressionstendenz der Erkrankung steigt deutlich an. (6) Die Prävalenz des Spätstadiums der AMD wurde bei über 60-Jährigen auf 0,33 %, bei über 70-Jährigen auf 1,38 % und bei über 80-Jährigen auf über 5,60 % beziffert. (7) Der wichtigste Risikofaktor für eine AMD ist das Alter. (8) Weitere Risikofaktoren sind Rauchen, genetische Polymorphismen und Umweltfaktoren. (9, 10, 11) Menschen kaukasischer Abstammung sind häufiger betroffen als Schwarze. (12) Der komplexe Pathomechanismus der AMD ist bisher noch nicht vollständig entschlüsselt. Vermutlich spielen genetische Faktoren und Umweltfaktoren eine Rolle. (13) Die Diagnose der AMD erfolgt primär über die Detektion von anatomischen Veränderungen an der Makula. (14) Die Makula enthält die größte Dichte an Sehzellen und bildet den Ort des schärfsten Sehens (Fovea). Daher können Läsionen in der Makula extrem visuslimitierend sein. (15) Die Erkrankung entsteht nicht im neuronalen Gewebe der Retina, sondern in den darunter liegenden Strukturen. Dazu gehören das retinale Pigmentepithel (RPE), die Bruch'sche Membran und die Aderhaut. (16) Charakteristisch für die frühe Form der AMD sind Drusen oder Veränderungen des RPE ohne weitere visusbeeinträchtigende okuläre Erkrankungen. Von Bedeutung sind Zellschäden, die durch oxidativen Stress entstehen und deren Ätiologie nicht genau bekannt ist. Die Prozesse, die bei einer Dysfunktion des RPE im Rahmen der AMD auftreten, sind auch im normalen alternden Auge zu beobachten. Daher steht die Erkrankung im engen Zusammenhang mit dem Alterungsprozess. (17)

1.2 Stadieneinteilung und Formen der AMD

Bei der AMD unterscheidet man ein Früh- und Spätstadium, wobei Letzteres weiter in eine "trockene" atrophische und eine „feuchte“ exsudative Form unterteilt wird. Die frühe Form der AMD ist durch Drusenbildung und Pigmentveränderungen (im Sinne von Hyper- und Depigmentierungen) charakterisiert. Die Patienten sind in der Regel asymptomatisch. (18) Bei der späten trockenen Form der AMD kommt es zu einer geographischen Atrophie des RPE, bei der die Pigmentepithelzellen langsam absterben. Weitere Charakteristika sind die Atrophie der Choriocapillaris und das Auftreten von sogenannten weichen Drusen. Bei den Drusen handelt es sich um amorphe extrazelluläre Ablagerungen zwischen dem RPE und der Bruch'schen Membran, die aufgrund von Störungen und Überlastungen des Stoffwechsels der RPE-Zellen entstehen. (19) Im Vergleich zur feuchten Form der AMD ist das Fortschreiten der Photorezeptordegeneration bei der geographischen Atrophie meist langsamer. Patienten können blinde Punkte im Visusfeld haben. Im fortgeschrittenen Stadium der trockenen AMD kann es aber auch zu einem kompletten Zentralvisusverlust kommen. Für die trockene Form der AMD existiert derzeit keine Therapie. (20, 21) Von der feuchten Form der AMD sind ca. 10–15 % der AMD-Patienten betroffen. Charakteristisch für diese Form ist die choroideale Neovaskularisation (CNV). Die pathologischen Blutgefäße an der Choroidea liegen unterhalb der Makula. Aus den neugebildeten Blutgefäßen tritt Flüssigkeit in die Retina über. Die Folgen sind Distorsionen, eine Abhebung des RPE und eine Beschädigung von Photorezeptoren. Häufig kommt es daher zu einem plötzlich auftretenden Visusverlust. (21, 22) Die feuchte Form der AMD kann auch gemeinsam mit einer geographischen Atrophie (trockene Form) am selben Auge auftreten. (23)

1.3 Angiogenese

Bereits 1971 erkannte Judah Folkman, dass Tumorzellen in der Lage sind, die Angiogenese zu stimulieren. Damit stellt die Inhibierung der Angiogenese eine vielversprechende Therapieoption verschiedener Tumoren dar. (24)

Während der Embryogenese entstehen Blutgefäße durch zwei Mechanismen: Bei der Vasculogenese werden Endothelzellen aus Vorgängerzellen (Angioblasten) gebildet. Im Rahmen der Angiogenese sprossen neue Kapillaren aus bereits bestehenden Blutgefäßen aus. Bei Erwachsenen entstehen neue Blutgefäße dagegen nur über die Angiogenese. (25) Die das Lumen der Blutgefäße auskleidenden Endothelzellen sind für die Formation der Gefäße, für die Aufrechterhaltung des Blutkreislaufes sowie für eine suffiziente Gewebepfusion verantwortlich. (26) Die Angiogenese wird durch anti-angiogene und pro-angiogene

Faktoren, die auf die Endothelzellen einwirken, gesteuert. Zurzeit sind mehr als 20 Stimulatoren und 20 Inhibitoren identifiziert worden. Zu den angioregulatorischen Molekülen gehören *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), Angiopoietine und die Ephrine. Da diese Mediatoren vorzugsweise auf das Gefäßsystem wirken, gelten sie als Schlüsselregulatoren der angiogenen Kaskade. (25) Zu den angiogenen Faktoren, die die Gefäßproliferation fördern, gehören neben VEGF *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF), *Transforming Growth Factor- β 1*, *Fibroblast Growth Factor* (FGF), Angiogenin und *Placental Growth Factor* (PlGF). Bekannte Inhibitoren der Gefäßproliferation sind Endostatin, Thrombospondin oder der *Pigment Epithelium Derived Factor-1* (PEDF-1). (27) Die am besten charakterisierte Familie angiogener Wachstumsfaktoren sind die VEGF. (26) VEGF sind in Endothelzellen für die Chemotaxis, Differenzierung, Proliferation, Vasculogenese und angiogene Umformung verantwortlich. (28) VEGF sind auch für die retinale Vasculogenese essentiell. (29)

1.4 Choroideale Neovaskularisation

Die CNV ist der wichtigste Pathogenesefaktor für die Erblindung im Rahmen einer feuchten AMD. (30) Die CNV umfasst die pathologische Neubildung von Blutgefäßen und deren Ausbreitung von der Choroidea in den subretinalen Raum, unter das RPE oder in die Retina. (21) In der vorliegenden Arbeit stehen die Therapeutika zur Behandlung der CNV im Rahmen einer feuchten exsudativen AMD im Vordergrund. Um den Entstehungsmechanismus der CNV und die möglichen therapeutischen Interventionen zu verstehen, ist ein kurzer Einblick in die Physiologie der Choroidea sowie des RPE unumgänglich.

Die Choroidea des Erwachsenen kann in fünf Schichten (Bruch'sche Membran, Choriocapillaris, Sattler's Schicht, Haller's Schicht, Suprachoroidea) unterteilt werden. Die physiologische Rolle der unter der Bruch'schen Membran liegenden Choriokapillaren ist die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der Photorezeptoren. Diese Zellen haben den höchsten Sauerstoffbedarf im menschlichen Körper. Die Blut-Retina-Schranke der äußeren Retina wird von den RPE-Zellen gebildet. Die auf der Seite der Bruch'schen Membran liegenden Fenestrations sind hoch permeabel für Nährstoffe. (31)

Das RPE ist für den Erhalt der Choriocapillaris und der Kapillarfenestration essentiell. (31) RPE-Zellen schütten Faktoren (Proteine) aus, die die Choriocapillaris versorgen. Der wichtigste pro-angiogene Faktor der RPE-Zellen ist das VEGF. Kommt es zu einer Stresssituation im RPE, schütten die RPE-Zellen vermehrt VEGF aus. (32)

Besonders in hypoxischen Situationen setzen RPE-Zellen vermehrt angiogene Wachstumsfaktoren wie VEGF frei. (33, 34) Außerdem wird bei AMD-Patienten eine verminderte Expression des anti-angiogenen Faktors *Pigment Epithelium Derived Factor* (PEDF) beobachtet. Dadurch überwiegen die pro-angiogenen Faktoren und fördern die pathologische Angiogenese in der Choroidea. (35) Die Kapillaren der Aderhaut wachsen nicht nur durch die Bruch'sche Membran in den subretinalen Raum unter das RPE ein, sondern können auch zwischen dem RPE und den Photorezeptoren wachsen. Das kann zu Makulaödemen, Lipidablagerungen, einer verminderten physiologischen Aderhautdurchblutung, Blutungen und einer Abhebung des RPE führen. (36) Im Endstadium der feuchten AMD führt eine unbehandelte CNV durch einen fibrotischen Umbau zur Exsudatansammlung unterhalb der Makula und zur Bildung einer disziformen Narbe. Diese Narbe macht sich klinisch als Zentralskotom mit Visusverlust bemerkbar.

1.5 VEGF

1989 isolierten Ferrara et al. aus der Rinderhypophyse ein potentes Endothelzellmitogen. (37) Aufgrund der Endothelzell-spezifischen Wirkung dieses Proteins bezeichneten sie es als VEGF, welches mittlerweile als VEGF-A bezeichnet wird. (38) Zuvor war dasselbe Protein 1983 von Senger et al. als *Tumor Vascular Permeability Factor* beschrieben worden. (39) VEGF-A ist ein Glykoprotein mit einer molekularen Masse von 45 Kilodalton (kDa). (37) Es besteht aus zwei Untereinheiten von je 23 kDa. (40) Zu der VEGF-Familie gehören außer VEGF-A noch VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D und der PlGF. Das am besten untersuchte Mitglied dieser Familie ist der VEGF-A. Als Hauptinduktor der Angiogenese ist VEGF-A der Angriffspunkt der meisten anti-VEGF-Behandlungen. Auch die vorliegende Arbeit beschäftigt sich hauptsächlich mit VEGF-A, das im Weiteren, wie in der Literatur üblich, als VEGF bezeichnet wird. Das VEGF-Gen ist auf Chromosom 6 lokalisiert und besteht aus acht Exons und sieben Introns. (41) Im menschlichen Körper konnten bisher neun Isoformen von VEGF identifiziert werden, die durch alternatives Spleißen entstehen. Ihre Bezeichnung spiegelt die Anzahl der Aminosäuren in den VEGF-Proteinen wider (VEGF-121, 145, 148, 162, 165, 165 b, 183, 189). (42) Die VEGF-Isoformen weisen unterschiedliche Eigenschaften auf. Beispielsweise handelt es sich bei VEGF-121 um ein frei diffundierendes Protein ohne Heparin-bindende Domäne. VEGF-189 und VEGF-206 sind dagegen stark basisch, binden mit hoher Affinität an Heparin und haften fast ausschließlich an der extrazellulären Matrix. VEGF-165 zeigt teilweise die Eigenschaften der anderen Isoformen, bindet an Heparin und besitzt eine gute Bioverfügbarkeit. (43)

1993 entdeckten Adamis et al., dass RPE-Zellkulturen und RPE-Zellen aus unmittelbar *post mortem* entnommenen Augen den VEGF freisetzen. (44) Laut Kim et al. ist VEGF auch in gesunden RPE-Zellen und Choriokapillaren von Ratten und Affen nachzuweisen. (45) Das im Auge von RPE-Zellen freigesetzte VEGF besitzt eine neuroprotektive Wirkung in der Retina und im RPE. (46, 47) VEGF bindet selektiv an auf der Oberfläche von Gefäßendothelzellen lokalisierten Rezeptoren. Er beeinflusst die Proliferation, Migration und das Überleben der Endothelzellen. (48) Auch unter oxidativem Stress schütten RPE-Zellen vermehrt VEGF aus. (49) Nach der aktuellen Studienlage spielt VEGF in der Pathogenese der CNV die wichtigste Rolle. (50) Dabei gilt die Hypoxie als der bedeutendste auslösende Reiz für eine erhöhte VEGF-Ausschüttung durch RPE-Zellen. Bei der Regulation der VEGF-Expression durch Hypoxie spielt der Transkriptionsfaktor *hypoxia-inducible factor 1* (HIF-1) eine wichtige Rolle. (51) Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass Lipidperoxidationen oder Lipofuscinakkumulationen in RPE-Zellen lysosomale Dysfunktionen verursachen und inflammatorische Faktoren aktivieren, die die VEGF-Ausschüttung steigern. (32)

1.6 VEGF-Rezeptoren

Die Isoformen der VEGF-Familie binden mit unterschiedlichen Affinitäten an drei VEGF-Rezeptoren (VEGFR-1, -2, -3), die zur Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren gehören. Während sich VEGFR-1 und VEGFR-2 vor allem auf der Oberfläche von Endothelzellen befinden, sind VEGFR-3 in Lymphgefäßen lokalisiert. (52) VEGFR-1 und VEGFR-2 dimerisieren nach Bindung des Liganden. Im Anschluss kommt es durch die intrazellulären Tyrosinkinase-Domänen zur Autophosphorylierung der VEGFR, wodurch die intrazelluläre Signaltransduktionskaskade eingeleitet wird. (53) VEGFR-1 hat eine höhere Bindungsaffinität zu VEGF, aber die resultierende Signalaktivierung ist schwächer. (54) In seiner löslichen Form agiert der VEGFR-1 als „Köderrezeptor“ für den Liganden, wodurch er die physiologischen Funktionen von VEGF hemmt. (55) Der VEGFR-2 gilt als Hauptrezeptor für VEGF in der Retina. Zusätzlich agieren Neuropiline als VEGF-Ko-Rezeptoren. (56) Alleine können VEGF-Ko-Rezeptoren kein intrazelluläres VEGF-Signal in RPE-Zellen auslösen, sie brauchen dazu VEGFR-1 oder VEGFR-2. (57) VEGFR-1 findet sich unter anderem in den inneren Segmenten der Photorezeptoren sowie in der inneren Choriokapillaris. Dagegen wird VEGFR-2 vom RPE, dem Endothelium der Choriokapillaren, in den Müllerzellen sowie in den Photorezeptoren exprimiert. (31)

1.7 Medikamentöse Therapie der exsudativen Form der AMD

In der Vergangenheit wurden verschiedene Therapieoptionen für die feuchten Form der AMD entwickelt. Einige dieser Therapieoptionen werden heute noch angewendet, kommen allerdings nur noch wenig zum Einsatz. Hierunter zählt die Laserkoagulation, bei der die angiographisch darstellbaren Anteile der CNV mittels Photokoagulation zerstört werden. (58, 59) Eine weitere Therapieoption ist die intravitreale Injektion des Glukokortikoids Triamcinolon. (60) Auch Kombinationsbehandlungen aus Triamcinolon und einer photodynamischen Therapie mit Verteporfin kommen zum Einsatz. (61)

Aktuell gilt die VEGF-Inhibition als Hauptansatz für eine CNV-Therapie im Rahmen der AMD. Es wurde gezeigt, dass VEGF-Ausschüttung bei AMD-Patienten mit CNV erhöht ist. (50) Die erhöhte VEGF-Expression bei Patienten mit einer neovaskulären Form der AMD wird pharmakologisch neutralisiert, um dem Fortschritt der Erkrankung entgegenzuwirken. (62) Das Grundprinzip dabei ist die spezifische Ausschaltung von Schlüsselmolekülen der angiogenen Kaskade. In den vergangenen beiden Dekaden wurden vier Präparate entwickelt, die VEGF spezifisch inhibieren. Die vorliegende Arbeit vergleicht drei dieser Präparate (Bevacizumab, Ranibizumab, Aflibercept) hinsichtlich ihrer Effizienz und Effekte.

Im Jahre 2004 wurde als erster VEGF-Inhibitor Pegaptanib (Macugen[®], Eyetech, New York, USA) in den USA zugelassen. Hierbei handelt es sich um ein Aptamer, das selektiv an die Heparin-bindende Domäne der VEGF-165-Isoform bindet und dessen Wechselwirkung mit dem VEGF-R bzw. seinen Ko-Rezeptoren verhindert. (62) Heute spielt Pegaptanib aufgrund der Entwicklung effizienterer VEGF-Inhibitoren in der Behandlung der CNV eine untergeordnete Rolle. Daher wird in der vorliegenden Arbeit nicht näher auf Pegaptanib eingegangen.

