

Medizinische Fakultät der Technischen Universität München
Nuklearmedizinische Klinik und Poliklinik

Präklinische Untersuchungen zur Radiopeptidtherapie
der Peritonealkarzinose mit α -Strahlern

Enken Maren Susanna Drecoll

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten
Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. M. Essler
2. Univ.-Prof. Dr. M. Schwaiger

Die Dissertation wurde am 30.09.2014 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 18.11.2015 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis	4
2. Einleitung	
2.1 Radionuklidtherapie mit α -Partikel-emittierenden Radionukliden	9
2.2 Radionuklidtherapie mit Tumor-Homing-Peptiden	11
2.3 Fragment 3 (F3) aus dem High Mobility Group Protein N2	13
2.4 HMGN2	14
2.5 Nukleolin	16
2.6 Peritonealkarzinose als Modell eines fortgeschrittenen Tumorleidens	18
2.7 Ziel der Arbeit	19
3. Material und Methode	
3.1 Zellkultur	21
3.2 Markierungen	22
3.2.1 Synthese und Markierung von DTPA-(F3) ₂ mit ²¹³ Bi	22
3.2.2. Stabilität des markierten Proteins in Serum und Medium <i>in vitro</i>	23
3.2.3 Markierung von DTPA-(F3) ₂ mit ⁶⁸ Ga	23
3.3 Aufnahme und Verteilung von ²¹³ Bi-DTPA-(F3) ₂ <i>in vitro</i>	24
3.3.1 Blockierung der Ligandenbindung von ²¹³ Bi-DTPA-(F3) ₂ durch unmarkiertes DTPA-(F3) ₂	24
3.3.2 Internalisierung und Zellfraktionierung <i>in vitro</i>	24
3.4 Wirkung von ²¹³ Bi-markiertem F3 auf Tumorzellen <i>in vitro</i>	25
3.4.1 Cell Viability Test	25
3.4.2 Klonogener Assay mit ²¹³ Bi-DTPA-(F3) ₂	25
3.5 Aufnahme und Verteilung <i>in vivo</i>	26
3.5.1 Tierexperimentelle Richtlinien	26
3.5.2 Modell einer beginnenden und einer fortgeschrittenen Peritonealkarzinose	27
3.5.3 Biodistribution von ²¹³ Bi-DTPA-(F3) ₂ in Mäusen mit und ohne Peritonealkarzinose	27
3.5.4 Autoradiographie und Histologie von intraperitoneal gelegenen Tumoren	27
3.5.5 PET mit ⁶⁸ Ga-DTPA-(F3) ₂ mit und ohne MDA-MB-435-luc2-Xenograft intraperitoneal	28

3.6 Wirkung von $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ <i>in vivo</i>	28
3.6.1 Fragmentierte Therapie von intraperitonealen Xenograft-Tumoren mit $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$	28
3.6.2 <i>In vivo</i> Biolumineszenz Imaging zur Darstellung der Peritonealkarzinose nach $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ gegenüber DTPA- ^{213}Bi -Therapie und PBS-Kontrolle in SCID-Mäusen	29
3.6.3 Makroskopische Reduktion der Tumorlast <i>in vivo</i>	30
3.7 Statistische Signifikanz	31
4. Ergebnisse	
4.1 Markierung von DTPA-(F3) ₂ mit Radiometallen	32
4.2 Bindung und Internalisierung von $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ <i>in vitro</i>	33
4.3 Wirkung von $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ <i>in vitro</i>	34
4.4 Biodistribution von $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ in Mäusen mit intraperitonealem Xenograft	36
4.5 Behandlung der Peritonealkarzinose durch fraktionierte Therapie mit $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$	39
4.5.1 Behandlung des frühen Stadiums einer Peritonealkarzinose	39
4.5.2 Behandlung einer fortgeschrittenen Peritonealkarzinose	43
4.6 Bestimmung der Nierentoxizität einer intraperitonealen $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ -Therapie	45
5. Diskussion	47
6. Zusammenfassung	54
7. Literaturverzeichnis	60
8. Danksagung	67

1. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
^{225}Ac	Actinium
ATP	Adenosyl-Tri-Phosphat
^{211}At	Astatin
^{213}Bi	Wismut, α -emittierendes Radionuklid
BSA	Bovines Serumalbumin
Bq	Bequerel, Maßeinheit des radioaktiven Zerfalles, definiert als Zerfälle pro Sekunde
C	Cytosin
°C	Celsius
CCD	Charge Coupled Device-Kamera (Elektronische Kamera mit deren Hilfe über CCD-Chips das einfallende Licht in elektronische Signale umgewandelt wird)
CDC2	Genprodukt der Cyklin-abhängigen Kinase 1, die im Zellkern von Eukaryoten durch Phosphorylierung mehrerer Proteine den Übergang der Zelle in die S-Phase des Zellzyklus (und damit in die nächste mitotische Teilung) einleitet.
CHUD	Chromatin-Entfaltungs-Domäne
Ci	Curie, alte Maßeinheit für radioaktiven Zerfall, definiert als $3,7 \times 10^{10}$ Zerfälle pro Sekunde ($1\text{Ci}=3,7 \times 10^{10}\text{Bq}=37\text{GBq}$)
CKII	Casein Kinase II
CO ₂	Kohlendioxid
CPM	Counts per minute
c-terminal	Carboxy-Terminus; das Ende eines Proteins/Peptids mit einer freien Carboxy-Gruppe (COOH-) an der Aminosäure, Endpunkt der Proteinsynthese.
D	Asparaginsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid

Abkürzungsverzeichnis

DNA	deoxyribonucleic acid
cDNA	complementary DNA (aus RNA mittels reverser Transkriptase synthetisiert)
ds	double strand
DTPA	Diethylentriaminessigsäure(Diethylene triamine pentaacetic acid)
DTT	Dithiothreitol
E	Glutaminsäure
ECM	Extrazellulärmatrix
E. coli	Escherichia coli
ED50	Effektivdosis, die zu einer Wirkung bzw. in diesem Fall zu einem Zelltod von 50% führt.
EDTA	Ethylendiamintetraacetat, Ethylendinitrotetraessigsäure
F3	Fragment 3 des Proteins HMGN2
FCS	fetal calf serum, fötales Kälberserum
FGF	Fibroblast growth factor
FITC	Fluoresceinisocyanat; grün fluoreszierende Substanz, die konjugiert an Antikörper zur Markierung von Liganden dienen kann. Hierüber ist ein primär qualitativer Nachweis bestimmter Oberflächenantigene möglich
^{113}Fr	Francium
G	Guanin
G0-Phase	Ruhephase der Zelle innerhalb des Zellzyklus
^{68}Ga	Gallium
^{68}Ge	Germanium
GST	Glutathion-S-Transferase
GV-Solas	Gesellschaft für Versuchstiere
H-Atome	Helium-Atome
HB-19	Oberflächenprotein des HI-Virus
HCl	Chlorwasserstoff, Salzsäure

Abkürzungsverzeichnis

HE	Hämatoxylin & Eosin
HEPES	(4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethansulfonacetat
HMGN2	High Mobility Group Protein N2
H ₂ O	Wasser
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HUVECs	human umbilical vein endothelial cells= humane Endothelzellen aus den Nabelschnurvenen
HWZ	Halbwertszeit
¹³¹ I	Iod
%ID/g	Prozent der injizierten Dosis pro Gramm
IgG	Immunglobulin G
i.p.	intraperitoneal
ITLC	Instant Thin Layer Chromatography; Glas-Mikrofaser-Chromatographie-Papier, das mit Silikatgel beschichtet ist
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktosid
i.v.	intravasal
Kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
L	Leucin
LB	Luria/Broth-Nährmedium
LET	Linearer Energietransfer
¹⁷⁷ Lu	Lutetium
Luc2	für eine Luciferase kodierendes Gen der Feuerfliege
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MeV	Mega Elektronen Volt
μCi	Mikrocurie
μm	Micrometer

Abkürzungsverzeichnis

μM	Micromol
mM	Millimol
NaCl	Natriumchlorid
NaI	Natriumiodid
Nm	Nanometer
NaOH	Natronlauge, Natriumhydroxid
NBD	Nukleosomale Bindungs-Domäne
NLS	nuclear localizing signal, Kernokalisierungssignal
N-terminal	Amino-Terminus; Ende eines Proteins/Peptids mit einer Aminosäure mit einer freien Aminosäure (NH_2), Anfang der Proteinsynthese
O_2	oxygen, Sauerstoff
OD	optische Dichte
P	Prolin
p38	MAP-Kinase
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PBS	phosphate buffered saline,
PC	Peritonealkarzinose
PCR	polymerase chain reaction
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentia Hydrogenii, Wasserstoffionenaktivität, Maß für die saure oder alkalische Reaktion einer wässrigen Lösung
PI3	Phospho-inositol-triphosphat
PNK	Polynukleotid-Kinase
Q	Glutamin
R	Arginin
RBE	Radiobiologische Effektivität

Abkürzungsverzeichnis

RNA	ribonucleic acid,
rRNA	ribosomale RNA
RP-Säule	Reversed Phase Chromatography unter Verwendung einer unpolaren stationären Phase mit beschichteten Silikanen und einer mobilen Phase mit polaren Lösungsmischung
RPMI	Zellkulturmedium, das nach dem Institut, in dem es entwickelt wurde , benannt ist (Roswell Park Memorial Institute)
S	Serin
SCID	Severe combined immunodeficiency= schwere kombinierte Immundefizienz des B- und T-Zellsystems
SDS	sodium dodecyl sulfate
SPECT	single photon emission computed tomography
T	Threonin
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
¹⁴⁹ Tb	Terbium
T1/2	Halbwertszeit
TLC	Thin Layer Chromatography= Dünnschichtchromatographie
TVT	Tierärztliche Vereinigung für Tierschutz
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
UV	Ultraviolett
V	Valin
V/v	volume to volume
V/w	volume to weight
VEGF	vascular endothelial growth factor
⁹⁰ Y	Yttrium

2. Einleitung

2.1 Radionuklidtherapie mit α -Partikel-emittierenden Radionukliden

Radionuklide (α - und β -Strahler) spielen in der modernen Onkologie eine wichtige Rolle. Durch die Energieübertragung der ionisierten Teilchen auf das umgebende Gewebe kommt es zu einer irreversiblen Schädigung der DNA, entweder durch eine direkte Wirkung auf die DNA-Struktur (α -Strahler) oder indirekt durch Radikalbildung (β -Strahler).