1.7.1 Bevacizumab

Bevacizumab (Avastin[®], Genentech, South San Francisco, USA) ist ein monoklonaler Antikörper (149 kDa, IgG1), der in Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) hergestellt wird. (63) Ausgangspunkt der Entwicklung von Bevacizumab war ein muriner Anti-VEGF-Antikörper (A.4.6.1). (64) Im weiteren Verlauf wurde dieser Antikörper humanisiert (65). Der daraus entstehende Antikörper mit 93 % menschlichen und 7% murinen Sequenzen wurde zunächst als rhu MAB (*recombinant Monoclonal Antibody*) VEGF bezeichnet. (65) Im Gegensatz zu Ranibizumab handelt es sich bei Bevacizumab um einen kompletten Antikörper mit einem Fc-Fragment, der über eine multimerische Bindung an

VEGF-Isoformen die VEGF-VEGFR-Interaktion blockiert und somit die Angiogenese hemmt. Die Halbwertszeit von Bevacizumab beträgt bei systemischer Gabe 17 bis 21 Tage, (66) und intravitreal fünf bis acht Tage. (67) Die im Vergleich zu Ranibizumab lange systemische Serum Halbwertszeit ist wahrscheinlich auf den Fc-Anteil zurückzuführen. IgGs werden in der Blutzirkulation durch ihre Fc-Anteile geschützt. (67) Die Affinität von Bevacizumab zu VEGF-A beträgt $K_d \approx 1,0 \text{ pmol/l}$. Bevacizumab bindet an alle Isoformen von VEGF-A, kann aber z.B. VEGF-B oder PlGF nicht neutralisieren. (66) Das anti-angiogen wirkende Präparat wurde 2004 von der *Food and Drug Administration* (FDA) in den USA für die Behandlung des Kolorektalen Karzinoms zugelassen. (66) Bevacizumab wird aktuell in der Tumortherapie beispielsweise bei Cervixkarzinomen, (68) Kolorektalen Karzinomen (69) sowie Hirnmetastasen (70) eingesetzt. Für die Behandlung der feuchten Form der AMD wird es ohne Zulassung als "Off-Label"-Produkt intravitreal verwendet. (71) Obwohl Bevacizumab wegen der fehlenden klinischen Phase-3-Zulassungsstudien offiziell nicht zugelassen war, wurde es als Off-Label Präparat in den USA 2008 häufiger als Ranibizumab verwendet. (72) Dies ist unter anderem auf den enormen Preisunterschied der beiden Präparate zurückzuführen (Lucentis 2000 Dollar versus Avastin 50 Dollar). (71) In der CATT-(*Comparison of Age-related macular Degeneration Treatments Trials*)-Studie zeigten Bevacizumab und Ranibizumab bei Patienten mit CNV im Rahmen einer AMD ähnliche Effizienzprofile. (73)

1.7.2 Ranibizumab

Ranibizumab (Lucentis[®], Genentech Inc., San Francisco, CA, USA) ist ein synthetisches Fab-Antikörperfragment, das aus einem murinen VEGF-A-Antikörper entwickelt wurde. Ranibizumab wird in gentechnisch veränderten *Escherichia coli* Bakterien produziert. (74) Das rekombinante Protein besteht aus zwei Domänen: einem nicht-bindenden Teil aus humanen Sequenzen und einem murinen Epitop mit starker Bindungsaffinität zum Antigen. (75, 76) Die geringe molekulare Masse von 48 kDa (74) erlaubt eine bessere Penetration durch die innere Membran der Retina. (77) Ranibizumab ist ein pan-VEGF-A-Inhibitor, der an alle VEGF-A-Isoformen, nicht aber an weitere VEGF-Familienmitglieder, bindet. Intravitreal appliziertes Ranibizumab weist im humanen Auge eine Halbwertszeit von sieben bis neun Tagen auf. In Kaninchen und Affen beträgt der Wert dagegen drei Tage. (67, 77, 78, 79) Da Ranibizumab kein Fc-Fragment enthält wird es rasch aus der Blutzirkulation geklärt, so dass die Serum Halbwertszeit zwei Stunden beträgt.

In der MARINA-*(Minimally Classic/Occult Trial of the Anti-VEGF Antibody Ranibizumab in the Treatment of the Neovascular AMD)* und ANCHOR-*(Anti-VEGF Antibody for the Treatment of Predominantly Classic Choroidal Neovascularization in AMD)*-Studie (beides doppelblinde, kontrollierte und multizentrische Phase-3-Studien) kam es bei Patienten mit der feuchten Form der AMD nach der intravitrealen Injektion von Ranibizumab zu einer Regredienz des Sehverlustes und einer Verbesserung der Sehschärfe. (80, 81) Die guten Studienergebnisse (MARINA-Studie) führten dazu, dass 2006 Ranibizumab offiziell für die Behandlung der CNV zugelassen wurde. (75)

1.7.3 Aflibercept

Die Entwicklung von Aflibercept ist auf die Arbeiten von Holash et al. zurückzuführen, die einen kombinierten VEGFR-1 und VEGFR-2 entwickeln wollten. Sie stellten zunächst einen löslichen Rezeptor aus den ersten drei Ig-Domänen des VEGFR-1 und der konstanten Fc-Region eines humanen IgG1 her. Das Protein zeichnete sich durch eine hohe Affinität für VEGF aus, zeigte aber ungünstige pharmakokinetische Eigenschaften, die bei der weiterentwickelten Form VEGF r1r2 verbessert wurden. (82)

Das rekombinante Fusionsprotein Aflibercept besteht aus der zweiten Ig-bindenden Domäne des VEGFR-1 und der dritten Ig-bindenden Domäne des VEGFR-2, die mit der humanen IgG-Fc-Region fusioniert wurden. (83) Im Gegensatz zu Bevacizumab und Ranibizumab bindet Aflibercept nicht nur alle VEGF-A-Isoformen, sondern auch VEGF-B und PlGF. Anders als Bevacizumab, das eine multimerische Bindung mit VEGF eingeht, bildet Aflibercept einen 1:1 Komplex mit VEGF. (84) Weiter ist die VEGF-Bindungsaffinität von Aflibercept deutlich größer als bei Ranibizumab und Bevacizumab. Seine Dissoziationskonstante $[K]$ für VEGF beträgt 0,49 pmol/l und liegt somit niedriger als die von Ranibizumab und Bevacizumab. Die Affinität von Aflibercept für VEGF-A ist um den Faktor 90 bzw. 120 größer als die von Ranibizumab bzw. Bevacizumab. (83) Die Daten zur Effizienz von Aflibercept im Vergleich zu den beiden anderen VEGF-Inhibitoren sind jedoch widersprüchlich. Yu et al. beschrieben für Ranibizumab und Aflibercept ähnliche VEGF-A-Bindungsaffinitäten, die im Vergleich zu Bevacizumab um den Faktor 11 bis 35 höher lagen. (85) Daher kann Aflibercept auch in geringeren Konzentrationen VEGF länger blockieren. Bei gleicher Dosis sind längere Injektionsabstände bei der Behandlung der Patienten möglich. (87) Im November 2011 wurde das Präparat von der FDA in den USA offiziell zugelassen. Die intravitreale Halbwertszeit von Aflibercept beträgt ca. 4,8 Tage. (86)

Zu den ersten klinischen Studien zur Effizienz von Aflibercept gehört die CLEAR-(*Clinical Evaluation of Antiangiogenesis in the Retina*)-Studie, in der 19 Patienten mit intravitrealem Aflibercept und sechs Patienten mit Placebo behandelt wurden. Aflibercept reduzierte die Retinadicke um 60 %. (88) In der mit 159 erkrankten Patienten durchgeführten CLEAR-IT 2 Studie erwiesen sich vier- und achtwöchige intravitreale Injektionsabstände (2 mg Aflibercept) als vergleichbar effektiv hinsichtlich der visuellen Ergebnisse. (89) Die bisher größte mit Aflibercept durchgeführte klinische Studie (*Investigation of Efficacy and Safety in Wet AMD*-(VIEW)-Studie) ergab, dass Aflibercept dem Ranibizumab nicht unterlegen ist. (90) In der Literatur und in der Klinik ist eine bessere Wirksamkeit des Aflibercept insbesondere gegenüber Ranibizumab umstritten und wird kontrovers diskutiert. (83, 85)

1.8 Fragestellung der Arbeit

In der vergangenen Dekade wurden große Fortschritte bei der medikamentösen Behandlung der feuchten AMD gemacht. Eine große Bedeutung hat in diesem Kontext die Anti-VEGF-Behandlung mit Bevacizumab, Ranibizumab und Aflibercept. Zur Effizienz dieser drei Medikamente gibt es aufgrund widersprüchlicher Befunde aktuell unterschiedliche Meinungen.

In der vorliegenden experimentellen Arbeit sollen die drei Medikamente mit einem Organkultursystem unter *in vitro* Bedingungen aus Schweineaugen erstmals im direkten Vergleich zueinander getestet werden. Dabei soll evaluiert werden, wie lange verschiedene Konzentrationen dieser Medikamente als VEGF-Blocker wirken und welche minimalen Konzentrationen zur VEGF-Blockade erforderlich sind.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte, Instrumente und Verbrauchsmaterialien

| Geräte/Instrumente/ Verbrauchsmaterialien | | Firma | Herkunft |
|--|----------------------|-----------------------------|-------------------|
| Abzüge | Antair BS | A. Sternkopf GmbH | Lübeck, D |
| | Abzug Systemlabor | Köttermann GmbH & Co. KG | Uetze/Hänigsen, D |
| Autoklav, Varioklav | | Thermo scientific | Dreieich, D |
| Brutschrank | | Labotect | Göttingen, D |
| Falcon-Röhrchen | Centrifuge Tubes | VWR | New York, USA |
| Fluoreszenzkamera AxioCam MRm | | Carl Zeiss AG | Jena, D |
| Mikroskop | Axiovert 100 | Carl Zeiss AG | Hennigsdorf, D |
| Mikrotiterplatten- Dispenser | | Biotek GmbH | Jahnsdorf, D |
| Mikrotiterplatten- Photometer, ELx800 | | Biotek GmbH | Jahnsdorf, D |
| Perfusions- kammersystem | | Minucells & Minutissue | Bad Abbach, D |

| | | | |
|---|--------------------|-----------------------------|---------------|
| Photometer | Spectronic Genesys | Thermo Electron Corporation | Erlangen, D |
| Pinzette | Pinzette BD 314 | Aesculap AG | Tuttlingen, D |
| Pipetten | Research® | Eppendorf AG | Hamburg, D |
| Pipettierhilfe | Pipetus® | Hirschmann Laborgeräte | Eberstadt, D |
| Präparationsbesteck: Anatomische Pinzette, gerade Anatomische Pinzette, gebogen Enukleationsschere Hornhautscheren Castroviego | | Bausch & Lomb GmbH | Berlin, D |
| Schere | Schere 545A | Hermle Labortechnik GmbH | Wehingen, D |
| Skalpell | Rasierklinge T585 | Plano GmbH | Wetzlar, D |
| Saugpumpen | Vacunsafe comfort | Integra Biosciences AG | Zizers, CH |
| Schüttler | Rocking platform | VWR | New York, USA |
| Vortexer | Vortex-Genie 2 | Scientific Industries | New York, USA |
| Waage | Waage | Kern & Sohn GmbH | Balingen, D |
| Wasserbad 1086 | | GFL | Burgwedel, D |

| | | | |
|------------------------------------|----------------------|--------------------------------|--------------|
| Wippschüttler | | VWR | Darmstadt, D |
| Zellkulturschalen | Nunclon™ ΔSurface | Nunc A/S | Roskilde, DK |
| Zellkultur Testplatten, 12-Loch | | Th. Geyer GmbH | Berlin, D |
| Zentrifugen | Sorvall ST40 | Thermo Fisher Scientific | Dreieich, D |
| | Centrifuge 5414 | Eppendorf AG | Hamburg, D |
| | Heralus Fresco 17 | Thermo Electron Corporation | Erlangen, D |

Tabelle 1: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien

2.1.2 Inhibitoren

| Wirkstoff | Bezeichnung | Ausgangskonzentration | Herkunft |
|-------------|-------------|-----------------------|--------------------------------------|
| Bevacizumab | Avastin | 25 mg/ml | Novartis, Basel, CH |
| Ranibizumab | Lucentis | 10 mg/ml | Novartis Pharma GmbH, Nürnberg, D |
| Aflibercept | Eylea | 40 mg/ml | Bayer AG, Leverkusen, D |
| | Zaltrap | 25 mg/ml | Regeneron, Tarrytown, NY, USA |

Tabelle 2: Verwendete Inhibitoren

2.1.3 Chemikalien

| Chemikalien | | Firma | Herkunft |
|-----------------------|-------------------|--------------------------------|--------------|
| Ethanol | Ethanol 99% | Büfa Chemikalien GmbH & Co. KG | Hude, D |
| DMSO | Dimethylsulfoxid | Carl Roth GmbH & Co. KG | Karlsruhe, D |
| Mercaptoethanol | 2-Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich Chemie GmbH | Steinheim, D |
| Calcein Acetoxymethyl | (Calcein AM) | AnaSpec Inc. | Fremont, USA |

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien

2.1.4 Sonstige Materialien

| Sonstige Materialien | Bezeichnung | Firma | Herkunft |
|----------------------|---|-----------------------|----------------|
| Aqua bidest | Ampuwa® Spüllösung | Fresenius Kabi | Bad Homburg, D |
| Betaisodona | Betaisodona® | Mundipharma GmbH | Limburg, D |
| DMEM High Glucose | Dulbecco's Modified Eagle's Medium-High Glucose | PAA Laboratories GmbH | Pasching, A |

| | | | |
|------------------------------|---|-----------------------|------------------|
| HEPES | 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperatiny]-ethansulfonat | PAA Laboratories GmbH | Pasching, A |
| PBS | Phosphat-gepufferte Salzlösung | PAA Laboratories GmbH | Pasching, A |
| Pe/St | Penicillin/Streptomycin | PAA Laboratories GmbH | Pasching, A |
| Sample buffer | 4x SDS Sample Buffer | Merck KGaA | Darmstadt, D |
| Sodium Pyruvat | Sodium pyruvate | PAA Laboratories GmbH | Pasching, A |
| Human VEGF Quantikine® ELISA | | R&D Systems | Minneapolis, USA |

Tabelle 4: Sonstige Materialien

2.2 Methoden

2.2.1 Organkultur

2.2.1.1 Prinzip der Organkultur

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Organkulturmodell aus porcinen RPE-Zellen verwendet. Bei diesem Organkultursystem wird das gewonnene Organkulturmaterial kontinuierlich mit Nährmedium durchgespült. Das Organkultursystem wurde 1996 von Minuth et al. entwickelt. (91) Miura et al. etablierten 2010 das Perfusionssystem für RPE-Zellen. (92) Nach Zufuhr verschiedener Mediatoren in das fließende Organkulturmedium kann deren Wechselbeziehung mit den RPE-Zellen getestet werden, in dem das Medium am Ausgang der Perfusionskammer gesammelt und analysiert wird.

2.2.1.2 Präparation der Choroidea/RPE-Organkulturen

Für die Präparation der Choroidea/RPE-Organkulturen wurden Augen von frisch geschlachteten Schweinen maximal vier Stunden *post mortem* von regionalen Schlachthöfen geliefert. Die Kühlkette wurde vom E nukleationszeitpunkt bis zur Präparation nicht unterbrochen. Die Augen wurden mittels Schere und Pinzette von überschüssigem Gewebe und Muskulatur befreit und anschließend in einer sterilen Betaisodona-Lösung für 5 Minuten inkubiert und in eine kalte NaCl-Lösung eingetaucht.

Der anteriore Teil des Auges wurde in etwa in der Höhe des Pars plana (etwa 3–4 mm dorsal des Limbus) mit einer scharfen Klinge in äquatorialer Ebene aufgeschnitten. Der vordere Teil samt Kornea, Iris, Linse sowie Ciliarkörper wurden von dem hinteren Teil des Augapfels sorgfältig abgetrennt (siehe Abbildung 1). Anschließend wurde durch vorsichtiges Komprimieren der Glaskörper entfernt. Mit einer großen Schere wurde ein Schnitt von temporal (von dem am weitesten vom Sehnerv entfernten Randpunkt) und ein Schnitt von nasal (gegenüberliegend) zum Sehnerv durchgeführt und der restliche Augapfel in zwei gleichgroße Teile zerlegt. Die Retina wurde mit einer gebogenen Pinzette von der Choroidea abgetrennt. Danach wurde die Choroidea mit aufliegender RPE vorsichtig von der Sklera abgelöst. Das aus der Sklera gelöste RPE/Choroideagewebe wurde zwischen dem weißen („*tension-ring*“) und schwarzen Ring („*base-ring*“) eines Minuth-Ringpaares (Minusheet) eingespannt und befestigt. Anschließend wurde der Ring von dem umliegenden, überschüssigen Gewebe freipräpariert.

Um möglichst reproduzierbare *in vitro* Bedingungen zu gewährleisten, wurden die Choroidearinge in eine Glasschale mit auf 37 °C aufgewärmtem Organkulturmedium

gegeben. Dieser Vorgang wurde mehrere Male bis zur gewünschten Anzahl von Ringen wiederholt.

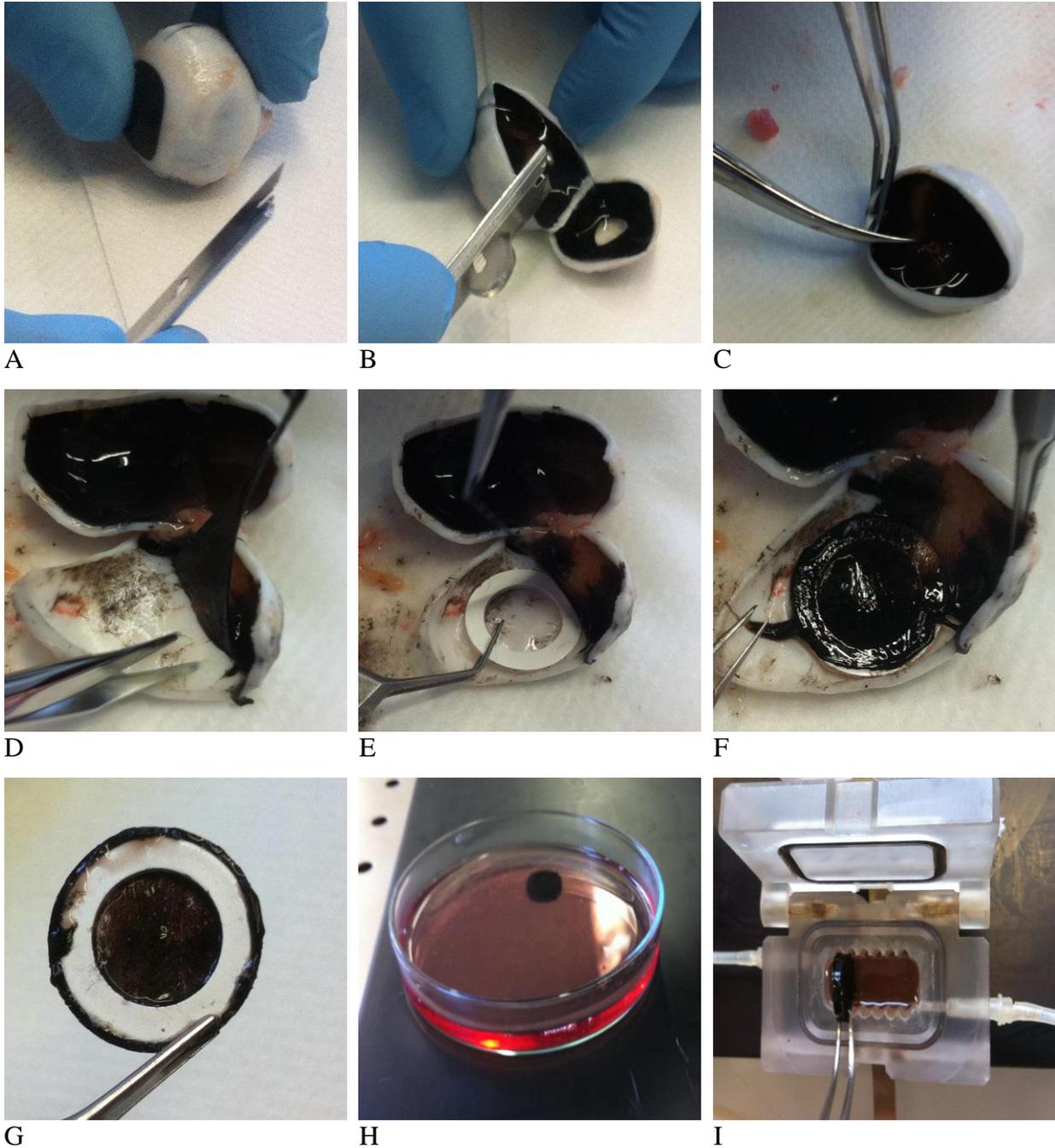


Abb. 1: Präparation der Organkultur

A+B. Freipräparation des Augapfels – Entfernung des überschüssigen Gewebes und Durchtrennung des vorderen Augapfels, C. Einschnitt des Bulbus, D. Abtrennung der RPE/Chorioidea von der Sklera, E+F. Einlegen des „*tension-ring*“, G. Auflage des „*base-ring*“ und Freipräparation, H. Platzierung im Organkulturmedium, I. Einlage des RPE/Chorioidea-Rings in die Perfusionskammer

2.2.1.3 Aufbau der Apparatur/Organkultursystem von Minuth

Das System nach Minuth gewährleistet durch den kontinuierlichen Kulturmediumsaustausch optimale Bedingungen für *in vitro* Organkulturen. (91) Die Apparatur des Organkultursystems nach Minuth setzt sich aus einer Eingangsflasche mit Medium, einer Pumpe, einer Perfusionskammer, einer Wärmeplatte und einer Ausgangsflasche zusammen. (siehe Abb. 2)



Abb. 2: Aufbau des Organkultursystems nach Minuth.

Das Organkulturmedium wird kontinuierlich in die Perfusionskammer mit den RPE/Choroidea-Organokulturen gepumpt. Die VEGF-Sekretion wird aus den Überständen mittels ELISA analysiert.

1. Flasche mit gekühltem Medium. 2. Pumpe, über die der Mediumstrom durch Silikonschläuche mit einer Geschwindigkeit von 2 ml/h in die Organokulturkammer weitergeleitet wird. 3. Perfusionskammer, die auf einer Seite mit frischem Medium versorgt wird und auf der anderen Seite das verbrauchte Medium abtransportiert. 4. Wärmeplatte unterhalb der Perfusionskammer, die eine konstante Temperatur von 37 °C in der Kammer sicherstellt. 5. Ausgangsflasche (Abfallflaschen), die über Schläuche mit der Perfusionskammer verbunden ist und das verbrauchte Medium für die weitere Analyse sammelt.

Die Choroidearinge wurden nach der Präparation in die Perfusionskammer des Organkultursystems eingebracht (siehe Abbildung 1I). Dabei waren die Ringe stets in Kontakt mit dem Organokulturmedium. Die Perfusionskammer wurde auf der rechten Seite der Wärmeplatte positioniert und das Organokulturmedium wurde vor Erreichen der Perfusionskammer in den Silikonschläuchen des Zulaufs auf der Wärmeplatte aufgewärmt. Nach dem Einschalten der Pumpe wurde die Perfusionskammer mit dem Organokulturmedium befüllt. Anschließend wurden die Ringe senkrecht in die Perfusionskammer eingebracht, so dass der Mediumstrom von der basalen zur vitrealen Seite der Choroidea durchfließen konnte. Bei der Etablierung des Organokultursystems für RPE-Zellen entdeckten Miura et al., dass durch die Präparation traumatisiertes Choroideagewebe vermehrt VEGF sezerniert, ehe es sich nach zwei Tagen wieder stabilisiert. (92) Daher wurden in der vorliegenden Arbeit die Organokulturen erst nach 48 Stunden stimuliert. Vor Beginn des Experiments wurde das

ablaufende Medium für eine Stunde in Falcon-Röhrchen gesammelt. Anschließend wurden die Überstände in Eppendorf-Röhrchen überführt und bei 4 °C und 13.000 Umdrehungen/Minute für fünf Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden bei -20 °C bis zur Analyse gelagert.

2.2.1.4 Organkulturmedium

Das Organkulturmedium versorgt die RPE-Zellen mit Nährstoffen und fungiert zugleich als pH-Puffer. Durch eine Umgebungstemperatur von 37 C° soll eine *in vivo* Situation simuliert werden. Das Organkulturmedium setzt sich zu gleichen Anteilen aus DMEM (*Dulbecco's modified Eagles Medium*) und Ham's F 12 Medium zusammen, das mit Penicillin/Streptomycin (PeSt, 1%), HEPES (25 mM), Sodium Pyruvate (110 mg/ml) und 10 % porcinem Serum (PAA) supplementiert wurde. Die Herstellung des Mediums erfolgte unter sterilen Bedingungen in einer Zellkulturbank.

2.2.1.5 Ablauf der Stimulationsversuche

Die Perfusionskammern wurden am zweiten Tag der Organkultur mit den zu untersuchenden anti-VEGF-Präparaten versetzt. Dazu wurde das Organkulturmedium mit sterilen 5 ml Spritzen aus den Perfusionskammern entfernt, in sterile Falcon-Behälter injiziert, mit Medikamenten vermischt und zurück in die Perfusionskammer überführt. Bei jedem Versuch wurde eine Perfusionskammer als Kontrollkammer bestimmt. In diese Perfusionskammer wurde kein Medikament gegeben, sie diente der Kontrolle der basalen VEGF-Ausschüttung. Vor der Zugabe der anti-VEGF-Präparate wurde das Ausgangsmittel für eine Stunde gesammelt, um eine adäquate VEGF-Ausschüttung sicherzustellen und den Ausgangswert zu bestimmen.

2.2.1.6 Stimulation mit Bevacizumab, Ranibizumab und Aflibercept

Mit dem Organkulturmodell wurden die Effekte der drei VEGF-Inhibitoren Bevacizumab, Ranibizumab und Aflibercept analysiert. Zunächst wurden Konzentrations-Wirkungskurven für die der VEGF-Ausschüttung bestimmt. Die verwendeten Konzentrationen betragen 62,5 µg /ml, 31,25 µg /ml, 15,6 µg /ml, 7,8 µg /ml, 3,9 µg /ml, 1,95 µg /ml, 0,97 µg /ml, 0,488 µg /ml, 0,244 µg /ml, 0,122 µg /ml, 0,061 µg /ml, 0,03 µg /ml, 0,015 µg /ml, 0,0076 µg /ml, 0,0038 µg /ml, 0,0019 µg /ml. Die Perfusionskammer wurden jeweils mit den oben genannten Konzentrationen der Inhibitoren befüllt. Die Überstände wurden nach 0 Stunden und 6 Stunden gesammelt. Zur Ermittlung der Dauer der VEGF-Inhibition wurden die Ansätze bis zu einer Woche nach der ersten Stimulation kultiviert. Zu definierten Zeitpunkten (0, 2, 4, 6,

12, 14, 16, 18, 24 h, 2-7 Tage) wurden die Überstände gesammelt. Bei den Experimenten wurde eine einheitliche klinisch relevante Konzentration eingesetzt (125 µg/ml). Für Aflibercept wurde zusätzlich 500 µg/ml getestet.

2.2.2 ELISA

2.2.2.1 Prinzip des (Sandwich) ELISA

Die VEGF-Konzentrationen in den Überständen der Organkulturversuche wurden mithilfe der *Enzyme linked Immunoassay*-Technik (ELISA-Technik) bestimmt. Das verwendete *Human VEGF Quantikine ELISA Kit* der Firma R&D Systems beruht auf dem Prinzip des *Sandwich* ELISAs. Dabei werden zwei Antikörper, die an verschiedene Epitope des Antigens binden, verwendet. Die 96-Loch-Mikrotiterplatten sind mit einem monoklonalen VEGF-Antikörper beschichtet. Die Überstände werden in die Wells pipettiert und zwei Stunden inkubiert. In dieser Zeit kann das in den Proben enthaltene VEGF-Antigen an die VEGF-Antikörper binden. Anschließend wird die Platte gewaschen, um die ungebundenen Bestandteile der Probe zu entfernen. Zu dem Antikörper-Antigen-Komplex wird ein zweiter VEGF-Antikörper dazugegeben, an den ein Enzym gekoppelt ist. Die Platten mit dem Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex (*Sandwich-ELISA*) werden erneut gewaschen. Nach dem zweiten Waschen wird ein Farbstoff zugesetzt, der von dem an dem Antikörper gekoppelten Enzym zu einem Reaktionsprodukt umgesetzt wird. Die entstehende Farbe ist proportional zu der Menge an gebundenem VEGF-Antigen. Die Farbreaktion wird nach 20 Minuten gestoppt. Anschließend wird die Intensität der Farbreaktion photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Um die Konzentration des VEGF-Antigens zu quantifizieren, wird eine Standardreihe mit bekannten Antigenkonzentrationen mitgeführt.

2.2.2.2 Durchführung des ELISA

Zunächst wurden die bei -20 C° gelagerten Überstände der Organkulturproben in einem Wasserbad bei 37 C° aufgetaut. Zusätzlich wurden alle Reagenzien des *Human VEGF Quantikine Elisa Kits* auf Raumtemperatur gebracht. Im ersten Schritt wurde der VEGF-Standard in RD5K-Lösung aufgelöst und für 15 Minuten geschüttelt. In der Zwischenzeit wurde die VEGF Standardreihe vorbereitet und zu diesen wurde jeweils 500 µl RD5K beigemischt. Durch die Zugabe des VEGF-Standards wurde eine Verdünnungsreihe erstellt (0, 62,5, 125, 250, 500, 1000 pg/ml). Die Löcher der Mikroplatte wurden jeweils mit 50 µl RD1W befüllt. Zu Kontrolle (0) wurde RD5K verwendet. In die übrigen Löcher der Standardreihe wurden jeweils 200 µl der Verdünnungsreihe pipettiert. Schließlich wurden die

Probenlöcher mit den aufgetauten Überständen versetzt. Alle Proben, die Standardreihe und der Leerwert wurden doppelt aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden wurden die Mikrotiterplatten mit einem Mikrotiterplatten-Dispenser gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe des zweiten VEGF-Antikörper-Enzym-Konjugats (je Loch 200 µl). Nach einer weiteren zweistündigen Inkubation wurden die Platten erneut gewaschen. Für die Färbereaktion wurden die Farbreagenzien *Color Reagent A* und *B* in einem Verhältnis von 1:1 vermischt und anschließend in die Löcher pipettiert (je 200 µl). Für die Farbreaktion wurden die Platten lichtgeschützt für 20 Minuten inkubiert, anschließend wurde in jedes Loch 50 µl Stopplösung gegeben. Zum Schluss erfolgte die photometrische Messung der Farbintensität mittels Mikrotiterphotometer und die Auswertung mit dem Software-Programm Gen5 der Firma Biotek.

2.2.3 Calcein-Test zur Bestimmung der Zellviabilität

2.2.3.1 Calcein-AM

Bei dem Calcein-Acetoxy-methylester (Calcein-AM) handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff mit einem Absorptionsmaximum von 497 nm und einem Emissionsmaximum von 517 nm. In der Zellbiologie wird Calcein-AM zum Nachweis der Zellviabilität verwendet. Calcein-AM kann die Zellmembran passieren und in die Zelle eindringen. Dort wird der Acetoxy-methyl-Gruppe enzymatisch durch Esterasen abgespalten. Das entstehende Calcein bindet intrazellulär an Calciumionen, wodurch eine starke grüne Fluoreszenz entsteht. Da abgestorbene Zellen keine Esterasen bilden und somit kein Calcium bindendes Calcein erzeugen, werden nur lebende Zellen markiert. (92, 93)

2.2.3.2 Durchführung des Calcein-Tests

Zur Vorbereitung des Calcein-AM wurde Calcein in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, aliquotiert und lichtgeschützt bei -20 C° gelagert. Nach jedem Organkulturversuch wurde ein Calcein-Test durchgeführt, um die Viabilität der RPE-Zellen zu beurteilen. Hierzu wurden 4 µl Calcein je ml Organkulturmedium zugegeben. Die Ringe der Perfusionskammer wurden mit 2 ml Calcein-Organokulturmedium Lösung behandelt. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte mit den Ringen in einem Brutschranke bei 37 C°, 5% CO₂ und gesättigtem Wasserdampf für 20 Minuten inkubiert. Danach wurden die Ansätze zweimal mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Schließlich wurde vorgewärmtes Organokulturmedium zugegeben, um das Überleben der Zellen während des Mikroskopierens

zu sichern. Die Viabilität der Zellen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop unter Blaufilterlicht beurteilt und dokumentiert. Die Bilder wurden mit dem Softwareprogramm AxioCam MRc 5 (Zeiss) digitalisiert.