Zielgerichtete Tumorthherapie erfolgt mit β - oder α -Emittern. β -Emitter mit mittlerem und hohem linearem Energietransfer (LET) wie ^{131}I , ^{177}Lu (0,5-0,8 MeV) und ^{90}Y (2 MeV) übertragen Elektronen auf das umgebende Gewebe. Diese Nuklide zeichnen sich wegen ihrer geringen Masse durch eine Reichweite von ca. 1 mm aus und sind somit in der Lage, ihre kinetische Energie an viele Zellen gleichzeitig abzugeben. Sie sind klassische Radionuklide für die Anwendung in der Tumorthherapie solider Tumoren wie z. B. der Radiojodtherapie bei Schilddrüsenkarzinomen oder Schilddrüsenautonomie oder in der Peptidrezeptor-Radionuklidtherapie mittels DOTATOC in der Therapie metastasierter neuroendokriner Tumore (Forrer, 2005 #24; van Essen, 2009 #70; Schicha H, 2007 #56). Hochenergetische α -Emitter übertragen Heliumkerne mit einer hohen Masse (ca. 4 GeV) und einer effektiven Energie von 4-19 MeV (8,4 und 19 MeV für ^{213}Bi oder ^{225}Ac). Schon wenige Zerfälle eines α -Emitters sind fähig, eine Zelle irreparabel zu schädigen, da vor allem DNA-Doppelstrangbrüche ausgelöst werden (McDevitt, 2001 #38). Die Wirkung von α -Emittern ist außerdem unabhängig von der Zellzyklusposition und der Oxygenierung des Tumorgewebes (Imam, 2001 #32; Behr, 1997 #7). Daher ist der Effekt von α -Emittern auch weniger stark dosisabhängig als der der β -Emitter (Miederer, 2008 #40). Alpha-emittierende Isotope stellen somit ein interessantes therapeutisches Mittel bei Tumorerkrankungen dar (Seidl, 2007 #58).

Hochenergetische α -Strahler haben im Gegensatz zu β -Partikel-Emittern lediglich eine Reichweite von einzelnen Zelldurchmessern (28-100 μm). Die die Alpha-Emitter auszeichnende hohe Toxizität gepaart mit ihrer geringen Reichweite macht es notwendig, dass sie zur Anwendung an Trägerproteine gebunden werden, die eine selektive Anreicherung im Zielgewebe ermöglichen. Ein ideales Trägerprotein sollte eine Aufnahme in die Zelle oder sogar in den Zellkern vermitteln, um das Nuklid möglichst nahe an der DNA platzieren zu können.

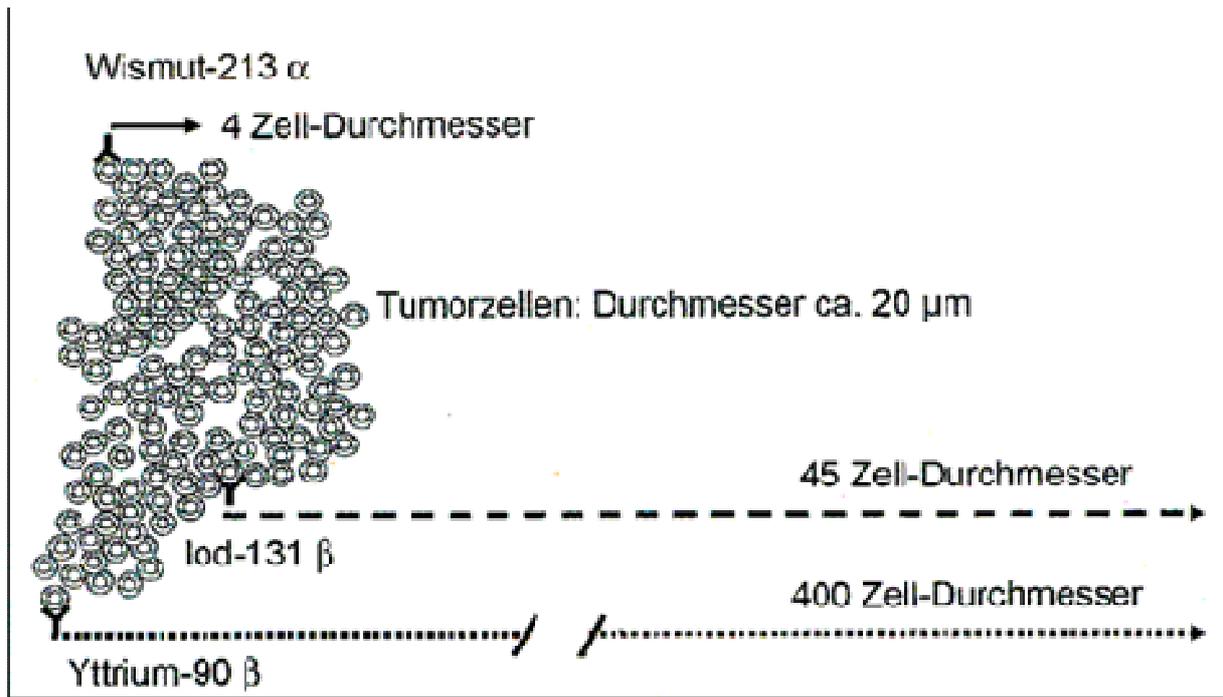


Abb.1. Unterschiedliche Reichweite der α- und β-Emitter (Seidl, 2007 #58).

Diese Zielgewebe können entweder die Tumorzellen selbst oder Endothelien der den Tumor versorgenden Gefäße sein. Die Zerstörung der Endothelzellen kann zum ischämisch bedingten Untergang des Tumorgewebes führen (Bergers, 2003 #8; Folkman, 1995 #23).

Da ihre geringe Reichweite eine homogene Verteilung im Gewebe zur Entfaltung ihrer biologischen Effektivität voraussetzt, konnten Vorteile gegenüber Niedrig-LET-Strahlung gerade bei Mikrometastasen, hämatologischen Erkrankungen und der Tumorausbreitung in Körperkompartimenten nachgewiesen werden.

Um toxische Nebenwirkungen auf den Organismus zu verhindern, sollte neben der schnellen Aufnahme in das Zielgewebe gleichzeitig eine schnelle Elimination des Nuklids aus dem Organismus erfolgen.

Unter den α-Emittern hat sich Wismut (^{213}Bi) als besonders geeignet erwiesen, da es aus einem „in-house“ Generator gewonnen werden kann. Über Chelatoren wird es an Antikörper und Proteine gebunden und hat sich hier als ausreichend stabil *in vitro* und *in vivo* gezeigt. Außerdem weist ^{213}Bi eine geeignet kurze Halbwertszeit von 45,6 Minuten auf und zerfällt unter β⁻ (98%)- und γ-Emission zu sehr kurzlebigen Abbauprodukten (Miederer, 2003 #41; Kim, 2011 #36). Die Emission von 440 keV γ-Strahlung ist von zusätzlichem Vorteil, da sie zur Dosimetrie und für bildgebende Verfahren und Biodistributionen genutzt werden kann, d.h. Aussagen zur Verteilung des Nuklids *in vivo* liefert. Ein weiterer positiver Faktor ist, dass nach Elution des ^{213}Bi aus dem Generator aufgrund der Strahlungszusammensetzung des

Nuklids keine erhöhten Sicherheitsvorkehrungen, wie gesonderte Abschirmung etc., getroffen werden müssen.

Demgegenüber weisen andere Alpha-Emitter wie ^{211}At zwar eine geeignet kurze HWZ auf; dieses zerfällt aber zu β -Emitter-Produkten mit unerwünscht langer HWZ (Imam, 2001 #32). Daneben wird es in einem Zyklotron durch Beschuss von Wismuth durch α -Partikel hergestellt, ist also teuer in der Herstellung und nur eingeschränkt verfügbar. ^{225}Ac hat eine wesentlich höhere HWZ von circa zehn Tagen und zerfällt neben weiteren Tochternukliden zu ^{213}Bi , was die Gefahr mit sich bringt, dass nach Metabolisierung des radioaktiv markierten Moleküls freie Nuklide aus dem Blutstrom im Gewebe angereichert werden (vor allem in den Ausscheidungsorganen wie Nieren und Leber) und zu einer akuten oder chronischen, strahleninduzierten Schädigung führen (Behr, 1999 #6).

Als Trägermoleküle von unterschiedlichen α - Emittern (^{225}Ac , ^{211}At , ^{149}Tb , ^{213}Bi) kamen bisher vor allem tumorspezifische monoklonale Antikörper in präklinischen und klinischen Studien zur Anwendung. Hierzu liegen vielversprechende Ergebnisse vor (Borchardt, 2003 #12; Palm, 2007 #44; Raja, 2007 #49; Beyer, 2004 #9; Milenic, 2004 #42).

2.2 Radionuklidtherapie mit „Tumor Homing“ Peptiden

Neben Antikörpern können auch Peptide als Carrier für Radionuklide eingesetzt werden (Reubi, 2005 #51). Obwohl ihre Effektivität in einigen präklinischen Studien nachgewiesen werden konnte, liegen hier noch wenige Erfahrungen vor (Nayak, 2007 #43; Miederer, 2008 #39).

Um Tumor Homing Peptide als Trägerprotein erfolgreich in vivo anzuwenden, muss zunächst eine ausreichende Bindungsaffinität des Liganden zum Rezeptor bestehen, die eine selektive Anreicherung im Zielgewebe ermöglicht. Durch die Koppelung des Liganden an ein Nuklid dürfen dessen Bindungseigenschaften nicht gestört werden. Daneben muss eine ausreichende Stabilität der Verbindung zwischen Protein und Nuklid bestehen.

Schließlich trägt eine schnelle Elimination des radioaktiv markierten Proteins zur Verminderung der Nebenwirkungen bei.

Die Pharmakokinetik der Radionuklide ist primär abhängig von der Größe des Konjugates. Große Proteine wie IgG-Antikörper haben eine lange biologische Halbwertszeit, was ihre Wirkung im Tumor verlängert, aber auch eine erhöhte Hintergrundbelastung für andere Organe nach sich zieht. Abhängig von ihrer Größe können diese Proteine nach ihrer Aufnahme ins Gefäßsystem nicht mehr renal filtriert werden, sondern werden nach und nach

vom retikulohistiozytären System von Leber und Milz aufgenommen und abgebaut. Dies führt über die längere Zirkulationszeit des Antikörpers und evtl. anfallender radioaktiver Abbauprodukte zu einer allgemein erhöhten Hintergrundbelastung in allen gut durchbluteten Geweben. Die häufigste Nebenwirkung ist eine hierdurch bedingte Myelotoxizität. Kleinere Proteine und Peptide können hier von Vorteil sein, da sie renal filtriert werden. Dies beschleunigt ihre Elimination aus dem Kreislauf und fördert so ihre Selektivität. Im proximalen Tubulussystem der Niere werden kleine Proteine abhängig von ihrer Ladung allerdings häufig sehr effektiv rückresorbiert. Daraus ergibt sich im Falle der nuklidgebundenen Peptide die Gefahr des akuten oder chronischen Nierenschadens (Behr, 1997 #7).