2.2.4 Statistik

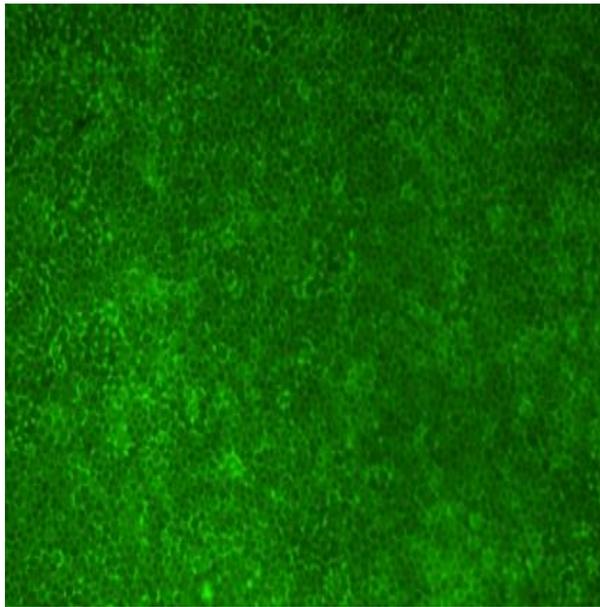
Alle Experimente wurden mindestens dreimal wiederholt. Die abgebildeten Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen der durchgeführten Experimente. Die Daten wurden mit dem *Student's-t-Test* verglichen, wobei eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen wurde. Alle Berechnungen wurden mit Microsoft Office Excel durchgeführt.

3 Ergebnisse

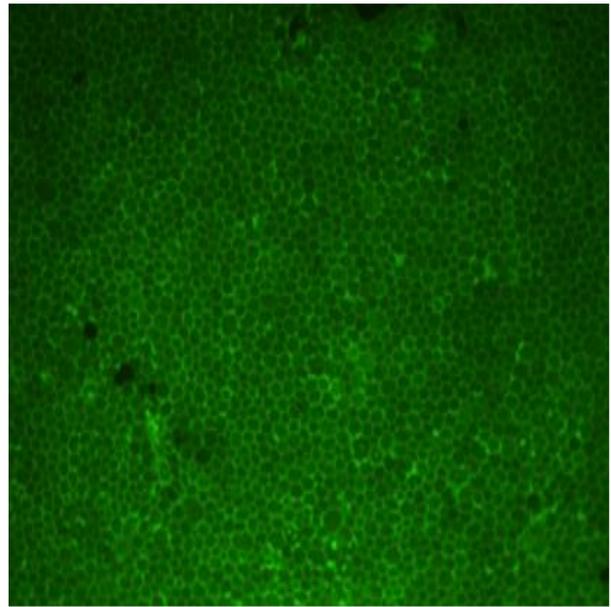
3.1 Calcein-Färbung

Mit der Calcein-Färbung wurde nach jedem Versuch die Viabilität der RPE-Zellen untersucht. Diese Überprüfung der Zellviabilität sollte sicherstellen, dass eine abnehmende VEGF-Konzentration nicht durch abgestorbene Zellen verursacht wurde, sondern durch die VEGF-Inhibitoren. In allen Versuchen zeigten nahezu alle Zellen eine grüne Fluoreszenz als Zeichen der Umsetzung des Calcein-AM durch aktive Esterasen in Chelatkomplexe aus Calcein und Calcium-Ionen.

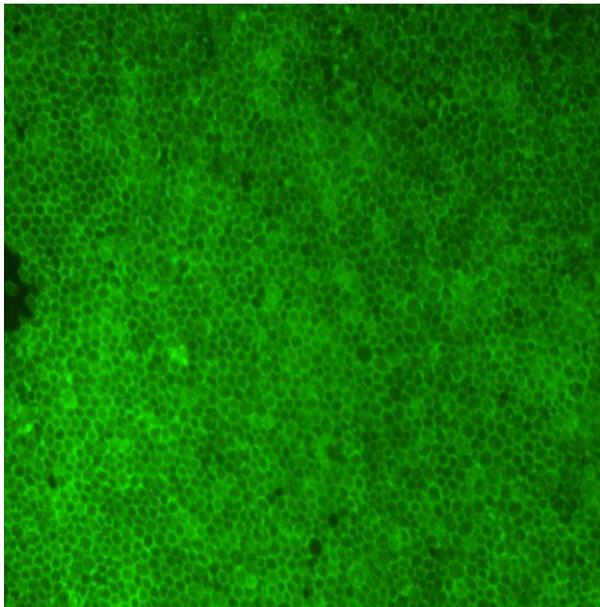
Die grüne Fluoreszenz der RPE-Zellen war im Mikroskop gut beurteilbar. Sowohl bei den 24-stündigen Verdünnungsversuchen als auch bei den Zeitreihen (maximal 7 Tage) zeigten Versuchsansätze im Vergleich zur Kontrolle keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Zellviabilität.



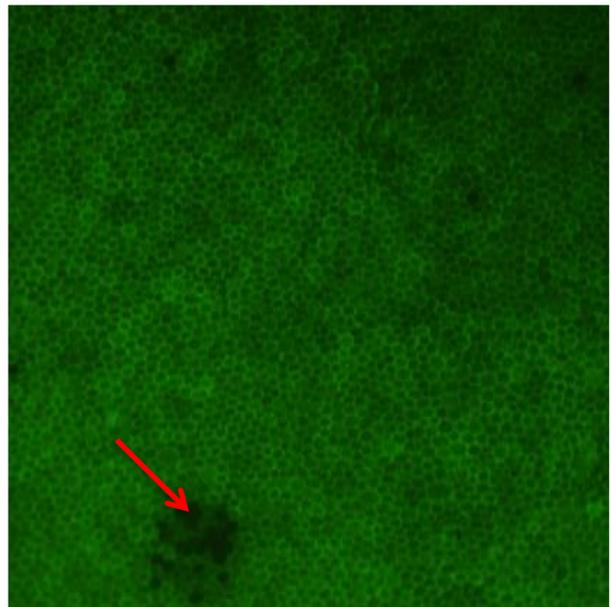
A



B



C



D

Abb. 3: Calcein-Färbung: Beispielaufnahmen der Kontrolle und der Ansätze mit VEGF-Inhibitoren. (Aufnahmen in 20-facher Vergrößerung, durchgeführt jeweils am 7. Tag nach der Stimulation)
Die Calcein-Färbung überprüft die Viabilität der RPE-Zellen. Grün fluoreszierende Zellen sind viabel. Abgestorbene Zellen nehmen kein Calcein auf und sind als schwarze Punkte (roter Pfeil) zu erkennen. A. Kontrolle, B. Bevacizumab, C. Ranibizumab, D. Aflibercept

3.2 Minimal wirksame Konzentrationen der VEGF-Inhibitoren

In dieser Versuchsreihe wurden die minimalen Konzentrationen von Aflibercept, Ranibizumab und Bevacizumab für eine erfolgreiche Inhibition von VEGF im Überstand der

Choroidea/RPE-Zellen untersucht. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe ausgehend von 62,5 µg/ml VEGF-Inhibitor getestet. Die Überstände wurden 0 und 6 Stunden nach der Stimulation gesammelt.

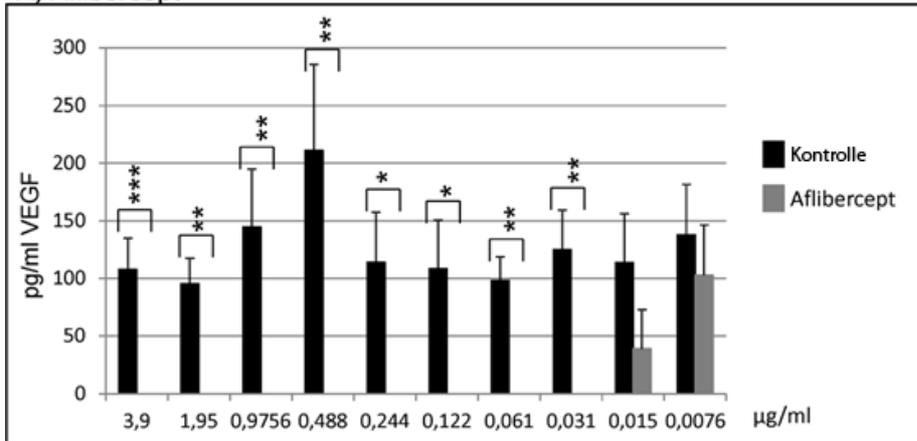
Nach 6 Stunden inhibierten die drei verwendeten VEGF-Inhibitoren die VEGF-Freisetzung bis zu einer Konzentration von 3,9 µg/ml vollständig. Die minimal notwendige Konzentration von Aflibercept für eine vollständige und statistisch signifikante (im Vergleich zur Kontrolle) Inhibition der VEGF-Freisetzung betrug 0,031 µg/ml. Die Konzentration 0,015 µg/ml ($38,8 \pm 33,8$ pg/ml VEGF) und 0,0076 µg/ml ($102,6 \pm 43,8$ pg/ml) ergaben dagegen keine statistisch signifikanten Unterschiede zur Kontrolle (Abb. 4 A).

In den Ansätzen mit Ranibizumab konnte mit Ausnahme einer geringen VEGF-Menge bei einer Konzentration von 1,95 µg/ml ($3,9 \pm 6,7$ pg/ml) eine vollständige Inhibition der VEGF-Freisetzung bis zu einer Konzentration von 0,244 µg/ml erreicht werden. Ab einer Konzentration von 0,122 µg/ml war VEGF im Überstand ($19,4 \pm 17,3$ pg/ml) nachweisbar. Verglichen mit der Kontrolle konnte Ranibizumab die VEGF-Freisetzung einschließlich einer Konzentration von 0,031 µg/ml (0,061 µg/ml, $11,1 \pm 14,5$ pg/ml; 0,031 µg/ml, $37,1 \pm 1,9$ pg/ml) signifikant inhibieren, bei niedrigeren Konzentrationen (0,015 µg/ml, $48,5 \pm 13,2$ pg/ml; and 0,0076 µg/ml, $40,7 \pm 14,5$ pg/ml) war der Unterschied nicht mehr signifikant (Abb. 4 B).

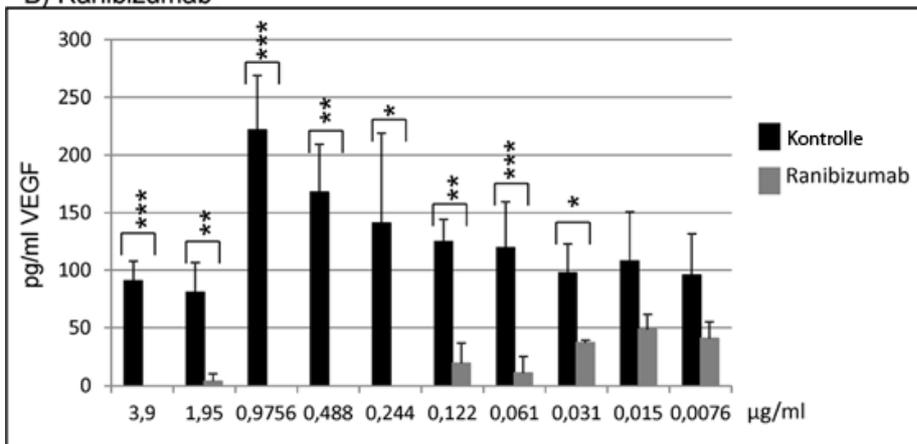
Dagegen zeigte Bevacizumab eine weniger ausgeprägte Inhibition der VEGF-Freisetzung. Ab einer Konzentration von 1,95 µg/ml konnte VEGF in den Überständen detektiert werden ($11,9 \pm 20,7$ pg/ml). Die Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle waren bis zu einer Konzentration von 0,244 µg/ml ($39,9 \pm 9,9$ pg/ml) und nochmals bei der Konzentration 0,061 µg/ml ($70,5 \pm 29,3$) signifikant (Abb. 4 C).

Zum Vergleich der Potenz der drei Inhibitoren wurde die VEGF-Inhibition in % der unbehandelten Kontrolle gegen die Wirkstoff-Konzentration aufgetragen (Abb. 5). Ein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich der Wirksamkeit bestand zwischen Aflibercept und Ranibizumab bei einer Konzentration von 0,031 µg/ml ($p < 0,001$). Ranibizumab und Aflibercept waren signifikant wirksamer als Bevacizumab (Aflibercept: 0,244 µg/ml $p < 0,01$; 0,122 µg/ml $p < 0,01$; 0,061 µg/ml $p < 0,01$; 0,031 µg/ml $p < 0,05$; Ranibizumab 0,244 µg/ml $p < 0,01$; 0,122 µg/ml $p < 0,05$; 0,061 µg/ml $p < 0,01$).

A) Aflibercept



B) Ranibizumab



C) Bevacizumab

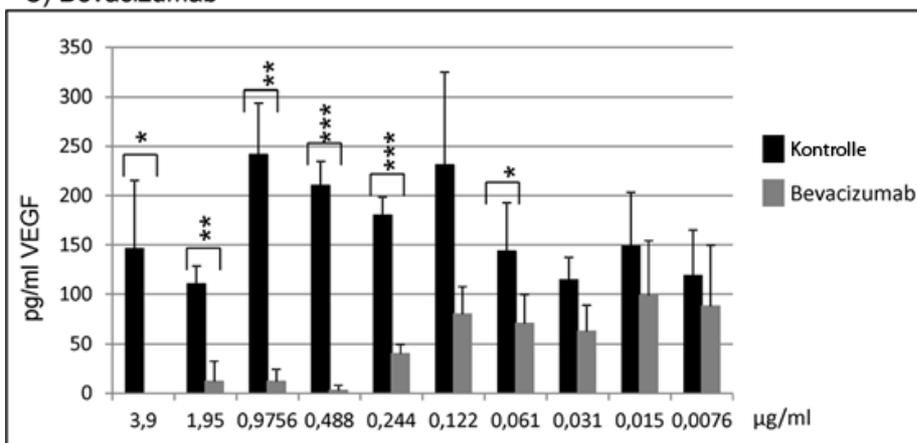


Abb. 4: Minimale Konzentration für die Inhibition der VEGF-Freisetzung nach sechs Stunden (94)
 Organkulturen wurden mit VEGF-Inhibitoren behandelt. Die VEGF-Konzentration wurden in den Überständen nach sechs Stunden bestimmt. A. Aflibercept zeigte eine komplette und statistisch signifikante (Vergleich zur Kontrolle) Inhibition der VEGF-Freisetzung bis zu einer Konzentration von 0,031 µg/ml. B. Ranibizumab zeigte eine vollständige Inhibition der VEGF-Freisetzung (Ausnahme: Nachweis einer geringen VEGF-Menge bei 1,95 µg/ml) bis zu einer Konzentration von 0,244 µg/ml. Statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle bestanden bis einschließlich 0,061 µg/ml. C. Bei Bevacizumab konnte ab einer Konzentration von 1,95 µg/ml im Überstand VEGF detektiert werden. Jedoch war die nachgewiesene VEGF-Konzentration (verglichen mit der Kontrolle) bis 0,244 µg/ml und nochmal bei 0,061 µg/ml statistisch signifikant. Students t-test: “+” p<0,05; “++” p<0,01, “+++” p<0,001

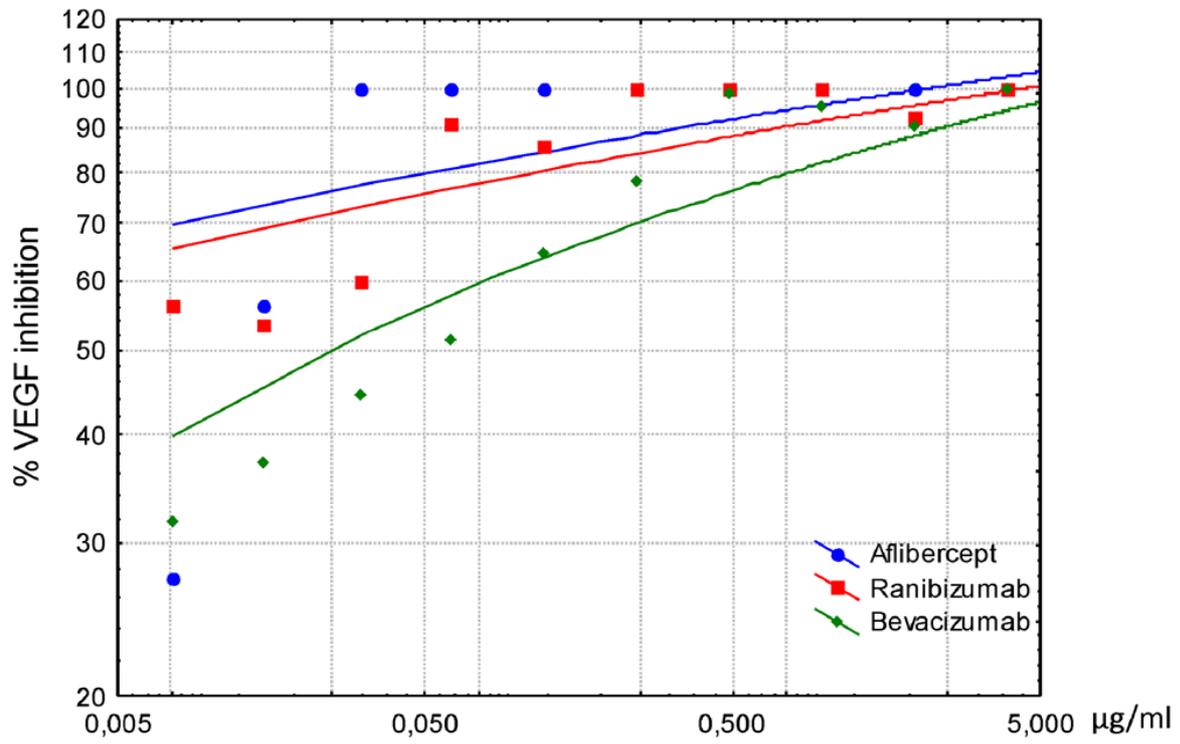


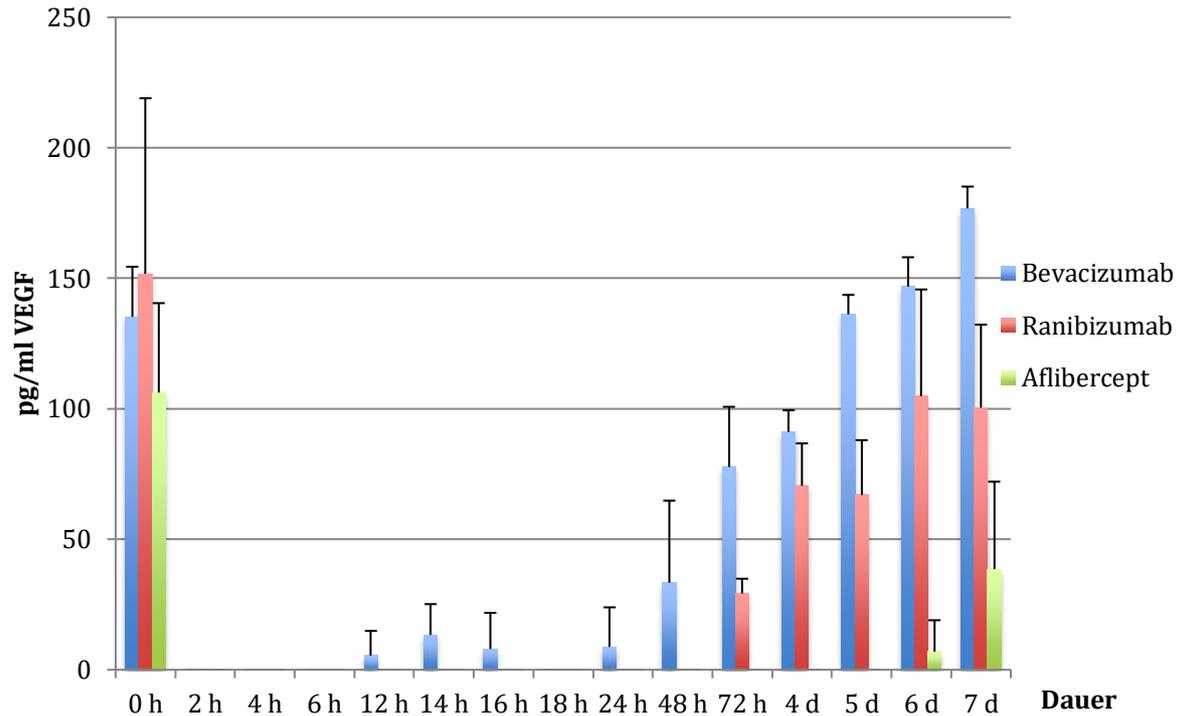
Abb. 5: Vergleich der Potenz der drei Anti-VEGF-Präparate. Logarithmische Darstellung der prozentualen Inhibition der VEGF-Freisetzung im Vergleich zur Kontrolle (94)

3.3 Dauer der VEGF-Inhibition

In dieser Versuchsreihe wurden die drei Anti-VEGF-Präparate in klinisch relevanten Konzentrationen auf die Organkultur gegeben und die VEGF-Konzentration im Überstand zu definierten Zeitpunkten (2, 4, 6, 12, 14, 16, 18, 24 Stunden, 2 bis 7 Tage) untersucht. Aflibercept wurde in den Konzentrationen 0,5 mg/ml und 0,125 mg/ml eingesetzt, Bevacizumab und Ranibizumab wurden in einer Konzentration von 0,125 mg/ml getestet. Jeder Versuch wurde mindestens dreimal durchgeführt. Alle drei Präparate waren in einer Konzentration von 0,125 mg/ml in der Lage das VEGF im Überstand bis zu 24 Stunden vollständig zu blockieren. Ab 48 Stunden Inkubation unterschied sich die Wirksamkeit der Präparate.

Aflibercept zeigte eine signifikante Inhibition der VEGF-Freisetzung bis zu 5 Tagen, ab diesem Zeitpunkt konnte geringe Mengen an VEGF nachgewiesen werden (6 Tage: $6,9 \pm 15,0$ pg/ml), (7 Tage: $38,6 \pm 25,0$ pg/ml). Ranibizumab erzielte eine signifikante VEGF-Inhibition bis 72 Stunden ($29,2 \pm 5,7$ pg/ml) bei einer kompletten Inhibition bis 48 Stunden. In den Ansätzen mit Bevacizumab war VEGF bereits 12 Stunden nach der Stimulation detektierbar ($5,5 \pm 9,4$ pg/ml). Der Wirkstoff verlor sein Inhibitionspotential ab 48 Stunden ($33,4 \pm 31,4$ pg/ml), wobei im Vergleich zur Kontrolle signifikante Unterschiede bis zu 4 Tagen bestanden ($91,1 \pm 9,3$ pg/ml). Aflibercept zeigte einen signifikant stärkeren Effekt als Ranibizumab nach 72 Stunden, 4 Tagen, 5 Tagen, 6 Tagen (alle $p < 0,001$) und 7 Tagen ($p < 0,01$) und war signifikant effektiver als Bevacizumab nach 14 Stunden ($p < 0,05$), 48 Stunden ($p < 0,05$), 72 Stunden ($p < 0,001$), 4 Tagen ($p < 0,001$), 5 Tagen ($p < 0,001$), 6 Tagen ($p < 0,001$) und 7 Tagen ($p < 0,001$).

Zusätzlich wurde in dieser Versuchsreihe Aflibercept in einer Konzentration von 500 µg/ml getestet. Dies entspricht der klinisch eingesetzten Konzentration. Der erzielte Effekt war vergleichbar mit den Ansätzen mit 125 µg/ml Aflibercept. An 5 Tagen war kein VEGF detektierbar, am sechsten ($6,2 \pm 15,3$ pg/ml) und siebten Tag ($11,2 \pm 25,0$ pg/ml) traten geringe Mengen VEGF auf. Zu allen Zeitpunkten bestand ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle.



| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|--------------------------|
| aflibercept | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | Differenz zur Kontrolle |
| ranibizumab | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | |
| bevacizumab | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | + | + | - | - | - | |
| | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | | | | | |
| ranibizumab | - | - | - | - | - | - | - | - | - | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | Differenz zu Aflibercept |
| bevacizumab | - | - | - | - | + | - | - | - | + | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | |
| | | | | | | | | | | + | + | + | + | + | |
| bevacizumab | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | ++ | - | + | Differenz zu Ranibizumab |

Abb. 6: VEGF-Langzeit-Inhibition durch Aflibercept, Ranibizumab und Bevacizumab (125 µg/ml). (94)

4 Diskussion

Die feuchte Form der AMD ist eine belastende Erkrankung für ältere Menschen, die bei einem progredienten Verlauf zur Erblindung führen kann. (95) Die intravitreale Applikation von VEGF-Antagonisten gilt aktuell als Goldstandard für die Behandlung der feuchten Form der AMD. In der vergangenen Dekade wurde eine Reihe von Anti-VEGF-Präparaten entwickelt, um einer Progredienz dieser Erkrankung und einer möglichen Erblindung vorzubeugen. (96) Aktuell sehen sich die Ophthalmologen mit der Frage konfrontiert, welches dieser Präparate am effizientesten und am risikoärmsten ist. Zusätzlich spielen auch ökonomische Aspekte bei der Wahl der Medikamente eine Rolle.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die zurzeit am häufigsten eingesetzten VEGF-Inhibitoren, Bevacizumab, Ranibizumab und Aflibercept, hinsichtlich ihrer Effizienz und Wirkdauer in einem *in vitro* Organkultursystem zu testen. (91) Das verwendete RPE-Aderhautsystem wurde 2010 von Miura et al. entwickelt und als Testsystem für die VEGF-Inhibition etabliert. (92, 97) Klettner et al. verwendeten das Modell, um die VEGF-Inhibition durch Ranibizumab, Bevacizumab und Pegaptanib zu vergleichen.

Bislang gibt es keine direkten Experimente mit diesem *in vitro* Organkulturmodells, in denen Aflibercept, Bevacizumab und Ranibizumab verglichen wurden. Die bis dato durchgeführten Experimente erfolgten meistens in Zellkultursystemen, in denen die VEGF-Sekretion von RPE-Zellen bestimmt wurden. Die Zellkulturmodelle enthalten ausschließlich RPE-Zellen, so dass potentiell existierende regulative Faktoren der umliegenden Gewebe wegfallen. (92) RPE-Zellen stehen jedoch, wie in der Einleitung beschrieben, in engem Austausch mit der Choroidea. RPE-Zellen versorgen die Photorezeptoren über die Kapillarfenestrierungen der Choriokapillaris mit Sauerstoff. VEGF dient als Schlüsselmolekül bei der Bildung dieser Kapillarstrukturen. In Zellkulturversuchen können diese umliegenden Strukturen nicht mitberücksichtigt werden. Weiter schüttet auch die Choroidea VEGF aus. (34, 98) Im Gegensatz zu anderen Zellkultursystemen bietet das Organkultursystem den Vorteil, dass es durch die Zusammensetzung aus RPE/Choroideagewebe ein funktionelles System darstellt, bei dem der kontinuierliche Strom des Organkulturmediums durch die Perfusionskammern eine realitätsnahe *in vivo* Gegebenheit simuliert und eine genauere Bestimmung des VEGF ermöglicht. (99)

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Gewinnung des RPE/Choroidea-Gewebe Organkulturen vom Schwein verwendet. Unter den Nicht-Primatenaugen weist das

Schweineauge die größte anatomische und physiologische Ähnlichkeit zum menschlichen Auge auf. Nicht nur die Morphologie und die Größe des menschlichen Auges sind vergleichbar mit dem Schweineauge, sondern auch die retinale sowie choroideale Blutversorgung sind in beiden Spezies sehr ähnlich. (99, 100) Die Größenähnlichkeit erleichtert die chirurgischen Handgriffe während der Präparation und erlaubt die Verwendung eines normalen chirurgischen Präparationsbesteckes. (100) Das Mausmodell dagegen ist zur Bestimmung der VEGF-Inhibition ungeeignet, da Bevacizumab und Ranibizumab Maus-VEGF nur unzureichend binden. (101)

Histologisch besteht die Retina beim Schwein und beim Menschen aus zehn Schichten vergleichbarer Schichtdicke. Da porcine und humane RPE-Zellen die gleichen Funktionen besitzen, (102) sollte sich auch die VEGF-Sekretion unter physiologischen sowie pathologischen Bedingungen entsprechen. Daher sind die mit dem porcinen System erhobenen Ergebnisse zur anti-VEGF-Therapie potentiell auch von klinischer Relevanz.

Die Verwendung von genetisch unterschiedlichen Schweineaugen mit potentiell unterschiedlichen VEGF-Sekretionen spiegelt die *in vivo* Situation in der Klinik besser wider als der Einsatz von Inzucht-Mausstämmen oder von Zellen aus einer genetisch identischen Zellreihe.

Dennoch muss die Übertragbarkeit auf Menschaugen der an Tiermodellen erzielten Studienergebnisse mit Vorsicht betrachtet werden. (99) Die Ergebnisse des in dieser Arbeit verwendeten porcinen Organkulturmodells korrespondieren jedoch gut mit den an menschlichen Zellen veröffentlichten Daten. (99)

Bei den in dieser Dissertation durchgeführten Experimenten sollten drei VEGF-Inhibitoren hinsichtlich ihrer Effizienz miteinander verglichen werden. Dazu wurde die Dauer der VEGF-Inhibition in klinisch relevanter Konzentration und die minimale Konzentration für eine vollständige Inhibition der VEGF-Freisetzung bestimmt.

Bei den Versuchen zur Bestimmung der minimalen Anti-VEGF-Präparat-Konzentration zur vollständigen Inhibition des ausgeschütteten VEGF-A wurden die Überstände 6 Stunden nach Zugabe der Inhibitoren in die Perfusionskammern gesammelt und ausgewertet. Bevacizumab neutralisierte das ausgeschüttete VEGF bis zu einer Konzentration von 3,9 µg/ml vollständig. Ranibizumab dagegen bis zu einer Konzentration von 0,244 µg/ml. Aflibercept erweis sich als der potenteste Wirkstoff, er blockierte VEGF bis zu einer Konzentration von 0,031 µg/ml. Demnach war Aflibercept gegenüber Ranibizumab und Bevacizumab eindeutig überlegen, wobei Bevacizumab am schlechtesten abschnitt.

Um das klinisch positive Affektprofil von Aflibercept besser zu verstehen, ist ein kurzer Überblick über die Angiogenese und der Beteiligung von VEGF essentiell.

Die Angiogenese ist ein komplexer Prozess, bei dem aus bestehenden Blutgefäßen neue entstehen. Sie spielt beispielsweise im Wundheilungsprozess bei Erwachsenen eine entscheidende Rolle. Im pathologischen Kontext ist die Angiogenese ein wichtiges Kennzeichen vieler Tumoren sowie der feuchten Form der AMD. (103, 104, 105) Pro-angiogenetische Faktoren wie VEGF spielen bei der Angiogenese eine Schlüsselrolle. Im humanen System besteht die VEGF-Familie aus VEGF A, B, C, D sowie PlGF. (43, 106)

VEGF-B und PlGF spielen im Gegensatz zu VEGF-A für die physiologische Angiogenese keine Rolle. Im pathologischen Kontext sind dagegen VEGF-B, PlGF und VEGF-A von Bedeutung. (83, 97, 107, 108) VEGF-C und D binden mit hoher Affinität an den VEGFR-3, der an der Oberfläche von Lymphgefäßen lokalisiert ist und an der Lymphangiogenese beteiligt ist. (109) Bereits 2003 wiesen Rakic et al. nach, dass nicht nur der VEGF-A, B sondern auch *Placental derived Growth Factor* (PlGF) bei der pathologischen Gefäßneubildung der CNV eine Rolle spielt. (110)

Die biologische bzw. pharmakologische Aktivität der VEGF-Inhibitoren wurde in zahlreichen Studien kontrovers diskutiert. Laut Papadopoulos et al. weist Aflibercept im Gegensatz zu Ranibizumab und Bevacizumab nicht nur eine höhere Bindungsaffinität für VEGF-A Rezeptoren auf, sondern auch gegenüber VEGF-B und PlGF. Die Autoren hielten diese breite Wirkung für die Ursache der besseren Wirksamkeit von Aflibercept gegenüber den restlichen Anti-VEGF-Präparaten. (83) Papadopoulos et al. bestimmten die pharmakologischen Eigenschaften von Bevacizumab, Ranibizumab und Aflibercept unter *in vitro* Bedingungen und verwendeten verschiedene humane, murine sowie cuniculare VEGF-Isoformen und Rezeptoren. Sie erfassten die Wechselwirkungen zwischen dem VEGF-Liganden und den VEGF-Inhibitoren mit Hilfe der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie. Über unterschiedliche VEGF-Liganden-Konzentrationen bestimmten sie die Dissoziations- (K_d) und Assoziationsgeschwindigkeitskonstante (K_a) von Bevacizumab, Ranibizumab und Aflibercept. Weiter verwenden sie den KineXa Gleichgewichtstest zur Bestimmung der Dissoziationskonstante der einzelnen Präparate.