Eine Methode zur Gewinnung von Vektoren, die selektiv an Rezeptoren von Tumorzellen binden, stellt das Phage-Display dar (Pasqualini, 1996 #45). Die Methode nutzt Bakteriophagen, die mittels inserierter cDNA-Bibliothek von malignen und normalen Geweben zufallsorientiert Peptide exprimieren, was zu einer Vielzahl unterschiedlicher Expressionsstrukturen führt. Diese Bakteriophagen können tumortragenden Versuchstieren intravenös injiziert werden und verteilen sich dann über das Gefäßsystem schnell in allen Geweben des Körpers, wo sie an geeigneten Zielstrukturen binden können. Nach einer Zirkulationszeit von wenigen Minuten werden die Tiere geopfert, das Gefäßsystem gespült (und somit alle nicht gebundenen Phagen entfernt) und die Organe und Gewebe von Interesse entnommen. Nachdem die Zellen lysiert wurden, können die Phagen daraus gewonnen und mittels Infektion von Bakterien klonal vermehrt werden. Daraufhin folgen eine Sequenzierung und ein Abgleich mit bekannten DNA-Sequenzen (Arap, 2002 #3).

Aufbauend auf diesem Ansatz konnten diverse Liganden ermittelt werden, die fähig sind, an proliferierendes Endothel des Tumor-versorgenden Gefäßsystems, an die Tumorzellen selbst oder auch an Bindungsstellen der extrazellulären Matrix selektiv zu binden. Es konnte gezeigt werden, dass sie über eine Kopplung an Chemotherapeutika oder Apoptose-auslösende Peptide effektiv als spezifische Vektoren eingesetzt werden können (Ruoslahti, 2000 #55).

Der Vorteil der antiangiogenen Therapie ist der leichte Zugang zu den Zielstrukturen in den Gefäßen, eine weitgehende Unabhängigkeit von Mechanismen der Tumorzellresistenz und eine breite Anwendbarkeit bei vielen Tumortypen. Darüber hinaus ist eine physiologische Angiogenese bei Erwachsenen auf wenige Ausnahmen beschränkt, wie etwa Schwangerschaft oder chronisch entzündliche Prozesse (Folkman, 1995 #23; Porkka, 2002 #47).

2.3 Fragment 3 (F3) aus dem High Mobility Group Protein N2

Das Peptid F3 wurde von Porkka et al. durch Anwendung der Phage-Display-Methode isoliert (Porkka, 2002 #47). Da nachgewiesen werden konnte, dass endotheliale Progenitorzellen aus dem Knochenmark an der Entstehung von Tumorendothel beteiligt sind (Davidoff, 2001 #21), wurde eine Phagen-Bibliothek mit cDNA von murinen Knochenmarkszellen verwendet. Diese wurde für einen *in vivo* Phage Display-Ansatz in Mäusen mit subkutanen MDA-MB-435 (humane Brustkrebs-Zelllinie)- und HL60 (humane Leukämiezelllinie) -Xenograft-Tumoren angewandt. Auf diese Weise konnte ein Phage isoliert werden, der eine 20fach erhöhte Bindungsaffinität im Vergleich zum Wildtyp-Phagen hatte. Im Vergleich mit Proteindatenbanken konnte das exprimierte Protein als ein Anteil des nukleären Proteins HMGN2 identifiziert werden.

In vitro bindet das Protein nicht nur an unreife Endothelien innerhalb des Tumors, sondern auch an die Tumorzellen selbst. Durch Subfragmentierung und Veränderung einzelner Aminosäuren konnte die Bindung nochmals erheblich verbessert und für dieses Fragment F3 die Bindungsstelle eingegrenzt werden.

Bei dem Fragment handelt es sich um die nukleosomale Bindungsdomäne von HMGN2; eine hoch konservierte N-terminale Region, die reich an positiv geladenen Argininen, Lysinen und Prolinen ist und neben anderen Bereichen des HMGN2 für die Bindung an den Core Partikel zuständig ist (Abb.2.) (Bustin, 2001 #17). Die Bindung wird über mehrere Bindungsstellen des F3-Fragmentes vermittelt; insbesondere und einzig unerlässlich für die Bindung ist jedoch die Aminosäure-Sequenz von 4-11 (PQRRSARL) mit der Struktur einer α -Helix (Christian, 2003 #18).

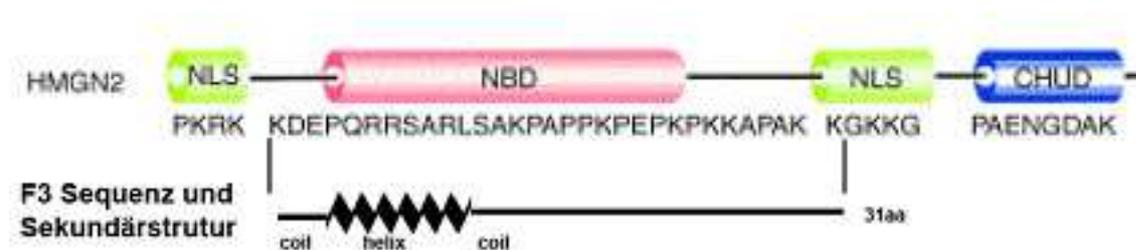


Abb.2. Sequenz und Sekundärstruktur von HMGN2 und seinem Fragment 3 (Bustin, 2001 #17)

In Bindungsversuchen mit den Tumorzelllinien HL60 und MDA-MB-435 nahmen die Tumorzellen FITC-F3 in einem energieabhängigen Prozess auf und transportierten es in den Zellkern. In Mäusen mit Xenograft-Tumoren gleicher Genese konnte ebenfalls eine Anreicherung im Tumor mittels Immunfluoreszenz beobachtet werden, die sich jedoch auf Endothelzellen und gefäßnahe Tumorzellen begrenzte. Die Bindung ist durch freies F3 *in vivo* hemmbar; komplette Hemmung erfolgte bei einer Konzentration von 100 μ M Peptid. Außerdem nahm eine kleine Population von Zellen im Knochenmark, aber auch Zellen im Darm und in der Haut FITC-F3 auf (Porkka, 2002 #47).

Die Anreicherung im Kern, *in vivo* schon nach 15-30 Minuten sichtbar, *in vitro* nach circa einer Stunde, führen Porkka et al. auf die stark basische Aminosäuresequenz von F3 zurück, die es dem ähnlich aufgebauten Tat-Protein sowie einigen Homebox-Proteinen ermöglicht, in den Zellkern internalisiert zu werden.

Christian et al. konnten in MDA-MB-435 und humanen Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (Huvecs) nachweisen, dass es sich bei dem Bindungspartner von F3 um das Protein Nucleolin mit einer Größe von 110 kDa und ein Fragment dieses Proteins von 75 kDa Größe handelt (Christian, 2003 #18). Mittels zweier unterschiedlicher Antikörper konnte gezeigt werden, dass der saure Bereich des N-Terminus von Nucleolin an der Bindung beteiligt ist. FITC-F3 wurde anhand von immunhistochemischen Färbungen *in vitro* in 100% der MDA-MB-435- und CHO-Zellen (immortalisierte Zelllinie aus dem Ovar des chinesischen Hamsters) in Zytoplasma und Zellkern aufgenommen, während es *in vivo* in 70% der Tumorendothelzellen nach einer Zirkulationszeit von 60 Minuten immunhistochemisch nachweisbar war. Im Endothel von Vergleichsgewebe erfolgte keine Aufnahme. FITC-F3 konnte außerdem in proliferierendem Endothel nicht malignen Ursprungs (Matrigel-Plugs stimuliert durch FGF) in derselben Höhe isoliert werden.

Somit ist F3 für eine Radioimmuntherapie gegen Tumore hämatologischen Ursprungs eine interessante Alternative. Darüber hinaus könnte es als „vascular homing“ Peptid neue Behandlungsmöglichkeiten der Radionuklidtherapie gegen solide Tumore eröffnen.

2.4 HMGN2

HMGN2 gehört zur Gruppe der High Mobility Group Proteine, die sich durch ihre schnellen Laufeigenschaften in der Elektrophorese aufgrund ihrer negativen Ladung auszeichnen und in Untergruppen mit einem funktionsgebenden Motiv unterteilt sind.

Es handelt sich bei HMGN2 (früher HMG-17) um ein ubiquitär vorkommendes und stark konserviertes Nicht-Histon-Protein des Zellkerns von Säugetierzellen. Es besteht aus drei

funktionell unterschiedlichen Domänen. Zentral befindet sich die namensgebende nukleosomale Bindungsstelle (NBD), mit der es in homodimerer Form sowohl mit dem Chromatin selbst als auch mit Histon 3 interagiert. C-Terminal liegt die negativ geladene Chromatin-Entfaltungs-Domäne (CHUD). Außerdem besitzt HMG2 ein zweigeteiltes Kernlokalisierungssignal (NLS, Siehe Abb. 2).

HMG-Proteine modifizieren durch ihre Bindung die Struktur der Bindungsstelle. Bei HMG2 führt die Bindung an das Nukleosom zur Entfaltung der gebundenen Chromatinregion, was den Zugang zur DNA erleichtert und die Transkription, Replikation und Reparatur der DNA ermöglicht. Es wird angenommen, dass HMG2 an der Genexpression beteiligt ist; seine Bindungsaffinität zu spezifischen Bindungsstellen wird wahrscheinlich durch die wechselnden Proteinkomplexe, in die es eingebunden wird, bestimmt. Posttranslationale Veränderungen des Proteins modulieren das Interaktionsmuster und den Funktionszustand und damit auch die Lokalisation des Proteins abhängig vom metabolischen Zustand der Zellen und der Zellzyklusphase (Ueda, 2006 #68; Bustin, 2001 #17).

Nur geringe Mengen dieses Proteins sind im Zellkern vorhanden, was durch seine hohe Mobilität im Kern ausgeglichen wird. In metabolisch aktiven Zellen liegen 90% der HMG2-Proteine gebunden vor, wobei die Verweildauer an der jeweiligen Bindungsstelle im Durchschnitt nur 20 Sekunden beträgt.

Das Expressionslevel des HMG2-Proteins ist während der embryonalen Entwicklung fest an die Differenzierung der Zellen gebunden. Eine regelrechte Entwicklung und Differenzierung des Embryos scheint eine regulierte Expression von HMG-Proteinen vorauszusetzen. HMG1-Knockout-Mäuse sind als einzige HMG-Knockout-Mäuse zwar lebensfähig, entwickeln aber spezifische Veränderungen, sind z.B. hypersensibel für viele Stress-Situationen und haben eine erhöhte Tumorzinzidenz wegen fehlerhafter DNA-Reparatur (Ueda, 2006 #68; Hock, 2007 #28).

Als ein Fragment von HMG2 kann das Peptid F3, das im Wesentlichen aus dessen Kernlokalisierungsregion besteht, nach Aufnahme in die Zelle in den Kern gelangen und sich dort in unmittelbarer Nähe zur DNA anreichern.

2.5 Nukleolin

Nukleolin ist ein ubiquitäres, hoch konserviertes multifunktionelles Protein mit drei unterschiedlichen Domänen und einer Promotor-Region, die es als Housekeeping-Gen ausweist. Es hat eine Größe von 77 kDa, läuft aber im SDS-Gel wegen seines negativ geladenen N-terminalen Bereiches bei 100 - 110 kDa.

Der N-Terminus zeigt in Aufbau und Funktion Homologien mit denen der HMG-Proteine. Durch ionische Interaktion mit Histon H1 führt es zur Dekondensation des Chromatins und erleichtert die Transkription. N-Terminus liegen außerdem mehrere Phosphorylierungsstellen, die in Abhängigkeit des Zellzyklus und Funktionszustandes für CKII, CDC2 und andere Phosphatasen zugänglich sind und die Spaltung in diesem Bereich begünstigen können. Umrahmt wird der N-Terminus von dem zweigeteilten nukleären Lokalisierungssignal.

Die zentrale globuläre Region mit vier RNA-Bindungsstellen führte zu seiner Einteilung in die heterogene Gruppe der RNA-bindenden Proteine. Zusammen mit dem C-terminalen Anteil, der Glycin- und Arginin-reiche Strecken enthält, bindet er außerdem ATP und Glycin-reiche DNA. Dies führt zur Kondensierung von DNA und RNA. Der c-terminale Anteil ist reich an aromatischen Aminosäuren und vermittelt unspezifische Bindung und Entfaltung von RNA sowie RNA/Protein-Interaktionen. Diese Domäne enthält außerdem Methylierungsstellen für posttranslationale Veränderungen und Proteaseaktivität, die Nucleolin zur Autokatalyse befähigt (Srivastava, 1999 #63; Ginisty, 1999 #25).

Obwohl Nukleolin hauptsächlich im Nukleolus des Zellkerns vorkommt, kann es auch im Zytoplasma und an der Zellmembran nachgewiesen werden. Posttranslationale Veränderungen wie Phosphorylierungen beeinflussen dabei sowohl die Funktion als auch seine Lokalisation innerhalb der Zelle (Hovanessian, 2000 #30).

Im Kern ist Nukleolin an der Entstehung und Reifung der rRNA beteiligt. Es besteht eine enge Verknüpfung zwischen seiner Funktion und dem Aktivitätszustand der Zelle. In proliferierenden Zellen stellt Nucleolin bis zu 10% des Proteingehaltes des Nukleolus, während seine Expression bei Zellen in der G0-Phase um das 40fache erniedrigt und zusätzlich autokatalytisch gespalten vorliegt (Bicknell, 2005 #10). Ma et al. konnten nachweisen, dass es sowohl für den strukturellen Aufbau des Nukleolus als auch während der Mitose für die Funktion des Spindelapparates und die Chromosomenbindung unerlässlich ist (Ma, 2007 #37).

Im Zytoplasma kommt Nucleolin in rRNA reichen Regionen und an Ribosomen gebunden sowie in Vesikeln vor, die einen Transport zwischen der Membran und dem Kern vermitteln (Hovanessian, 2000 #30; Ginisty, 1999 #25).

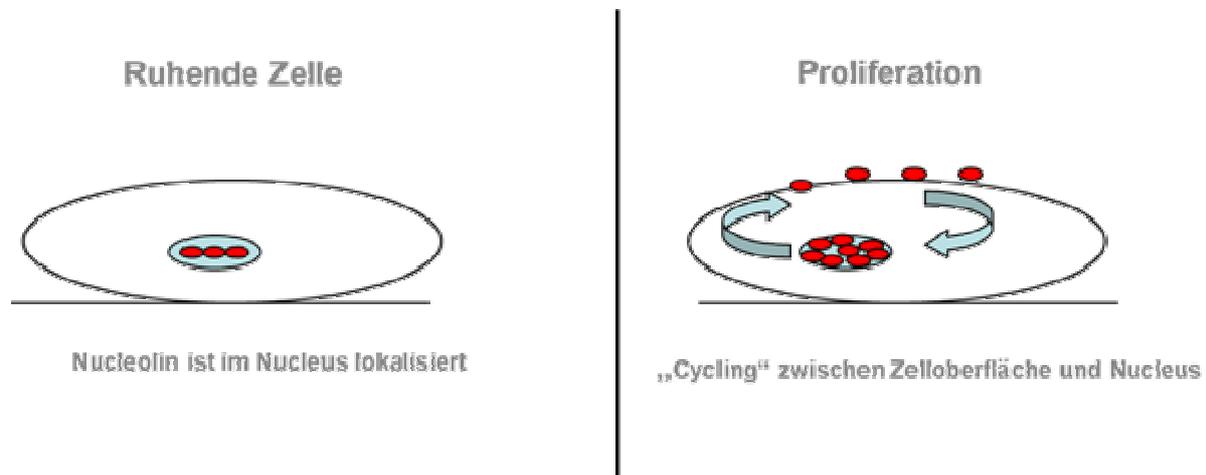


Abb. 3. Nucleolin in ruhender und proliferierender Zelle

Die Expression auf der Zelloberfläche ist bei unterschiedlichen Zelllinien nachgewiesen worden und zeigt bei Tumorzellen eine positive Korrelation zwischen Tumorwachstum und Proteinexpression (Srivastava, 1999 #63). Hovanessian et al. beschreibt ein 95 kDa großes Phosphoprotein und eine Sequenz, die dem n-terminalen Ende von Nucleolin entspricht. Es weist hier klassische Merkmale eines Membranrezeptorproteins auf und ist mit dem Zytoskelett verbunden (Hovanessian, 2000 #30).

Es wurden diverse Liganden für membranassoziiertes Nucleolin beschrieben (Hovanessian, 2006 #29; Jordan, 1994 #33; Turck, 2006 #66; de Verdugo, 1995 #22). Ein Versuch der Einteilung zeigt, dass einige Liganden mit der ECM assoziiert sind, einige Aktivierungsfaktoren der Zelle darstellen, wie etwa der Wachstumsfaktor J und Midkine, und eine dritte Gruppe viralen Ursprungs sind. Allerdings ist die Bindungsstelle für manche dieser Liganden n-terminal beschrieben (Jordan, 1994 #33; de Verdugo, 1995 #22), andere haben ihre nachgewiesene Bindungsstelle c-terminal (Bicknell, 2005 #10; Hovanessian, 2006 #29; Turck, 2006 #66). Außerdem konnte für mehrere Liganden sowohl das Volllängen- als auch ein Degradationsprodukt, meist von einer Größe zwischen 80 und 95 kDa ermittelt werden (Porkka, 2002 #47; Huang, 2006 #31). Die Internalisierung der Liganden erfolgt energieabhängig.

Von Huang et al. wurde die Bedeutung des membrangebundenen Nucleolins in angiogenen Gefäßen untersucht (Huang, 2006 #60). Anknüpfend an Hovanessian et al. (Hovanessian, 2000 #30) konnte beobachtet werden, dass Nucleolin n-terminal mit der ECM interagiert,

während es intrazellulär mit seinem c-terminalen Anteil über die nicht-Muskel-Myosin-Schwerkette MyH9 mit dem Zytoskelett assoziiert ist und so die Migration der Endothelzellen ermöglicht. Die Lokalisierung von Nucleolin an die Zellmembran wird durch Bindung an ECM und Wachstumsfaktoren gefördert, die zu einer Phosphorylierung von Nucleolin führen. Als neuer Ligand des Vollängen- und eines 80 kDa- Spaltproduktes von Nucleolin wurde Endostatin, eine globuläre Domäne von Kollagen XVIII, identifiziert, das in Tumoren antiangiogene Wirkung hat (Shi, 2007 #60).

In der Kolonkarzinom-Zelllinie Colo-320 konnte als Bindungspartner für Nucleolin P-Selektin ausgemacht werden, ein vaskuläres Adhäsionsprotein, das an der Adhäsion von Leukozyten und Thrombozyten, aber auch von Tumorzellen während der Metastasierung, beteiligt ist. Dies führt über die Phosphorylierung von Nucleolin und einer Beteiligung von PI3 und p38 MAPK zu einer Aktivierung des Integrins $\alpha5\beta1$ und einer Zunahme des Zellsreadings und der Adhäsion auf ECM (Reyes-Reyes, 2008 #52).

Zusammenfassend vereint Nucleolin viele Eigenschaften, die es als einen idealen Liganden für ein Konjugat mit einem Alpha-Emitter erscheinen lassen:

Als Housekeeping-Gen zeigt es ein ubiquitäres Vorkommen in allen Säugetierzellen. Aber während es in proliferierenden Zellen einen hohen Prozentsatz des nukleären Proteins stellt, wird es in der G0-Phase bei ausdifferenzierten Zellen deutlich herunter reguliert und außerdem autokatalytisch gespalten. Wie oben ausgeführt, deuten die Literaturdaten darauf hin, dass Nucleolin in proliferierenden Zellen außerdem an die Zellmembran transferiert wird und hier einen ständigen Austausch zwischen Kern und Zellmembran vermittelt. Durch sein Kernlokalisierungssignal können auch Substanzen, die selbst keine Kernlokalisierung vermitteln können, an Nucleolin gebunden in den Zellkern gelangen. Durch die verschiedenen spezifischen und unspezifischen Interaktionen der unterschiedlichen Anteile von Nucleolin mit DNA und RNA im Zellkern liegt es hier in unmittelbarer Nähe der für Alpha-Emitter interessanten Zielregion. So kann ein Höchstmaß an zellschädigender Wirkung entfaltet werden. Selbst während der Mitose zeigt Nucleolin eine räumliche Bindung an die DNA, indem es an der Bindung des Spindelapparates beteiligt ist.

2.6. Peritonealkarzinose als Modell eines fortgeschrittenen Tumorleidens

Die Peritonealkarzinose ist eine schwerwiegende Komplikation bei gastrointestinalen und gynäkologischen Malignomen und ist mit einer sehr schlechten Prognose verbunden. Die Mehrheit der Patienten mit Ovarialkarzinomen weisen schon bei der Diagnosestellung der

Erkrankung eine Peritonealkarzinose auf (seröse Ovarialkarzinome in 85 % der Fälle) (Tavassoli, 2003 #65) und auch duktales Pankreaskarzinome zeigen bei Diagnosestellung meist schon eine extrapancreane Ausbreitung (Bosman, 2010 #14). Auch hier ist eine der häufigsten Fernmetastasierungsorte das Peritoneum (Rosai, 2004 #53). Die 5-Jahresüberlebensraten sind in diesem Stadium der Erkrankung sehr schlecht: beim serösen Ovarialkarzinom liegt sie bei 10-20%; beim duktales Pankreaskarzinom beträgt das Überleben bei nicht resektablen Tumoren nur wenige Monate. Die Therapieoptionen für dieses Erkrankungsstadium sind limitiert. Zwar zeigen Therapieansätze bei Ovarialkarzinomen wie eine operative Zytoreduktion und intraperitoneale Chemotherapie sowie Kombinationen hiervon eine positive Korrelation mit dem Überleben der Patienten. Die Prognose wird dadurch aber nur geringfügig verändert. Häufig leiden diese Patienten außerdem an ernstesten Nebenwirkungen dieser aggressiven Therapieansätze (Gunn, 2007 #26). Die Radionuklidtherapie stellt für die Behandlung einer Peritonealkarzinose hingegen einen viel versprechenden Therapieansatz dar. Für die Tumormetastasierung in Körperhöhlen, speziell in das Peritoneum, ist eine gute Effektivität einer Radioimmuntherapie in präklinischen Studien beschrieben, da sie den Vorteil einer lokoregionären Therapie bietet, d.h. einer hohen lokalen Konzentration mit verzögerter Verteilung im Organismus, was durch die Wahl eines Nuklids mit geeigneter HWZ zu einer weiteren Verringerung der Toxizität genutzt werden kann. Die große Tumoroberfläche bietet außerdem eine maximale Kontaktfläche für spezifisch an Tumorzellen bindende Liganden.