Auch Yu et al. bestimmten die pharmakologischen Eigenschaften von VEGF-Inhibitoren anhand Zellkulturen und eines bovinen retinalen mikrovaskulären Endothelzell-Proliferationsassays (BREC) und fanden im Vergleich zu Papadopoulos et al. teilweise unterschiedliche Ergebnisse. Während die Experimente von Papadopoulos et al. auf eine sehr niedrige Dissoziationskonstante des Aflibercept hinwiesen und seine Bindungsaffinität zu

VEGF-165-Isoform im Vergleich zu den Ranibizumab- bzw. Bevacizumab-Werten um den Faktor 77 bzw. 256-fach höher lagen, fanden Yu et al für Aflibercept und Ranibizumab ähnliche Bindungsaffinitäten. Beide Präparate zeigten eine stärkere Wirkung als Bevacizumab. (83, 85) Bemerkenswert ist, dass beide Arbeitsgruppen mit unterschiedlichen Ligandenkonzentrationen gearbeitet haben, was möglicherweise die diskrepanten Ergebnisse erklären könnte. Des Weiteren sind *in vitro* Bedingungen nicht uneingeschränkt auf eine *in vivo* Situation übertragbar. Keiner der beiden Arbeitsgruppen untersuchte die VEGF-Inhibition in ein ophthalmologisch relevantem System. Außerdem waren die verwendeten VEGFs von unterschiedlicher Herkunft (human, murin, bovin etc.), was die Ergebnisse ebenfalls beeinflusst haben könnte.

Aus den vorliegenden Ergebnissen bezüglich der minimal wirksamen Konzentration geht ebenfalls hervor, dass die biologische Effektivität von Aflibercept als besser einzuordnen ist, als die von Ranibizumab und Bevacizumab, wobei Letzteres am schlechtesten abschnitt. Wenn Aflibercept auch in geringen Konzentrationen wirksam ist, können im Auge nach weitgehender Elimination auch Restmengen wirksam sein und der feuchten AMD entgegenwirken.

Die VEGF-Inhibition dauerte beim Einsatz klinisch relevanter Konzentrationen der anti-VEGF-Präparate bis zu 7 Tage. Bevacizumab zeigte die schlechteste Langzeitwirkung (24 Stunden), gefolgt von Ranibizumab (48 Stunden) und Aflibercept (5 Tage vollständige Inhibition, nach 6 Tagen geringe VEGF-Mengen nachweisbar). Dabei sollte erwähnt werden, dass in dem Organkulturmodell nach einmaliger Applikation der Anti-VEGF-Präparate, diese durch den stetigen Zu- und Abfluss des Organkulturmediums langsam ausgewaschen werden. Dies unterstreicht die hohe Potenz des Aflibercept, da bereits geringe Mengen suffizient waren, um das synthetisierte VEGF für 5 Tage erfolgreich zu blockieren. Fraglich bleibt jedoch, ob sich die ausgeprägte Potenz von Aflibercept auch in klinischen Studien wiederfinden lässt.

Mit der offiziellen Zulassung von Aflibercept – durch die FDA im November 2011 – wurden eine Reihe von patientenorientierten Studien erfasst. Hierbei wurden Patienten mit der feuchten Form der AMD, die vorher mit Ranibizumab und Bevacizumab behandelt worden waren, mit Aflibercept behandelt. Diesen Studien zufolge erwies sich die intravitreale Injektion des Aflibercept insbesondere bei therapierefraktären Patienten, die eine Tachyplaxie gegenüber Ranibizumab und Bevacizumab entwickelt hatten, als wirksam. (111) Die intravitrealen Applikationsabstände konnten verlängert werden, ohne dass es zu einer Progredienz des Visusverlustes kam. (112, 113, 114)

Neuere retrospektive und prospektive klinische Vergleichsstudien zwischen Ranibizumab und Aflibercept weisen auf die bessere Effizienz und Verbesserung der Visus unter Aflibercept hin. (115, 116, 117) In den VIEW-1 und -2-Studien wurden Aflibercept und Ranibizumab an AMD erkrankten Patienten über 96 Wochen verglichen. Aflibercept erwies sich mit ähnlichen Sehschärfeergebnissen als vergleichbar effektiv wie Ranibizumab, wobei durchschnittlich fünf intravitreale Injektionen pro Jahr weniger notwendig waren. (90, 118) Die Ergebnisse dieser klinischen Studien stehen im Einklang mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit. Aflibercept konnte in dem verwendeten Modell die VEGF-Ausschüttung mehr als doppelt so lange Zeitraum inhibieren wie Ranibizumab, was gut zur möglichen Prolongation der intravitrealen Applikationsabstände im klinischen Setting passt.

Im Vergleich zwischen Ranibizumab und Bevacizumab konnte Ranibizumab die VEGF-Ausschüttung über einen längeren Zeitraum inhibieren als Bevacizumab. Laut CATT Studiengruppe (*Comparison of Age-related macular Degeneration Treatments Trials*) zeigen Ranibizumab und Bevacizumab dagegen eine ähnliche Wirksamkeit. (119) Bereits 2008 beschrieben Klettner et al. im gleichen Organkulturmodell eine ähnliche Potenz von Ranibizumab und Bevacizumab. (97) Die Effizienz von Aflibercept übertrifft jedoch den Effekt beider Anti-VEGF-Präparate eindeutig.

Da zur Behandlung der feuchten Form der AMD die anti-VEGF-Medikamente über einen längeren Zeitraum eingesetzt werden, stellt sich die Frage nach möglichen Nebenwirkungen und Schäden für das Auge. Die Choriokapillaris ist für etwa zwei Drittel der Blutversorgung der Retina (einschließlich der Photorezeptoren) verantwortlich. VEGF spielt auch in der physiologischen Angiogenese eine wichtige Rolle. Eine Beeinträchtigung der Choriokapillaris durch eine VEGF-Inhibition könnte auf lange Sicht zu einer Minderversorgung der Retina und somit zu einer Atrophie und zu einem Visusverlust führen. (120) Die potentiellen negativen Folgen einer langfristigen VEGF-Inhibierung wurden bereits in zahlreichen Studien untersucht. Um die physiologische VEGF-Aktivität in der Retina/Choriokapillaris des Erwachsenen sowie die Folgen einer VEGF-Deletion an den RPE-Zellen zu untersuchen, deletierte die Forschungsgruppe um Kurihara et al. mittels Cre/loxP Technologie das VEGF-A Allel in Mäusen. Elektronenretinographische Analysen belegen, dass diese VEGF-A-Inaktivierung innerhalb von drei Tagen zu erheblichen retinalen Dysfunktionen, insbesondere im Bereich der Zapfen, die beim Menschen für das scharfe Sehen in der zentralen Retina verantwortlich sind, führte. Die Dysfunktion der Zapfen-Photorezeptoren nach der VEGF-A-Inaktivierung dauerte mindestens 7 Monate an. Demnach ist eine VEGF-Ausschüttung durch RPE-Zellen essenziell für die Aufrechterhaltung der Choriokapillaren und der Zapfen-

Photorezeptoren. (120) Auch St. Geniez et al. berichteten von einer geographischen Atrophie und Visusminderung nach VEGF-Inaktivierung in Mäusen. (121) In den Experimenten wurden Mäuse verwendet, die nur die VEGF-188-Isoform (nichtlösliche Isoform) exprimierten. Im Alter von 7 Monaten zeichnete sich in den Mäusen eine fortschreitende Degeneration der Choriokapillaren (Atrophie, Dysfunktionen der RPE und Bruch'schen Membran, Photorezeptorapoptose) ab. Die Autoren führten die Experimente in Abwesenheit der löslichen VEGF-Isoformen durch, da diese Isoformen durch die Bruch'sche Membran diffundieren und bei der Bildung der Choriokapillaren eine wichtige Rolle spielen. (121) Ford et al. fanden, dass eine verlängerte VEGF-Neutralisation mit Bevacizumab unter *in vitro* Bedingungen im murinen System eine Apoptose der Photorezeptorenaußensegmente sowie Reduktion der Choriokapillarfenestrierungen zur Folge hatte. (122)

Experimentelle Daten bezüglich der möglichen Nebenwirkungsprofile sind aber auch kontrovers. Laut Ueno et al. hat eine VEGF-Inhibierung bis zu 7 Monaten in Tet/IRBP/sVEGFR1Fc Mäusen keinen negativen Einfluss auf retinale Strukturen und somit auch nicht auf die Photorezeptoren und auf den Visus. (123)

Auch diverse klinische Studien wiesen bereits auf mögliche Nebenwirkungen der Anti-VEGF-Präparate bei langjährigem Einsatz hin. In der ANCHOR-Studie wurde die klinische Effizienz von Ranibizumab anhand der Sehschärfe sowie den anatomischen Begebenheiten in den behandelten Augen mittels OCT (optische Kohärenztomographie) nachgewiesen. Trotz erster Erfolge kam es bei einigen Patienten zu einer Makulaatrophie und Visusverschlechterung (9% der MARINA und 10% der ANCHOR). (124)

In der SEVEN-UP Studie, einer Folgeanalyse Studie der ANCHOR- und MARINA-Studien, zeigte 98 % der Patienten, die 7 Jahre lang eine Anti-VEGF-Therapie (Ranibizumab) erhielten, eine Progression der Makulaatrophie. (125)

Klettner et al. überprüften die drei Anti-VEGF-Präparate auf ihre Toxizität, auf die Phagozytose durch RPE sowie auf ihren Einfluss auf die Wundheilung. Aflibercept (125 µg/ml, 500 µg/ml) erwies sich als nicht toxisch, wurde aber von den RPE-Zellen aufgenommen, hatte aber einen negativen Einfluss auf die Phagozytose der RPE-Zellen und verlangsamte den Wundheilungsverlauf (126) Die Phagozytose spielt bei der Aufrechterhaltung des Sehvermögens durch Abstoßung von Photorezeptoren und deren Abbau in den RPE-Zellen eine wichtige Rolle. (127) Die Folgen einer defekten Phagozytose der RPE-Zellen in RCS-Ratten (*Royal College of Surgeons*) waren eine progressive Retinadegeneration und ein zunehmender Visusverlust. (128)

Laut Ranjbar et al. beeinflusst die intrazelluläre Aufnahme von Aflibercept und Bevacizumab den intrazellulären VEGF-A-Mechanismus in RPE-Zellen, wobei Bevacizumab aufgrund seiner möglichen Interaktion mit dem Fc-Rezeptor im Falle einer oxidativen Stresssituation einen besseren Schutzmechanismus bietet als Aflibercept. (129) Insgesamt sollte gerade wegen der hohen Effizienz des Aflibercept, ein klinischer Einsatz engmaschig kontrolliert werden, um mögliche Nebenwirkungsprofile des Präparats rechtzeitig zu erkennen.

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Ergebnisse mit dem Organkulturmodell, dass Aflibercept eine gute Alternative zu Ranibizumab und Bevacizumab sein kann und sich in seinem Wirkungsprofil als effizienter darstellt. Die Ergebnisse dieses *in vitro* Modells stehen mit den Ergebnissen von Untersuchungen zu den pharmakokinetischen Eigenschaften des Aflibercept in Einklang. Insbesondere die erhöhte VEGF-Inhibierung über einen längeren Zeitraum durch klinische Konzentration spricht für die Effektivität von Aflibercept. Die dadurch mögliche Verlängerung der intravitrealen Injektionsabstände könnte die Patientenzufriedenheit und *-compliance* erhöhen.

Auf der anderen Seite muss betont werden, dass die besseren pharmakokinetischen Eigenschaften (stärkeren Bindungsaffinität zu VEGF-Subgruppen) von Aflibercept auch nachteilig sein kann. Besorgniserregend sind die möglichen Nebenwirkungen des Aflibercept (und auch der Ranibizumab und Bevacizumab). Dazu zählen Schädigungen an den RPE Zellen und eine daraus resultierende Photorezeptoratrophy. Differenziert werden müssen dabei die Nebenwirkungsursachen der Anti-VEGF-Präparate, denn trotz einer VEGF-Blockierung ist es möglich, dass die Makulaatrophy aufgrund der Grunderkrankung und nicht aufgrund der Nebenwirkungen einer Anti-VEGF-Medikation fortschreitet. Die bis dato durchgeführten Untersuchungen zur Behandlung der feuchten Form der AMD zielen mehrheitlich auf die Inhibierung der Angiogenese ab. Die fehlende Selektierbarkeit zwischen der Beeinflussung der gesunden und pathologischen Angiogenese kann zu besorgniserregenden Nebenwirkungen führen. Nur wenige Ansätze konnten selektiv die pathologische Angiogenese an der Retina der Mäuse hemmen. Eine Substanz mit derartigen Eigenschaften wurde unter dem Namen Combretastatin-A4 von Griggs et al. 2002 beschrieben. (130) Dieser Forschungsansatz ist hinsichtlich der Minimierung des Nebenwirkungsprofils vielversprechend.

Um das Nutzen-Risiko-Profil von Aflibercept und der übrigen Anti-VEGF Präparate genauer zu eruieren, sind zudem engmaschig geführte, patientenorientierte Langzeitstudien und Erfahrungswerte unumgänglich.

5 Zusammenfassung

Die feuchte exsudative Form der altersbedingten Makuladegeneration (AMD) ist die häufigste Erblindungsursache in der westlichen Welt. Im Rahmen des Pathomechanismus dieser Erkrankung spielt der *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) eine zentrale Rolle. Durch eine erhöhte Ausschüttung von VEGF durch das RPE kommt es zum Auswachsen von Kapillargefäßen. Diese choroideale Neovaskularisation (CNV) führt im Endstadium zum zentralen Visusverlust. Bei der Behandlung der CNV im Rahmen der AMD ist die pharmakologische Neutralisierung der erhöhten VEGF-Konzentration die Methode der ersten Wahl. Aktuell werden in der Klinik die drei anti-VEGF Präparate Bevacizumab, Ranibizumab und Aflibercept verwendet.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirksamkeit der VEGF-Inhibitoren in einem *in vitro* Organkulturmodell verglichen. Hierzu wurden RPE/Choroidea-Organkulturen aus frisch geschlachteten Schweinen verwendet. In den Überständen der Organkulturen wurde nach einer Behandlung mit 125 µg/ml Bevacizumab, Ranibizumab und Aflibercept für sieben Tage die VEGF-Konzentration analysiert. Zusätzlich wurde die minimale Konzentration der drei Medikamente bestimmt, mit der sich das ausgeschüttete VEGF sechs Stunden inhibieren lässt. Nach einer einmaligen Gabe von 125 µg/ml Aflibercept konnte VEGF erst nach sechs Tagen im Überstand der RPE-Zellen gemessen werden. Im Gegensatz dazu wurde nach einer Behandlung mit Ranibizumab bzw. Bevacizumab bereits nach 72 Stunden bzw. 12 Stunden VEGF im Überstand detektiert. Die minimalen Konzentrationen für eine erfolgreiche Inhibition des ausgeschütteten VEGF betragen für Aflibercept 0,031 µg/ml, für Ranibizumab 0,244 µg/ml und für Bevacizumab 3,9 µg/ml.

Damit zeigte Aflibercept im Vergleich zu Ranibizumab und Bevacizumab in dem verwendeten *in vitro* Organkulturmodell eine höhere Effizienz bei der VEGF-Inhibition. Übertragen auf die humane Situation erwies sich Aflibercept damit als potentes anti-VEGF-Präparat zur Behandlung der feuchten Form der AMD. Aufgrund der lang anhaltenden Wirksamkeit könnten die intravitrealen Injektionsabstände verlängert werden. Möglicherweise ist der Einsatz von Aflibercept aufgrund von potentiellen Nebenwirkungen wie eine geographische Atrophie des Auges aber limitiert. Daher sind klinische Studien zur Analyse des Langzeitverlaufes notwendig.

6 Literaturverzeichnis

1. Schrader WF (2006) Age-related macular degeneration: a socioeconomic time bomb in our aging society. *Ophthalmologie* 103:742-748.
2. Augood CA, Vingerling JR, de Jong PT, Chakravarthy U, Seland J, Soubrane G, Tomazzoli L, Topouzis F, Bentham G, Rahu M, Vioque J, Young IS, Fletcher AE (2006) Prevalence of age-related maculopathy in older Europeans: the European Eye Study (EUREYE). *Arch Ophthalmol.* 124:529-535.
3. Pascolini D, Mariotti SP, Pokharel GP, Pararajasegaram R, Etya'ale D, Négrel AD, Resnikoff S (2004) 2002 global update of available data on visual impairment: a compilation of population-based prevalence studies. *Ophthalmic Epidemiol.* 11:67-115.
4. Gordois A, Cutler H, Pezzullo L, Gordon K, Cruess A, Winyard S, Hamilton W, Chua K (2012) An estimation of the worldwide economic and health burden of visual impairment. *Glob Public Health* 7:465-481.
5. Ziemssen F, Salvatore Grisanti S, Bartz-Schmidt KU, Schulz M (2006) Innovative Therapien für eine häufige Erblindungsursache. *Pharmazeutische Zeitung* 23:1395.
6. Klein R, Klein BE, Tomany SC, Meuer SM, Huang GH (2002) Ten-year incidence and progression of age-related maculopathy: The Beaver Dam eye study. *Ophthalmology* 109:1767-1779.
7. Rudnicka AR, Jarrar Z, Wormald R, Cook DG, Fletcher A, Owen CG (2012) Age and gender variations in age-related macular degeneration prevalence in populations of European ancestry: a meta-analysis. *Ophthalmology* 119:571-580.
8. Randolph SA (2014) Age-related macular degeneration. *Workplace Health Saf.* 62 :352.
9. Thornton J, Edwards R, Mitchell P, Harrison RA, Buchan I, Kelly SP (2005) Smoking and age-related macular degeneration: a review of association. *Eye (Lond).* 19:935-944.
10. Chakravarthy U, Augood C, Bentham GC, de Jong PT, Rahu M, Seland J, Soubrane G, Tomazzoli L, Topouzis F, Vingerling JR, Vioque J, Young IS, Fletcher AE (2007) Cigarette smoking and age-related macular degeneration in the EUREYE Study. *Ophthalmology* 114:1157-1163.
11. Almeida LN, Carolino RM, Sperandio DC, Nehemy MB, De Marco LA (2009) The role of molecular genetic factors in age-related macular degeneration. *Arq Bras Oftalmol.* 72:567-572.

12. Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, Tsai JY, Sackler, RS, Hayes C, Henning AK, San Giovanni JP, Mane SM, Myne ST, Bracken MB, Ferris FL, Otto J, Barnstable C, Ho J. (2005) Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science* 308:385-389.
13. Evans JR (2001) Risk factors for age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res.* 20:227-253.
14. Bird AC, Bressler NM, Bressler SB, Chisholm IH, Coscas G, Davis MD, de Jong PT, Klaver CC, Klein BE, Klein R, et al. (1995) An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. The International ARM Epidemiological Study Group. *Surv Ophthalmol* 39:367-374.
15. Gehrs KM, Anderson DH, Johnson LV, Hageman GS (2006) Age-related macular degeneration-emerging pathogenetic and therapeutic concepts. *Ann Med* 38: 450- 471.
16. Khandhadia S, Cipriani V, Yates JR, Lotery AJ (2012) Age-related macular degeneration and the complement system. *Immunobiology* 217:127-146.
17. Augustin AJ, Kichhof J (2009): Inflammation and the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Expert Opin Ther Targets* 13: 641-651.
18. Keane PA, Patel PJ, Liakopoulos S, Heussen FM, Sadda SR, Tufail A (2012) Evaluation of age-related macular degeneration with optical coherence tomography. *Surv Ophthalmol.* 57:389-414.
19. Hanna M. Zając-Pytrus, A–D, Agnieszka Pilecka, Anna Turno-Kręcicka, Joanna Adamiec-Mroczek, Marta Misiuk-Hojło (2015) The Dry Form of Age-Related Macular Degeneration (AMD): The Current Concepts of Pathogenesis and Prospects for Treatment. *Adv Clin Exp Med* 24:1099–1104.
20. de Jong PT (2006) Age-related macular degeneration. *N Engl J Med.* 355:1474-1485.
21. Bhutto I, Luty (2012) Understanding age-related macular degeneration (AMD): Relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/Bruch's membrane choriocapillaris complex. *GMol Aspects* 33: 295–317.
22. www.dog.org Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft e.V. Leitlinie Nr. 21 Altersabhängige Makuladegeneration AMD Stand: 30. Oktober 2015. Aufgerufen am 26.02.2016 um 15.13 Uhr.
23. Kaszubski P, Ben Ami T, Saade C, Smith RT (2016) Geographic Atrophy and Choroidal Neovascularization in the Same Eye: A Review. *Ophthalmic Res.* 55:185-193.
24. Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. (1971) Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med* 133: 275.

25. Augustin HG (2003) Angiogenesis research-quo vadis? *Ophthalmologie*. 100:104-110.
26. Hanahan D, Folkman J (1996) Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. *Cell* 86:353–364.
27. Balaratnasingam C, Dhrami-Gavazi E, McCann JT, Ghadiali Q, Freund KB (2015) Aflibercept: a review of its use in the treatment of choroidal neovascularization due to age-related macular degeneration. *Clin Ophthalmol*. 9:2355-2371.
28. Adams RH, Alitalo K (2007) Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8:464-478.
29. Provis JM, Leech J, Diaz CM, Penfold PL, Stone J, Keshet E (1997) Development of the human retinal vasculature: cellular relations and VEGF expression. *Exp Eye Res*. 65:555-568.
30. Chen Y, Han F (2012) Profile of ranibizumab: efficacy and safety for the treatment of wet age-related macular degeneration. *Ther Clin Risk Manag*. 8:343-35
31. Klettner A (2013) Physiological functions of VEGF in the retina and its possible implications prolonged anti-VEGF therapy.
32. Klettner A, Kauppinen A, Blasiak J, Roider J, Salminen A, Kaarniranta K. (2013) Cellular and molecular mechanisms of age-related macular degeneration: from impaired autophagy to neovascularization. *Int J Biochem Cell Biol*. 45:1457-1467.
33. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E (1992) Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359:843-845.
34. Blaauwgeers HG, Holtkamp GM, Rutten H, Witmer AN, Koolwijk P, Partanen TA, Alitalo K, Kroon ME, Kijlstra A, van Hinsbergh VW, Schlingemann RO (1999) Polarized vascular endothelial growth factor secretion by human retinal pigment epithelium and localization of vascular endothelial growth factor receptors on the inner choriocapillaris. Evidence for a trophic paracrine relation. *Am J Pathol*. 155:421-428.
35. Okamoto N, Tobe T, Hackett SF, Ozaki H, Viores MA, LaRochelle W, Zack DJ, Campochiaro PA. (1997) Transgenic mice with increased expression of vascular endothelial growth factor in the retina: a new model of intraretinal and subretinal neovascularization. *Am J Pathol*. 151:281-291.
36. Luty G, Grunwald J, Majji AB, Uyama M, Yoneya S (1999) Changes in choriocapillaris and retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration. *Mol Vis*. 5:35.
37. Ferrara N, Henzel WJ (1989) Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 161:851-858.

38. Ferrara N (2009) Vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 29:789-791.
39. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF (1983) Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science.* 219:983-985.
40. Ferrara N, Houck KA, Jakeman LB, Winer J, Leung DW (1991) The vascular endothelial growth factor family of polypeptides. *Journal of Cellular Biochemistry* 47:211-218.
41. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA (1991) The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *The Journal of Biological Chemistry* 266:11947-11954.
42. Bhisitkul RB (2006) Vascular endothelial growth factor biology: clinical implications for ocular treatments. *Br J Ophthalmol.* 90:1542-1547.
43. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 9:669-676.
44. Adamis AP, Shima DT, Yeo KT, Yeo TK, Brown LF, Berse B, D'Amore PA, Folkman J (1993) Synthesis and secretion of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human retinal pigment epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 193:631-638.
45. Kim I, Ryan AM, Rohan R, Amano S, Aguilar S, Miller JW, Adamis AP (1999) Constitutive expression of VEGF, VEGFR-1, and VEGFR-2 in normal eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40:2115-2121.
46. Kilic U, Kilic E, Järve A, Guo Z, Spudich A, Bieber K, Barzena U, Bassetti CL, Marti HH, Hermann DM (2006) Human vascular endothelial growth factor protects axotomized retinal ganglion cells in vivo by activating ERK-1/2 and Akt pathways. *J Neurosci.* 26:12439-12446.
47. Byeon SH, Lee SC, Choi SH, Lee HK, Lee JH, Chu YK, Kwon OW (2010) Vascular endothelial growth factor as an autocrine survival factor for retinal pigment epithelial cells under oxidative stress via the VEGF-R2/PI3K/Akt. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 51:1190-1197.
48. Miller DW, Jousen AM, Holz FG (2003) The molecular mechanisms of neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmologie* 100:92-96.
49. Klettner A, Roider J (2009) Constitutive and oxidative-stress-induced expression of VEGF in the RPE are differently regulated by different Mitogen-activated protein kinases. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 247:1487-1492.

50. Adamis AP, Shima DT, Tolentino MJ, Gragoudas ES, Ferrara N, Folkman J, D'Amore PA, Miller JW (1996) Inhibition of vascular endothelial growth factor prevents retinal ischemia-associated iris neovascularization in a non-human primate. *Arch Ophthalmol* 114:66-71.
51. Deudero JJ, Caramelo C, Castellanos MC, Neria F, Fernández-Sánchez R, Calabia O, Peñate S, González-Pacheco FR (2008) Induction of hypoxia-inducible factor 1alpha gene expression by vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*. 283:11435-11444.
52. Ferrara N (2002) VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer*. 2:795-803.
53. Cadena DL, Gill GN (1992) Receptor tyrosine kinases. *FASEB J*. 6:2332-2337.
54. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH (1994) Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*. 269:26988-26995.
55. Kendall RL, Thomas KA (1993) Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10705-10709.
56. Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M (1998) Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*. 92:735-745.
57. Djordjevic S, Driscoll PC (2013) Targeting VEGF signalling via the neuropilin co-receptor. *Drug Discov Today*. 18:447-455.
58. Macular Photocoagulation Study Group. (1991) Laser photocoagulation of subfoveal recurrent neovascular lesions in age-related macular degeneration. Results of a randomized clinical trial. *Arch Ophthalmol*. 109:1232-1241.
59. Virgili G, Bini A (2007) Laser photocoagulation for neovascular age-related macular degeneration. *Cochrane Database Syst Rev*. 3:CD004763.
60. Becerra EM, Morescalchi F, Gandolfo F, Danzi P, Nascimbeni G, Arcidiacono B, Semeraro F (2011) Clinical evidence of intravitreal triamcinolone acetonide in the management of age-related macular degeneration. *Curr Drug Targets* 12:149-172
61. Augustin AJ, Schmidt-Erfurth U (2006) Verteporfin therapy combined with intravitreal triamcinolone in all types of choroidal neovascularization due to age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 113:14-22.
62. Gragoudas ES, Adamis AP, Cunningham ET Jr, Feinsod M, Guyer DR; VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularization Clinical Trial Group. Pegaptanib for neovascular age-

related macular degeneration. *N Engl J Med.* 2004 351:2805-2816.

63. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR__Product_Information/human/000582/WC500029271.pdf (Aufruf am 02.03.16 um 14.42 Uhr)

64. Kim KJ, Li B, Houck K, Winer J, Ferrara N (1992) The vascular endothelial growth factor proteins: identification of biologically relevant regions by neutralizing monoclonal antibodies. *Growth Factors.* 7:53-64.

65. Presta LG, Chen H, O'Connor SJ, Chisholm V, Meng YG, Krummen L, Winkler M, Ferrara N (1997) Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res.* 57:4593-4599.

66. Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, Novotny W (2004) Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 3:391-400.

67. Klettner A (2014) VEGF-A and its inhibitors in age-related macular degeneration – pharmacokinetic differences and their retinal and systemic implications. *Journal of Biochemical and Pharmacological Research* 2:8-20.

68. Bizzarri N, Ghirardi V, Alessandri F, Venturini PL, Valenzano Menada M, Rundle S, Leone Roberti Maggiore U, Ferrero S (2016) Bevacizumab for the treatment of cervical cancer. *Expert Opin Biol Ther.* 16:407-419.

69. Krämer I, Lipp HP (2007) Bevacizumab, a humanized anti-angiogenic monoclonal antibody for the treatment of colorectal cancer. *J Clin Pharm Ther.* 32:1-14.

70. Ilhan-Mutlu A, Osswald M, Liao Y, Goemmel M, Reck M, Miles D, Mariani P, Gianni L, Lutiger B, Nendel V, Strock S, Perez-Moreno PD, Thorsen F, von Baumgarten LD, Preusser M, Wick W, Winkler F (2016) Bevacizumab prevents brain metastases formation in lung adenocarcinoma. *Mol Cancer Ther.* (epub)

71. Ohr M, Kaiser PK (2012) Aflibercept in wet age-related macular degeneration: a perspective review. *Ther Adv Chronic Dis.* 3:153-161.

72. Brechner RJ, Rosenfeld PJ, Babish JD, Caplan S (2008) Pharmacotherapy for neovascular age-related macular degeneration: an analysis of the 100% 2008 medicare fee-for-service part B claims file. *Am J Ophthalmol.* 151:887-895.

73. Comparison of Age-related Macular Degeneration Treatments Trials (CATT) Research Group, Martin DF, Maguire MG, Fine SL, Ying GS, Jaffe GJ, Grunwald JE, Toth C, Redford M, Ferris FL 3rd (2012) Ranibizumab and bevacizumab for treatment of neovascular age-related macular degeneration: two-year results. *Ophthalmology.* 119:1388-1398.

74. Singh RP, Kaiser PK (2007) Role of ranibizumab in management of macular degeneration. *Indian J Ophthalmol.* 55:421-425.

75. Ferrara N, Damico L, Shams N, Lowman H, Kim R. (2006) Development of ranibizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antigen binding fragment, as therapy for neovascular age-related macular degeneration. *Retina* 26:859-870.
76. Krzystolik MG, Afshari MA, Adamis AP, Gaudreault J, Gragoudas ES, Michaud NA, Li W, Connolly E, O'Neill CA, Miller JW (2002) Prevention of experimental choroidal neovascularization with intravitreal anti-vascular endothelial growth factor antibody fragment. *Arch Ophthalmol.* 120:338-346.
77. Gaudreault J, Fei D, Rusit J, Suboc P, Shiu V (2005) Preclinical pharmacokinetics of Ranibizumab (rhuFabV2) after a single intravitreal administration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 46:726-733.
78. Bakri SJ, Snyder MR, Reid JM, Pulido JS, Ezzat MK, Singh RJ (2007) Pharmacokinetics of intravitreal ranibizumab (Lucentis). *Ophthalmology.* 114:2179-2182.
79. Krohne TU, Liu Z, Holz FG, Meyer CH (2012) Intraocular pharmacokinetics of ranibizumab following a single intravitreal injection in humans. *Am J Ophthalmol.* 154:682-686.
80. Brown DM, Michels M, Kaiser PK, Heier JS, Sy JP, Ianchulev T; ANCHOR Study Group. (2009) Ranibizumab versus verteporfin photodynamic therapy for neovascular age-related macular degeneration: Two-year results of the ANCHOR study. *Ophthalmology* 116:57-65.
81. Kaiser PK, Blodi BA, Shapiro H, Acharya NR; MARINA Study Group. (2007) Angiographic and optical coherence tomographic results of the MARINA study of ranibizumab in neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology.* 114:1868-1875.
82. Holash J, Davis S, Papadopoulos N, Croll SD, Ho L, Russell M, Boland P, Leidich R, Hylton D, Burova E, Ioffe E, Huang T, Radziejewski C, Bailey K, Fandl JP, Daly T, Wiegand SJ, Yancopoulos GD, Rudge JS (2002) VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:11393-11398.
83. Papadopoulos N, Martin J, Ruan Q, Rafique A, Rosconi MP, Shi E, Pyles EA, Yancopoulos GD, Stahl N, Wiegand SJ. (2012) Binding and neutralization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and related ligands by VEGF Trap, ranibizumab and bevacizumab, *Angiogenesis* 15:171-185.
84. Rudge JS, Holash J, Hylton D, Russell M, Jiang S, Leidich R, Papadopoulos N, Pyles EA, Torri A, Wiegand SJ, Thurston G, Stahl N, Yancopoulos GD (2007) VEGF Trap complex formation measures production rates of VEGF, providing a biomarker for predicting

efficacious angiogenic blockade. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:18363-18370.