2.7. Ziel der Arbeit

Wie oben ausgeführt, ist für das Peptid F3 eine selektive Akkumulation in Tumoren und unreifen (Tumor-) Endothelien nachgewiesen. Darüber hinaus wird es in proliferierenden Zellen in den Zellkern aufgenommen und gelangt aufgrund der Eigenschaften seines Rezeptors Nukleolin oder des Herkunftsproteins HMGN2 in die unmittelbare Nähe der DNA. Als Peptid mit nur 31 Aminosäuren kann es renal filtriert werden.

Diese Eigenschaften lassen es als einen idealen Carrier für die Verwendung von α -emittierenden Isotopen, wie ^{213}Bi , erscheinen.

Ziel der Arbeit ist es, eine geeignete Verbindung aus F3 und ^{213}Bi hinsichtlich Stabilität und Bindungseigenschaften herzustellen und die zytotoxische Wirkung in unterschiedlichen Tumorentitäten zu bestimmen.

Hierzu wurde ein Konjugat aus zwei F3-Proteinen hergestellt, welches über den Chelator DTPA an ^{213}Bi gekoppelt wurde ($^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$).

In vitro sollte zunächst dessen Bindungsaffinität, die Stabilität des Konjugates und die Tumortoxizität in unterschiedlichen Tumorentitäten getestet werden. Danach sollte die selektive Bindung, Aufnahme, Stabilität und die Wirksamkeit des Konstrukts *in vivo* nachgewiesen werden. Das Risiko von Nebenwirkungen der Therapie, insbesondere im Hinblick auf eine renale Schädigung, sollten hierbei ebenfalls untersucht werden.

Hierzu erschien uns der Einsatz des Peptids im Modell der Peritonealkarzinose aus mehreren Gründen vielversprechend. Zum einen lässt sich eine Peritonealkarzinose mittels injizierter Tumorzellen gut nachahmen. Das intraperitoneale Tumorwachstum kann zudem gut verfolgt werden, da mit Luciferase transfizierte Tumorzellen verwendet wurden, die mittels Biolumineszenz eine Darstellung der Tumorentwicklung *in vivo* ermöglicht.

Für die Behandlung der Tiere mit dem Liganden-gekoppelten Nuklid besteht hierbei außerdem ein optimaler Zugang zum Tumor. Und nicht zuletzt kann, wie oben ausgeführt, die kurze Halbwertszeit des Nuklids genutzt werden, um die Belastung des Organismus, speziell der Nieren, durch das Nuklid niedrig zu halten.

3. Material und Methoden

Alle Materialien, deren Hersteller nicht genannt werden, wurden von Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland, bezogen.

3.1 Zellkultur

Es wurden Tumorzellen der humanen Zelllinien MDA-MB-435 (humane Mammakarzinom-Zelllinie), MIAPACA (humane Pankreaskarzinom-Zelllinie), OVCAR3 (humane Ovarialkarzinom-Zelllinie) und CMT63 (humane Kolonkarzinom-Zelllinie) verwendet.

Diese Zelllinien wurden in RPMI 1640 Medium (Biochrom, Berlin, Deutschland) mit 1 % Penicillin/Streptomycin (10 000 u/10 000 µg/ml, Biochrom), 1 % Gentamycin (Biochrom), 1 % L- Glutamin (200mM, Biochrom) und 10 % fötalem Kälberserum (FCS, Biochrom) kultiviert.

Als murine Zelllinie kam die Brustkrebszelllinie EMT6 zur Anwendung. Diese wurde in Waymouth Medium (GIBCO, Karlsruhe, Deutschland) mit 10 % FCS und 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert.

Ein Mediumwechsel erfolgte alle ein bis zwei Tage; eine Passage der Zellen wurde bei deren Konfluenz vorgenommen.

Zur Passage wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit Trypsin-EDTA (0,05% / 0,02% (w/v)), Biochrom) an der Sterilbank (LaminAir HB 2472, Heraeus, Wehrheim, Deutschland) abgelöst. Das Trypsin wurde mit Kulturmedium inaktiviert und die Zellen bei 300xg drei Minuten bei Raumtemperatur abzentrifugiert. In Kulturmedium resuspendiert wurden sie dann zur weiteren Kultivierung in neue Kulturflaschen verteilt und im Inkubator (Heraeus Typ bb6220) bei 37°C, 5 % CO₂ und 10 % O₂ verwahrt.

Zur Anlage eines Zellvorrates wurden die Zellen nach der Pelletierung in 1 ml kaltem DMSO-Gefriermedium (Bio-Veris, Witney, UK) pro Kulturflasche (oder 1*10⁷ Zellen) resuspendiert und eingefroren (2-16 h bei -20°C, 2-16 h bei -80°C, dann flüssiger Stickstoff). Um tiefgefrorene Zellen in Kultur zu bringen, wurden diese im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, einmal mit 10 ml Kulturmedium gewaschen und ausgesät.

Zellen der Zelllinie MDA-MB-435 wurden außerdem in mit Luc2- transfiziertem Zustand verwendet. Luciferasen der Feuerfliege (*Photinus pyralis*) sind Proteine, die die Fähigkeit haben, durch Oxygenierung von Benzothiazol Licht einer Wellenlänge von im Maximum 560 nm zu emittieren (Hastings, 1996 #27). Durch Transfektion von Tumorzellen mit Luciferase-Genen und dem Zuführen von Luciferin können diese Zellen dann Licht einer definierten

Wellenlänge emittieren, welches durch das Gewebe detektiert werden kann. Hierbei zeigen Vergleiche mit der makroskopischen Ausdehnung, aber auch mit anderen bildgebenden Verfahren wie MRT eine gute Korrelation zwischen Tumorgröße und Lichtemission (Buchhorn, 2007 #16; Rehemtulla, 2000 #50).

Die stabile Transfektion mit dem Gen der Feuerfliegen-Luciferase wurde dankenswerterweise von Florian Gaertner aus unserer Arbeitsgruppe durchgeführt. Die Kodierungssequenz der Luciferase wurde hierzu aus dem Basisvektor pGL4.14 (Promega, USA) isoliert und in den Expressionsvektor p3XFLAG-CMV5 legiert. Die Transfektion der konfluenten MDA-MB-435-Zellen erfolgte nach den Angaben des Herstellers; die Selektion durch Zugabe von Hygromycin B (50mg/ml, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). Die Vollständigkeit des Inserts wurde durch Sequenzierung (MWG, Ebersberg, Deutschland) bestätigt. Die Zellen wurden in RPMI 1640 Medium mit 10% FCS, 1% Pen/Strep, 1% Gentamycin, 1% L-Glutamin und 0,2 % Hygromycin B kultiviert.

3.2 Markierungen

3.2.1 Synthese und Markierung von DTPA-(F3)₂ mit ²¹³Bi

Zur Markierung mit Radiometallen wurde das Dimer DTPA-(F3)₂ synthetisiert (GenScript Corporation, Piscataway, NJ). Hierbei wurde ein DTPA an den N-Terminus zweier F3-Peptide kovalent gebunden.

²¹³Bi wurde aus einem ²²⁵Ac/²¹³Bi-Generator gewonnen, der uns vom Institut für Transurium-Elemente (Europäischen Kommission, Eggenstein, Leopoldshafen, Deutschland) zur Verfügung gestellt wurde. ²²⁵Ac zerfällt durch α/γ -Zerfall mit einer HWZ von 10 Tagen über zwei kurzlebige Zwischenprodukte (¹¹⁷Ac und ²²¹Fr) zu ²¹³Bi, das in zweistündigen Intervallen aus dem Generator durch eine 1:1-Mischung von 0,2 M NaI und 0,2 M HCl (Merck, Darmstadt, Deutschland) in einem Volumen von 0,6 ml eluiert werden kann. Nach jeder Eluierung wurde das Kationenaustauscherharz durch waschen mit 2 ml einer 0,01 M HCl-Lösung equilibriert. Das Eluat wurde mit 100 μ l Vitamin C (40 mg/ml) und 100 μ l NaH₄Ac (3 M, pH 5,3) abgepuffert und der pH-Wert mit 1 M NaOH auf 5,5- 6 eingestellt (Beck, 2007 #5).

Die Radiomarkierung erfolgte durch Zugabe des Proteins in H₂O (3,3 μ g/mCi). Wegen der geringen Halbwertszeit des Nuklids von 45,6 Minuten wurde zur Verwendung des markierten Peptids die gewünschte Konzentration mit dem Zerfallsfaktor des Nuklids korrigiert.

Die Inkubationszeit der Radiomarkierung betrug 10 Minuten bei Raumtemperatur.

Die Qualitätskontrolle der Markierung erfolgte durch Dünnschichtchromatographie von 1-2 μ l des Markierungsprodukts auf ITLC-Papier (Silicagel-imprägniertes Glasfaser-Papier, Gelman Sciences, Ann Arbor, MI, USA) in Laufmittel Tri-Natrium-Citrat-Dihydrat (0,05M, pH 5,5) und anschließender Auswertung im γ -Counter.

Wegen der geringen Größe des Peptids von 7,549 kDa war eine Reinigung durch größenabhängige Chromatographie nicht möglich; die notwendige Proteinmenge für eine spezifische Markierung von > 90% wurde in einem Vorversuch ermittelt.

Zur Verwendung wurde das Markierungsprodukt mit PBS (Merck, Darmstadt, Deutschland) abgepuffert; bei Versuchen *in vivo* erfolgte eine sterile Filtration vor Chromatographie.

3.2.2 Stabilität des ^{213}Bi -DTPA-(F3) $_2$ in Serum und Medium *in vitro*

Das mit ^{213}Bi markierte Protein wurde in einem Verhältnis von 1:10 mit PBS, Zellkulturmedium, Mäuseserum und malignem Aszites von Mäusen mit intraperitonealen MDA-MB-435-Xenografts gemischt und bei 37°C inkubiert. Nach 1/2, einer, zwei und vier HWZ wurde mittels Dünnschichtchromatographie und Messung im γ -Counter die spezifische Aktivität ermittelt.

3.2.3 Markierung von DTPA-(F3) $_2$ mit ^{68}Ga

Die ^{68}Ga -Markierung wurde dankenswerterweise von Dr. Thorsten Poethko aus der Radiopharmazeutischen Chemie der Nuklearmedizinischen Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München durchgeführt.