85. Yu L, Liang XH, Ferrara N (2011) Comparing protein VEGF inhibitors: In vitro biological studies. *Biochem Biophys Res Commun*. 408:276-281.

86. Stewart MW, Rosenfeld PJ, Penha FM, Wang F, Yehoshua Z, Bueno-Lopez E, Lopez PF (2012) Pharmacokinetic rationale for dosing every 2 weeks versus 4 weeks with intravitreal ranibizumab, bevacizumab, and aflibercept (vascular endothelial growth factor Trap-eye). *Retina*. 32:434-457.

87. Stewart MW, Rosenfeld PJ (2008) Predicted biological activity of intravitreal VEGF Trap. *Br J Ophthalmol*. 92:667-668.

88. Nguyen QD, Shah SM, Browning DJ, Hudson H, Sonkin P, Hariprasad SM, Kaiser P, Slakter JS, Haller J, Do DV, Mieler WF, Chu K, Yang K, Ingerman A, Vitti RL, Berliner AJ, Cedarbaum JM, Campochiaro PA (2009) A phase I study of intravitreal vascular endothelial growth factor trap-eye in patients with neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 116:2141-2148.

89. Heier JS, Boyer D, Nguyen QD, Marcus D, Roth DB, Yancopoulos G, Stahl N, Ingerman A, Vitti R, Berliner AJ, Yang K, Brown DM; CLEAR-IT 2 Investigators. (2011) The 1-year results of CLEAR-IT 2, a phase 2 study of vascular endothelial growth factor trap-eye dosed as-needed after 12-week fixed dosing. *Ophthalmology*. 118:1098-1106.

90. Schmidt-Erfurth U, Kaiser PK, Korobelnik JF, Brown DM, Chong V, Nguyen QD, Ho AC, Ogura Y, Simader C, Jaffe GJ, Slakter JS, Yancopoulos GD, Stahl N, Vitti R, Berliner AJ, Soo Y, Anderesi M, Sowade O, Zeitz O, Norenberg C, Sandbrink R, Heier JS (2014) Intravitreal aflibercept injection for neovascular age-related macular degeneration: ninety-six-week results of the VIEW studies. *Ophthalmology* 121:193-201.

91. Minuth WW, Schumacher K, Strehl R, Kloth S (2000) Physiological and cell biological aspects of perfusion culture technique employed to generate differentiated tissues for long term biomaterial testing and tissue engineering. *J Biomater Sci Polym Ed*. 11:495-522.

92. Miura Y, Klettner A, Noelle B, Hasselbach H, Roider J (2010) Change of Morphological and Functional Characteristics of Retinal Pigment Epithelium Cells during Cultivation of Retinal Pigment Epithelium-Choroid Perfusion Tissue Culture. *Ophthalmic Res*. 43:122-133.

93. Bussolati O, Belletti S, Uggeri J, Gatti R, Orlandini G, Dall'Asta V, Gazzola GC (1995) Characterization of apoptotic phenomena induced by treatment with L-asparaginase in N1H3T3 Cells. *Exp Cell Res*. 220:283-291.

94. Klettner A, Recher M, Roider J (2014) Comparison of the efficacy of aflibercept, ranibizumab, and bevacizumab in an RPE/choroid organ culture. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 252:1593-1598.
95. Velez-Montoya R, Oliver SC, Olson JL, Fine SL, Mandava N, Quiroz-Mercado H (2013) Current knowledge and trends in age-related macular degeneration. Today's and future treatments. *Retina* 33:1487-1502.
96. Amadio M, Govoni S, Pascale A (2016) Targeting VEGF in eye neovascularization: What's new?: A comprehensive review on current therapies and oligonucleotide-based interventions under development, *Pharmacol Res.*103:253-269.
97. Klettner A, Roider J. (2008) Comparison of bevacizumab, ranibizumab, and pegaptanib in vitro: efficiency and possible additional pathways. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 49:4523-4527.
98. Gerhardinger C, Brown LF, Roy S, Mizutani M, Zucker CL, Lorenzi M (1998) Expression of vascular endothelial growth factor in the human retina and in nonproliferative diabetic retinopathy. *American Journal of Pathology* 152:1453-1462.
99. Klettner A, Koinzer S, Meyer T, Roider J (2013) Toll-like receptor 3 activation in retinal pigment epithelium cells - Mitogen-activated protein kinase pathways of cell death and vascular endothelial growth factor secretion. *Acta Ophthalmol.* 91:211-218.
100. Lassota N (2008) Clinical and histological aspects of CNV formation: studies in an animal model. *Acta Ophthalmol* 86: Thesis 2:1: 1–24.
101. Klettner A, Roider J (2009) Treating Age-Related Macular Degeneration – Interaction of VEGF- Antagonists with their Target. *Mini Rev Med Chem.* 9:1127-1135.
102. Wiencke AK, Kiilgaard JF, Nicolini J, Bundgaard M, Röpke C, la Cour M (2003) Growth of cultured porcine retinal pigment epithelial cells. *Acta Ophthalmol* 81: 170–176.
103. Crawford Y, Ferrara N (2009) VEGF inhibition: insights from preclinical and clinical studies, *Cell Tissue Res.*335:261-269.
104. Grothey A, Galanis E. (2009) Targeting angiogenesis: progress with anti-VEGF treatment with large molecules, *Nat Rev Clin Oncol.* 6:507-518.
105. Bressler SB (2009) Introduction: Understanding the role of angiogenesis and antiangiogenic agents in age-related macular degeneration, *Ophthalmology* 116:1-7
106. Kowanzetz M, Ferrara N. (2006) Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective, *Clin Cancer Res.* 12:5018-5022.
107. Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, De Mol M, Wu Y, Bono F, Devy L, Beck H, Scholz D, Acker T, DiPalma T, Dewerchin M, Noel A, Stalmans I, Barra A, Blacher S, VandenDriessche T, Ponten A, Eriksson U, Plate KH, Foidart JM, Schaper

- W, Charnock-Jones DS, Hicklin DJ, Herbert JM, Collen D, Persico MG (2001) Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med.* 2001 7:575-583.
108. Takahashi H, Shibuya M (2005) The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond).* 109:227-241.
109. Alitalo K, Carmeliet P (2002) Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell* 1:219–227.
110. Rakic JM, Lambert V, Devy L, Lutun A, Carmeliet P, Claes C, Nguyen L, Foidart JM, Noël A, Munaut C. (2003) Placental growth factor, a member of the VEGF family, contributes to the development of choroidal neovascularization, *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44:3186-3193.
111. Bakall B, Folk JC, Boldt HC, Sohn EH, Stone EM, Russell SR, Mahajan VB (2013) Aflibercept therapy for exudative age-related macular degeneration resistant to bevacizumab and ranibizumab. *Am J Ophthalmol.* 156:15-22.
112. Patel KH, Chow CC, Rathod R, Mieler WF, Lim JJ, Ulanski LJ 2nd, Leiderman YI, Arun V, Chau FY. (2013) Rapid response of retinal pigment epithelial detachments to intravitreal aflibercept in neovascular age-related macular degeneration refractory to bevacizumab and ranibizumab. *Eye (Lond)* 27:663-667.
113. Yonekawa Y, Andreoli C, Miller JB, Loewenstein JI, Sobrin L, Elliott D, Vavvas DG, Miller JW, Kim IK. (2013) Conversion to aflibercept for chronic refractory or recurrent neovascular age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol.* 156:29-35.
114. Ho VY, Yeh S, Olsen TW, Bergstrom CS, Yan J, Cribbs BE, Hubbard GB 3rd (2013) Short-term outcomes of aflibercept for neovascular age-related macular degeneration in eyes previously treated with other vascular endothelial growth factor inhibitors. *Am J Ophthalmol.* 156:23-28.
115. Sarwar S, Clearfield E, Soliman MK, Sadiq MA, Baldwin AJ, Hanout M, Agarwal A, Sepah YJ, Do DV, Nguyen QD (2016) Aflibercept for neovascular age-related macular degeneration. *Cochrane Database Syst Rev.* 2:CD011346.
116. Yun C, Oh J, Ahn J, Hwang SY, Lee B, Kim SW, Huh K (2016) Comparison of intravitreal aflibercept and ranibizumab injections on subfoveal and peripapillary choroidal thickness in eyes with neovascular age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* (epub)

117. Singh RP, Srivastava SK, Ehlers JP, Silva FQ, Bedi R, Schachat AP, Kaiser PK (2015) A single-arm, investigator-initiated study of the efficacy, safety, and tolerability of intravitreal aflibercept injection in subjects with exudative age-related macular degeneration previously treated with ranibizumab or bevacizumab (ASSESS study): 12-month analysis. *Clin Ophthalmol.* 9:1759-1766.
118. Heier JS, Brown DM, Chong V, Korobelnik JF, Kaiser PK, Nguyen QD, Kirchhof B, Ho A, Ogura Y, Yancopoulos GD, Stahl N, Vitti R, Berliner AJ, Soo Y, Anderesi M, Groetzbach G, Sommerauer B, Sandbrink R, Simader C, Schmidt-Erfurth U; VIEW 1 and VIEW 2 Study Groups. (2012) Intravitreal aflibercept (VEGF trap-eye) in wet age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 119:2537-2548.
119. Comparison of Age-related Macular Degeneration Treatments Trials (CATT) Research Group, Martin DF, Maguire MG, Fine SL, Ying GS, Jaffe GJ, Grunwald JE, Toth C, Redford M, Ferris FL 3rd. (2012) Ranibizumab and bevacizumab for treatment of neovascular age-related macular degeneration: two-year results. *Ophthalmology* 119:1388-1398.
120. Kurihara T, Westenskow PD, Bravo S, Aguilar E, Friedlander M (2012) Targeted deletion of Vegfa in adult mice induces vision loss. *NovJ Clin Invest.* 122:4213-4217.
121. Saint-Geniez M, Kurihara T, Sekiyama E, Tahmaz N, D'Amore PA (2009) An essential role for RPE-derived soluble VEGF in the maintenance of the choriocapillaris. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:18751-18756.
122. Ford KM, Saint-Geniez M, Walshe T, Zahr A, D'Amore P (2011) Expression and Role of VEGF in the Adult Retinal Pigment Epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 52: 9478–9487.
123. Ueno S, Pease ME, Wersinger DM, Masuda T, Viores SA, Licht T, Zack DJ, Quigley H, Keshet E, Campochiaro PA (2008) Prolonged blockade of VEGF family members does not cause identifiable damage to retinal neurons or vessels. *J Cell Physiol.* 217:13-22.
124. Rosenfeld PJ, Shapiro H, Tuomi L, Webster M, Elledge J, Blodi B; MARINA and ANCHOR Study Groups (2011) Characteristics of patients losing vision after 2 years of monthly dosing in the phase III ranibizumab clinical trials. *Ophthalmology* 118:523-530.
125. Bhisitkul RB, Mendes TS, Rofagha S, Enanoria W, Boyer DS, Sadda SR, Zhang K (2015) Macular atrophy progression and 7-year vision outcomes in subjects from the ANCHOR, MARINA, and HORIZON studies: the SEVEN-UP study. *Am J Ophthalmol.* 159:915-924.
126. Klettner A, Dithmer M, Richert E, Roeder J (2014) Effects of aflibercept on primary RPE cells: toxicity, wound healing, uptake and phagocytosis. *Br J Ophthalmol.* 98:1448-1452.

127. Strauss O (2009) The role of retinal pigment epithelium in visual functions. *Ophthalmologie* 106:299-304.
128. Mustafi D, Kevany BM, Genoud C, Okano K, Cideciyan AV, Sumaroka A, Roman AJ, Jacobson SG, Engel A, Adams MD, Palczewski K (2011) Defective photoreceptor phagocytosis in a mouse model of enhanced S-cone syndrome causes progressive retinal degeneration. *FASEB J.* 25:3157-3176.
129. Ranjbar M, Brinkmann MP, Zapf D, Miura Y, Rudolf M, Grisanti S (2016) Fc Receptor Inhibition Reduces Susceptibility to Oxidative Stress in Human RPE Cells Treated with Bevacizumab, but not Aflibercept. *Cell Physiol Biochem* 38:737-747.
130. Griggs J, Skepper JN, Smith GA, Brindle KM, Metcalfe JC, Hesketh R (2002) Inhibition of proliferative retinopathy by the anti-vascular agent combretastatin-A4. *Am J Pathol.* 160:1097-1103.

7 Verzeichnis der Abbildungen und Diagramme

| | |
|--|----|
| ABB. 1: PRÄPARATION DER ORGANKULTUR..... | 24 |
| ABB. 2: AUFBAU DES ORGANKULTURSYSTEMS NACH MINUTH. | 25 |
| ABB. 3: CALCEIN-FÄRBUNG | 31 |
| ABB. 4: MINIMALE KONZENTRATION FÜR DIE INHIBITION DER VEGF-FREISETZUNG NACH SECHS STUNDEN | 33 |
| ABB. 5: VERGLEICH DER POTENZ DER DREI ANTI-VEGF-PRÄPARATE | 34 |
| ABB. 6: VEGF-LANGZEIT-INHIBITION DURCH AFLIBERCEPT, RANIBIZUMAB UND BEVACIZUMAB..... | 36 |

8 Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| <i>TABELLE 1: VERWENDETE GERÄTE</i> | 20 |
| <i>TABELLE 2: VERWENDETE INHIBITOREN</i> | 20 |
| <i>TABELLE 3: VERWENDETE CHEMIKALIEN</i> | 21 |
| <i>TABELLE 4: SONSTIGE MATERIALIEN</i> | 22 |

9 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. J. Roider gilt mein herzlicher Dank für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für seinen hilfreichen Rat bei der Erstellung dieser Arbeit.

Frau Prof. Dr. rer. nat. A. Klettner gebührt mein größter Dank für die Überlassung des Themas, für die stetige Betreuung, für die wertvollen Ratschläge und für die intensive Betreuung bei der Anfertigung der vorliegenden Dissertation.

Ferner möchte ich mich bei den Mitarbeiterinnen des zentralen Augenlabors des UKSH Kiel bedanken ohne deren liebevolle Mitpflege der Schweineaugen diese Arbeit nicht möglich wäre. In alphabetischer Reihenfolge: Serap Luick, Monika Marquardt.

Dankbar bin ich ebenfalls der gesamten Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. rer. nat. A. Klettner, die mir durch zahlreiche anregende Diskussionen insbesondere bei den Doktorantenseminaren und durch das freundschaftliche Klima immer wieder Freude bei der Erstellung dieser Arbeit bereitete.

Mein herzlicher Dank gebührt meinen Eltern Filiz und Halil Recber, die mir das Studium ermöglicht und die Wissenschaft lieben gelehrt haben.

Mein liebevollster und herzlichster Dank gehört meiner Frau Esmâ Recber, ohne deren konsequente und liebevolle Unterstützung diese Dissertation nicht zustande gekommen wäre.

10 Eidesstattliche Erklärung

Ich, Muhammed Zahid Recber, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „**Untersuchungen zur Effizienz von Aflibercept, Ranibizumab und Bevacizumab bei der feuchten Form der altersbedingten Makuladegeneration mit einem *in vitro* Organkulturmodell**“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Des Weiteren versichere ich, dass diese Dissertation noch keiner Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat, dass sie noch nicht veröffentlicht ist, sowie dass ich mich noch nicht anderweitig um einen Doktorgrad beworben habe bzw. einen solchen bereits besitze.

Die dem Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel ist mir bekannt.

Hannover, den 29.05.2018

Muhammed Zahid Recber

11 Veröffentlichungen

Zeitschriftenartikel

Klettner A, **Recher M**, Roider J (2014) Comparison of the efficacy of aflibercept, ranibizumab, and bevacizumab in an RPE/choroid organ culture. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 252:1593-1598.

Kongressbeiträge

DOG Meeting, Berlin, Exzellent sehen – Exzellenzfördern, 19.9.-22.9.13, Berlin

Klettner A, **Recher M**, Tahmaz N, Richert E, Roider J.

Effizienz von Aflibercept in einem in vitro RPE-Organ kulturmodell und Wirkung von Aflibercept auf primäre Zellen.