Bei ^{68}Ga handelt es sich um einen hauptsächlich γ -Partikel-Emitter (5% β^+ -Positronen) mit einem Energiebereich von ca. 0,511 MeV und einer HWZ von 68 Minuten. Es wurde aus einem $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generator (IsoTrade, Mönchengladbach, Germany) gewonnen. ^{68}Ga wurde mit 2 ml 0,1 N HCl eluiert, auf einen pH-Wert von 4,6 durch Zugabe von Natriumacetat eingestellt (0,4 M Lösung) und durch Zugabe von HEPES auf eine 1 M Lösung und einen pH von 4,2 eingestellt (Breeman, 2005 #15).

Dann wurden 10 μg DTPA-(F3) $_2$ zugegeben und bei Raumtemperatur zehn Minuten inkubiert.

Die Qualitätskontrolle erfolgte an der steril filtrierten Lösung durch eine dünnschichtchromatographische Untersuchung in 0,1 M Natriumcitrat (Natriumcitrat-

Dihydrat, Merck) und als Kontrolle in 0,1 M Ammoniumacetat/Methanol (50/50 v/v). Hierbei wurden Verunreinigungen und nicht gebundenes ^{68}Ga detektiert. Zusätzlich wurde eingangs eine Qualitätskontrolle mit einem Gradienten-HPLC-System (Beckman, Fullerton, CA, USA) durchgeführt. Hierbei erfolgt eine Detektion sowie Abtrennung etwaiger Verunreinigungen mittels einer RP-Säule (Vydac, RP 300 HPLC column). Die Datenanalyse wurde mit dem Beckman System Gold Nouveau Chromatography Software Package durchgeführt. Als Gradientensystem wurde in der HPLC benutzt:

a) 10mM TFA= Trifluoressigsäure (Merck);

b) 70% Acetonitril (MeCN, Merck), 30% H_2O , 10mM TFA mit UV-Detektion bei 220 nm.

Mittels γ -Counter wurde die Gesamtaktivität der Probe ermittelt. Verwendung fanden Markierungen mit einer >90% spezifischen Aktivität.

3.3 Aufnahme und Verteilung von $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ *in vitro*

3.3.1 Blockierung der Ligandenbindung von $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ durch unmarkiertes DTPA-(F3)_2

EMT6-Zellen wurden auf sterilen Glasplättchen in 6-well-plates ausgesät. Die konfluenten Zellen wurden mit PBS gewaschen und dann mit 40 ng/ml $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ mit oder ohne vorherigen Zusatz von 400 ng/ml DTPA-(F3)_2 für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Coverslips wurden dann drei Mal mit PBS gewaschen und die verbleibende Aktivität mit einem Micro-Imager (μ -ImagerTM, Biospace, Deutschland) bestimmt.

3.3.2 Internalisierung und Zellfraktionierung *in vitro*

1×10^7 MDA-MB-435-Zellen in einem 6-well (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) wurden mit 1,85 MBq $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ (33ng/ml DTPA-(F3)_2) und als Kontrolle mit freiem ^{213}Bi in gleicher Konzentration über 5, 10, 20, 45 und 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Für jede Inkubationszeit wurden zwei Proben verwendet. Nach der Inkubationszeit wurde der Überstand abgenommen und die Zellen auf Eis dreimal mit 5 ml kaltem PBS gewaschen. PBS und Überstand wurden gepoolt. Die Zellen wurden mit 4 ml eiskaltem Nuclei EZ Lysis Buffer (Nuclei EZ Prep Nuclei Isolation Kit, Sigma) für 5-10 Minuten inkubiert, die Zellen mit einem Cell-Scraper abgenommen, gemischt und in ein 15 ml Falcon (BD Laboratories Inc.,

LA, CA) überführt. Nach 5 Minuten auf Eis wurde die Zelllösung bei 500xg zentrifugiert, der klare Überstand abgenommen (entspricht den äußeren Zellanteilen= Zellmembran und Zytoplasma) und das Pellet in Lysepuffer resuspendiert. Dies wurde drei Mal wiederholt; nach dem dritten Waschschrift wurde das Pellet aus Zellkernen in 200 µl Nuclei EZ Storage Buffer resuspendiert. Die Überstände des Lysepuffers, die Zytoplasma- und Membrananteile enthalten, wurden gepoolt. Die Integrität und Anzahl der Zellkerne wurde mittels Mikroskop und Hämatocytozometer bestimmt. Die Überstände und die Kernlösung sowie der Überstand aus Medium und den Waschschriften mit kaltem PBS wurden im γ -Counter gemessen und auf die Zell-, bzw. Kernzahl umgerechnet.

Das Gesamtvolumen sowie das Kernvolumen der MDA-MB-435 Zellen wurde anhand von kultivierten MDA-MB-435-Zellen mithilfe des Zellzählers Casy1 (Modell TT, Schärfe System, Reutlingen, Deutschland) ermittelt. Als Standardwerte für das Volumen dienten die mittleren Volumenwerte der Kerne; für das Volumen der äußeren Zellkompartimente wurde das mittlere Kernvolumen vom mittleren Zellvolumen subtrahiert.

3.4 Wirkung von ^{213}Bi -markiertem F3 auf Tumorzellen *in vitro*

3.4.1 Cell Viability Test

1×10^6 MDA-MB-435-luc2 Zellen wurden pro 6-Well (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) ausgesät und nach vier Stunden für die Zelladhärenz mit ^{213}Bi -DTPA-(F3)₂ in aufsteigender Konzentration (46,25/ 92,5/ 277/ 462,5 und 925 kBq/ml) inkubiert; als Kontrolle diente freies Wismut in gleicher Konzentration. Nach ein, drei und fünf Tagen Inkubationszeit wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst, einmal mit PBS gewaschen, und die Zellzahl mithilfe einer Neubauer Zählkammer ermittelt. Der Anteil an toten Zellen konnte nach zehnminütiger Inkubation mit einer 0,4 % Trypan Blau Lösung (Sigma) im Mischungsverhältnis 1:1 bestimmt werden. Für jede Konzentration wurden 2fach Werte verwendet (ProtocolOnline, #48).

3.4.2 Klonogener Assay mit ^{213}Bi -DTPA-(F3)₂

1×10^5 Zellen der Zelllinien MDA-MB-435, OvCar3, CMT6 und MIAPACA wurden in Kulturmedium mit ^{213}Bi -DTPA-(F3)₂ in aufsteigender Konzentration (46,25; 92,5; 277; 462,5; 925 kBq/ml) über 24 Stunden inkubiert; als Kontrolle der unspezifischen Toxizität

wurde ^{213}Bi in gleichen Konzentrationen eingesetzt. Eine unbehandelte Kontrolle wurde ebenfalls mitgeführt.

Im Anschluss daran erfolgte der Colony Formation Assay. Den Angaben des Herstellers gemäß wurde hierzu aus RPMI 1460 Trockenmedium (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) zweifach-Medium hergestellt, steril filtriert (FP 30/0,2 Ca-S, Schleicher & Schüll, Dassel, Deutschland) und entsprechend den Flüssigmedien mit den für diese Zelllinie notwendigen Zusätzen in doppelter Konzentration versetzt. 1% Base Agar und 0,7% Top Agarose wurden in der Mikrowelle aufgelöst und erwärmt und im Wasserbad auf 45 °C abgekühlt. Base Agar wurde im Verhältnis 1:1 mit dem zweifach Medium versetzt und je 1,5 ml pro Well in einer 6-well-Platte auspipettiert und auf Raumtemperatur abgekühlt.

Die vorbehandelten Tumorzellen wurden mit Trypsin/EDTA gelöst, mit PBS gewaschen und auf $2 \cdot 10^5$ Zellen/ml verdünnt. Hiervon wurden je 200 μl á 40 000 Zellen in ein 15 ml Falcon überführt und mit je 3 ml 2fach-Medium und Top Agarose sorgfältig gemischt.

Je 1,5 ml á 10 000 Zellen wurden pro 6-well auf das Base Agar gegeben, bei Raumtemperatur zum Stocken gebracht und anschließend im Brutschrank bei 37°C 10-14 Tage verwahrt. Mit 500 μl pro Well 0,005% Kresylviolett-Lösung wurden die Kolonien dann für mindestens eine Stunde angefärbt und 20 Gesichtsfelder/Well bei 1,5facher Vergrößerung unterm Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) ausgezählt (StuartLab., #64).

3.5 Aufnahme und Verteilung *in vivo*

3.5.1 Tierexperimentelle Richtlinien

Die Tierexperimente wurden nach den Richtlinien des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und von der Regierung von Oberbayern genehmigt und beaufsichtigt (Reg.- Nr. 55.2-1-54-22531-34-02 und 55.2-1-54-2531-52-07).

Die Entscheidung zur Euthanasie von Mäusen mit Xenograft-Tumoren erfolgte nach den Richtlinien der GV-Solas (Gesellschaft für Versuchstiere) und der TVT (Tierärztliche Vereinigung für Tierschutz). Hierzu zählen im Allgemeinen eine Exulzeration des Tumors, Gewichtsverlust der Maus von über 25% (bedingt durch Tumorwachstum), auffälliges Verhalten im Sinne von Apathie oder Atembeschwerden und eingeschränkte Hygiene oder Futteraufnahme; im Speziellen bei einer Peritonealkarzinose außerdem durch Aszites hervorgerufene deutliche Vorwölbung der Bauchdecke (TVT, #67).

3.5.2 Modell einer beginnenden und einer fortgeschrittenen Peritonealkarzinose

Zur Gewinnung von Xenograft-Tumoren in Mäusen wurden SCID-Mäuse (C.B-17/lcrCrl-scid Charles River, Sulzfeld, Deutschland) in einem Alter von 6-8 Wochen und einem Gewicht von ca. 20 g genutzt. Aufgrund einer Mutation im Gen-Rearrangement von Immunglobulinen und T-Zellrezeptoren ist sowohl die Differenzierung der B- als auch der T-Zellen dieser Mäuse gestört mit dem Resultat eines fast vollständigen Ausfalls des Immunsystems.

Zur Erzeugung von Tumoren wurden MDA-MB-435-Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst, bei 300xg bei Raumtemperatur abgetrennt und einmal mit 10 ml kaltem PBS gewaschen. $1 \cdot 10^7$ Zellen wurden in 100 μ l PBS den Mäusen als Xenograft intraperitoneal injiziert.

Als Frühstadium einer Peritonealkarzinose wurde ein Zeitpunkt vier Tage nach Inokulation mit Tumorzellen definiert; hier ist davon aus zu gehen, dass die Tumorzellen an der Serosa adhären sind und bereits beginnen zu proliferieren. Das fortgeschrittene Stadium wurde auf 16 Tage nach Injektion der Zellen festgelegt. Hier liegt bereits meist ein leichter Aszites vor.

3.5.3 Biodistribution von $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ in Mäusen mit und ohne Peritonealkarzinose

$^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ (3,7 MBq) wurde in einem Volumen von 100 μ l Mäusen mit intraperitonealen Xenograft-Tumoren (10 Tage nach Inokulation der Tumorzellen) injiziert. Eine Maus ohne Tumor diente als Kontrolle.

Nach einer HWZ des Nuklids wurden die Tiere mittels CO_2 -Narkose getötet, die Organe (Blut, Herz, Lunge, Tumor, Leber, Nieren, Gehirn, Muskel, Haut, Magen, Dünndarm, Dickdarm) entnommen, mit PBS gewaschen, gewogen und die Nuklidlast pro Gramm Gewebe mittels γ -Counter gemessen. Alle Werte wurden auf den Injektionsstandard bezogen.

3.5.4 Autoradiographie und Histologie von intraperitoneal gelegenen Tumoren

Tumortragende Mäuse (20 Tage p.i.) bekamen eine einmalige intraperitoneale Injektion mit 3,7 MBq $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ i. p. Nach einer Inkubationszeit von einer HWZ wurden die Mäuse mittels CO_2 -Narkose getötet und intraperitoneal gelegene Tumoranteile und die Kontrollorgane entfernt. Das Gewebe wurde gründlich mit PBS gespült, in flüssigem Stickstoff gefroren und 10 μ m dicke Gefrierschnitte des Gewebes (HM 500 O, Microm,

Deutschland) angefertigt. Die Schnitte wurden dann in einem Micro-Imager (μ Imager, Biospace, Deutschland) über 24 Stunden ausgewertet.

Für die korrespondierende histomorphologische Darstellung des Gewebes in einer HE-Färbung wurden angrenzend an die Schnitte für den Micro-Imager 7 μ m dicke Schnitte angefertigt, mit 3,7 % Formalin fixiert und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt.

3.5.5 PET mit $^{68}\text{Ga-DTPA-(F3)}_2$ mit und ohne intraperitonealen MDA-MB-435-luc2-Xenograft

Mittels Positronen-Emissions-Tomographie wurde die Anreicherung von ^{68}Ga -markiertem DTPA-(F3)₂ einer SCID-Maus 20 Tage nach Injektion eines MDA-MB-435-luc2-Xenografts i.p. mit einer Maus ohne intraperitonealen Tumor verglichen, indem beide Tiere eine Injektion mit 7,4 MBq $^{68}\text{Ga-DTPA-(F3)}_2$ i. p. in einem Volumen von 100 μ l erhielten.

Nach 90 Minuten Zirkulationszeit erfolgte eine statische Aufnahme der Tracer-Verteilung *in vivo* im Tier-PET (MicroPET Focus 120, Siemens, Deutschland) unter Isofluran-Narkose (Einleitung: Isofluran 3,0%, O₂ 4l/min. = 100% in der Einleitungskammer, im Gerät: Isofluran 1,5 Vol.%, O₂ 2l/min. über Nasenkonus). Um eine Hypothermie der Tiere zu vermeiden wurde während der Aufnahmen ein Heizstrahler eingesetzt.

Die Bearbeitung der Bilder erfolgte mit der Software Osirix™.

3.6 Wirkung von $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ *in vivo*

3.6.1 Fragmentierte Therapie von intraperitonealen Xenograft-Tumoren mit $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$

SCID-Mäusen wurden 1 x 10⁷ MDA-MB-435-luc2 Zellen i.p. injiziert.

In Versuchen von Beck et al. mit einem intraperitoneal injizierten ^{213}Bi -Immunkonjugates war eine Einzeldosis von 50 μ Ci pro Versuchstier hinsichtlich der Verlängerung der Überlebenszeit am effektivsten; eine Dosis von 800 μ Ci i.p. hatte toxische Auswirkungen, die sich hauptsächlich in der Entwicklung eines chronischen Nierenschadens zeigten. Eine Dosis von 200 μ Ci zeigte in diesem Versuch keinerlei toxische Nebenwirkung (Beck, 2007 #47).

Darauf Bezug nehmend setzten wir eine Gesamtdosis von 300 μ Ci (11,1 MBq) pro Maus ein, aufgeteilt in sechs Einzeldosen von 50 μ Ci/Maus (1,85 MBq).

Im Modell der beginnenden Peritonealkarzinose wurde die Therapie am 4. Tag nach der Xenograft-Injektion begonnen. Hierzu wurden 1,85 MBq $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ in einem Volumen von 100 μl i. p. in einem Abstand von zwei Tagen injiziert bis zu einer Gesamtaktivität von 11,1 MBq pro Tier (6 x 1,85 MBq $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ pro Tier jeden zweiten Tag). Als Kontrolle der unspezifischen Radiotoxizität von ^{213}Bi wurde Mäusen einer Kontrollgruppe zu gleichen Zeitpunkten 1,85 MBq $^{213}\text{Bi-DTPA}$ injiziert, als Negativkontrolle diente PBS (100 μl). Pro Gruppe wurden acht Tiere verwendet.

Im Modell der fortgeschrittenen Peritonealkarzinose wurde die fraktionierte Therapie von 6 x 1,85 MBq $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ pro Tier jeden zweiten Tag 16 Tage nach Inokulation der MDA-MB-435-luc2-Zellen begonnen. Die Kontrollen entsprechen denen der frühen Peritonealkarzinose; sie wurden ebenfalls zu den gleichen Zeitpunkten wie die $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ -Tiere behandelt. Pro Gruppe wurden in diesem Versuch sechs Tiere verwendet.

Die Tiere wurden bis zu ihrem Tod täglich kontrolliert und wöchentlich gewogen. Die Entscheidung zur Euthanasie erfolgte nach den Richtlinien der GV-Solas (Gesellschaft für Versuchstiere) und der TVT (Tierärztliche Vereinigung für Tierschutz) (TVT, #67). Die Tiere wurden mittels CO_2 -Narkose geopfert.

Die Auswertung der Überlebenszeiten erfolgte durch die Kaplan-Meier-Methode.

Für eine Analyse der Nierenparameter wurde nach der Euthanasie der Tiere Blut entnommen und bei maximaler Geschwindigkeit bei 4 °C für zehn Minuten mit der Tischzentrifuge (Biofuge fresco, Heraeus, Hanau, Deutschland) abzentrifugiert. Das so gewonnene Serum wurde zunächst bei -20°C verwahrt. Nach Beendigung der Versuche konnten die Nierenparameter Creatinin und Harnstoff von sieben Mäusen aus Therapie- und Kontrollgruppen in der klinischen Chemie der Technischen Universität München ausgewertet werden.

3.6.2 *In vivo* Biolumineszenz Imaging zur Darstellung der Peritonealkarzinose nach $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ gegenüber DTPA- ^{213}Bi -Therapie und PBS-Kontrolle in SCID-Mäusen

Die Biolumineszenz der mit Luciferase stabil transfizierten MDA-MB-435-Zellen wurde zunächst *in vitro* durch Aussaat der Zellen in aufsteigender Konzentration ($1 \cdot 10^2$ - $1 \cdot 10^6$ /well) in einer schwarzen 96-Well-Platte überprüft. Zehn Minuten nach Zugabe von 10 μl D-Luciferin (15mg/ml, Synchem, Deutschland) wurde die Lichtemission mit zwei unterschiedlichen Belichtungszeiten (60 und 100 Sekunden) gemessen.

In vivo-Biolumineszenz-Bilder erfolgten begleitend zur fraktionierten Therapie mit ^{213}Bi -DTPA-(F3)₂ bei dem Modell der frühen sowie der fortgeschrittenen Peritonealkarzinose (4. und 16 Tag p.i.). Beim Modell der frühen PC wurde die Darstellung der Tumorlast mittels Optical Imaging anhand von je zwei Tieren aus Therapie- und Kontrollgruppe durchgeführt; bei dem Modell der späten PC an je drei Tieren aus allen drei Gruppen. Das Optical Imaging wurde einen Tag vor, in der Mitte und einen Tag nach Beendigung der fraktionierten Therapie sowie im weiteren Verlauf mindestens 2 weitere Male angewandt.

Zehn Minuten vor der Messung der Biolumineszenz wurden 300 µl D-Luciferin (15 mg/ml) mit je 100 µl/g Anästhetikum pro Tier i.p. injiziert (10% Ketavet, Pharmacia & Upjohn, 8% Rompun Bayer, und 82% NaCl). Die Aufnahme der Tiere erfolgten in Rückenlage in einer Dunkelkammer mittels gekühlter CCD-Kamera gekoppelt an einen Lichtverstärker (Hamamatsu, Herrsching, Deutschland). Zunächst wurde ein Hellbild der Maus aufgenommen; danach folgten die Biolumineszenz-Aufnahmen in mehreren Belichtungszeiten (30, 60 Sekunden) und unterschiedlicher Verstärkung. Zur Standardisierung der Messwerte wurde eine Leuchtdiode mit festgelegter Lichtemission gleichen Belichtungszeiten (30, 60 Sekunden) und Verstärkungen mitgemessen.

Die Auswertung der Bilder erfolgte durch Überlagerung des Hellbildes mit dem Biolumineszenz-Signal in Form eines Pseudocolour-Spektrums (SimplePCI, Hamamatsu, Herrsching) und durch Quantifizierung der Lichtemission mit dem frei erhältlichen Bearbeitungsprogramm OpiQ. Hierbei wurde die relative Lichtemission durch Subtraktion des Hintergrundsignals vom Signal der Lumineszenz bestimmt. Durch den Standard konnte eine gleichbleibende Aufnahmeintensität gewährleistet werden.

3.6.3 Makroskopische Reduktion der Tumorlast *in vivo*

Zwei SCID-Mäuse mit intraperitonealen Xenograft-Tumoren wurden von Tag 4-14 nach Inokulation der Tumorzellen (Modell der frühen Peritonealkarzinose) mit 6 x 1,85 MBq ^{213}Bi -DTPA-(F3)₂ behandelt, zwei Kontrolltiere mit 6 x PBS im gleichen Volumen (100µl). 50 Tage nach Inokulation wurden die Tiere mittels CO₂-Narkose getötet und Dick- und Dünndarm mit Mesenterium wurden zum makroskopischen Vergleich der Tumorlast präpariert und fotografiert.

3.7 Statistische Signifikanz

Statistische Signifikanzen wurden für die Überlebensversuche mit dem Student t-Tests berechnet, sofern $n_1=n_2$. Bei ungleichen Gruppengrößen wurde der t-Test nach Lord und Moore angewandt. Die Kaplan-Meier-Kurven wurden mithilfe des Log-Rank-Tests berechnet.

4. Ergebnisse

4.1 Markierung von DTPA-(F3)₂ mit Radiometallen

Um das Peptid F3 an Radiometalle wie den α -Emitter ^{213}Bi binden zu können, wurde ein Dimer synthetisiert, das aus einem jeweils N-terminal kovalent gebundenem DTPA und zwei F3-Peptiden besteht (Abb.4). DTPA ist ein Komplexbildner, der aufgrund seiner freien Elektronenpaare fähig ist, mehrfach positiv geladene Metallionen zu binden. Die daraus resultierende koordinative Bindung ist gut wasserlöslich und hinsichtlich der Stabilität der einer kovalenten Bindung gleichzusetzen.

Bei der Markierung von DTPA-(F3)₂ mit ^{213}Bi unter Verwendung von 5,5 MBq/ μg Protein wurde eine spezifische Aktivität von 95,49 % \pm 2,44 % erreicht; für die Kontrolle *in vivo* mit DTPA- ^{213}Bi bei 7,4 MBq/mg Protein 96,8 \pm 2,21%.

^{213}Bi -DTPA-(F3)₂ zeigte über 180 Minuten (4 Halbwertszeiten von ^{213}Bi) bei 37°C eine weitgehend gleichbleibende Stabilität der spezifischen Bindung in PBS und malignem Aszites, während die spezifische Bindung im Serum in diesem Zeitraum um 15,3 \pm 3,06 % und in Medium mit 10% FCS um 18,89 % abnahm (Tabelle 1).

Das Radiometall ^{68}Ga wurde ebenfalls an DTPA-(F3)₂ (13,7 MBq/ μg) gekoppelt mit einer spezifischen Aktivität von 94,37 \pm 3,3%.

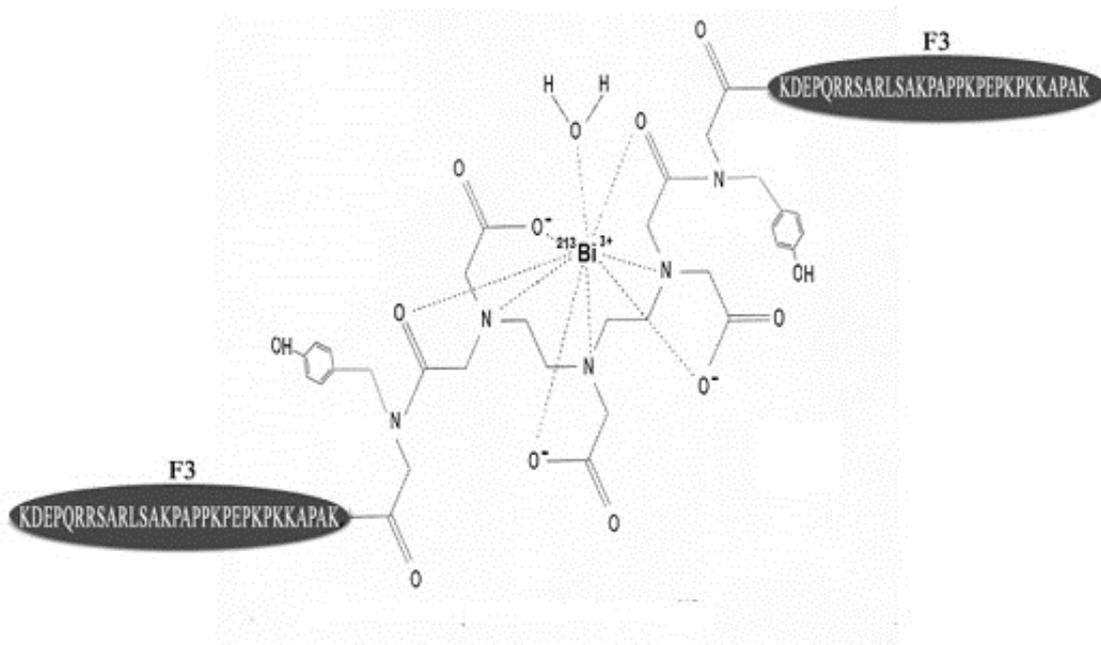


Abb.4. Struktur von ^{213}Bi -DTPA-(F3)₂. Die zwei F3-Peptide sind jeweils N-terminal an das zentrale DTPA gebunden.

Minuten	0	23 (1/2 HWZ)	45 (1 HWZ)	90 (2 HWZ)	180 (4 HWZ)
PBS	97,45 +/- 0,27	95,79	94,82 +/-5,03	91,56 +/-9,32	97,32 +/-1,21
Medium (10% FKS)	96,44 +/- 1,71	97,44	95,40 +/- 2,83	89,60 +/-8,34	88,80
Serum (Maus)	96,44 +/- 1,71	97,17 +/- 0,05	94,30 +/-0,26	87,79 +/-3,1	82,15 +/- 2,79
MalignerAszites (Maus)	97,45 +/- 0,27	98,81 +/-0,4	97,80 +/-0,58	97,47 +/-1,29	96,44 +/-0,10

Tab. 1. Die Tabelle zeigt den gebundenen Anteil von $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ in Prozent der Gesamtaktivität der Proben in verschiedenen Lösungsmitteln bei 37°C im Zeitverlauf, angegeben als Mittelwert aller Messungen (und Standardabweichung).

4.2 Bindung und Internalisierung von $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ *in vitro*

Porkka et al. berichteten von der Internalisierung von F3 und F3-Konstrukten in den Zellkern von Tumorzellen und Tumorendothelien *in vitro* und *in vivo* (Porkka, 2002 #28). Um die Fähigkeit zur Internalisierung des gebundenen Radionuklids in die Zellen zu überprüfen, wurden MDA-MB-435-Zellen mit $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ inkubiert. Nach den in Abb. 5 gezeigten Inkubationszeiten wurden die Zellkerne der Tumorzellen vom Überstand und den übrigen Zellanteilen abgetrennt und die Aktivität bezogen auf das Volumen in den unterschiedlichen Zellkompartimenten und im Überstand bestimmt.

Wie in Abb. 5 gezeigt, wurde in den Zellkernen eine bis zu 200fache, in den übrigen Zellanteilen eine bis zu 30fache Anreicherung der Aktivität/ μl im Vergleich zum Überstand erreicht. Diese Maximalwerte lagen schon nach fünf Minuten Inkubationszeit vor, aber auch nach einer Inkubationszeit von 90 Minuten bzw. zwei HWZ von ^{213}Bi war eine Akkumulation des Radionuklids im Zellkern des über 70fachen des Überstandes pro μl nachweisbar.

Um zu testen, ob die Aufnahme und Akkumulation von $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ in die Tumorzellen spezifisch erfolgt, wurde die Blockierung der Bindung und Internalisierung von $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ durch vorherige Zugabe eines Überschusses an unmarkiertem DTPA-(F3) $_2$ *in vitro* untersucht. Hierzu wurden EMT6-Zellen auf Coverslips mit $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ über 30 Minuten inkubiert und zwar einmal mit und ein anderes Mal ohne vorherige Zugabe von unmarkiertem Protein. Nach gründlicher Entfernung ungebundenen Peptids durch mehrmaliges Waschen der Coverslips mit PBS wurde die gebundene Aktivität mittels Micro-Imager sichtbar gemacht.

Wie im Einschub der Abb. 5 gezeigt, konnte die Bindung durch einen Überschuss an unmarkiertem Protein deutlich blockiert werden.

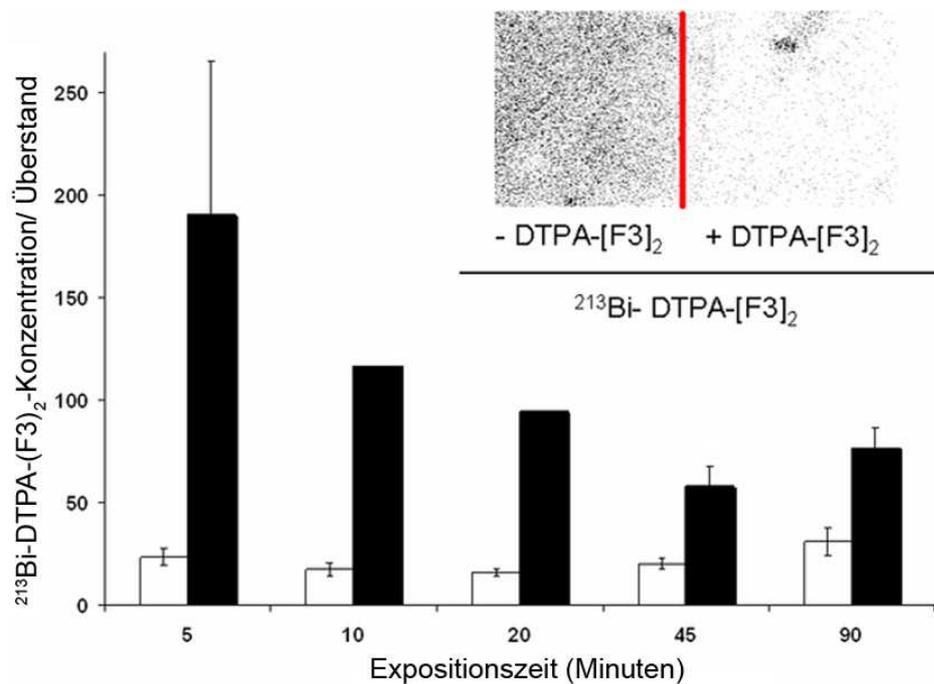


Abb. 5. Internalisierung von $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ in die Tumorzellen (MDA-MB-435) *in vitro*. Die Konzentration des Nuklids im Zytoplasma und im Zellkern der Tumorzellen wurde nach Inkubation mit 3,7 MBq/ml $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ über die oben angegebenen Zeiträume gemessen und mit denen im Überstand verglichen. Die weißen Balken entsprechen der Radioaktivität im Zytoplasma in % vom Überstand in μl ($p < 0,01$, +/-SEM); die schwarzen Balken der Radioaktivität innerhalb der Zellkerne ($p < 0,02$ von 5-45 Minuten, +/-SEM). Der Einschub der Abbildung zeigt den Anteil von $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ im Micro-Imager an, der an Tumorzellen (EMT6) mit und ohne vorherige Zugabe von DTPA-(F3)_2 gebunden wurde.

4.3 Wirkung von $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ *in vitro*

Da gezeigt werden konnte, dass F3 an Tumorzellen spezifisch bindet, daraufhin internalisiert wird und danach intrazellulär akkumuliert, wollten wir das zytotoxische Potential des an F3 gebundenen α -Emitters untersuchen.

Zu diesem Zweck wurde der Colony Formation Assay mit aufsteigenden Konzentrationen von $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine hoch signifikante ($p < 0,01$), dosisabhängige Reduktion der Tumorzellklone von MDA-MB-435-Zellen. $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ konnte darüber hinaus auch bei allen weiteren getesteten Tumorzelllinien solider Tumore, die häufig zu einer Peritonealkarzinose führen, wie MIAPACA (Pankreaskarzinom), CMT63 (Kolonkar-

zinom) und OvCAR3 (Ovarialzellkarzinom), zu einer dosisabhängigen Reduktion der Zellzahl führen. In Tabelle 2 sind die ED50- Werte für die getesteten Zelllinien angegeben, d.h. die Aktivitätskonzentration von $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ in kBq/ml, die zu einer Reduktion der Tumorzellklone von 50 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle führte.

Zelllinie	Tumorentität	ED 50 von $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ (kBq/ml)
EMT6	Mammakarzinom (murin)	23,9
MIAPACA	Pankreaskarzinom (human)	32,3
CMT93	Kolonkarzinom(human)	99,5
OVCAR3	Ovarialkarzinom(human)	94,0
MDA-MB-435	Mammakarzinom(human)	119

Tab. 2. ED50 Werte von $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ bei unterschiedlichen Tumorzellen. Für die getesteten Tumorzelllinien wurde die Aktivität von $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ in kBq/ml ermittelt, die zu einer Reduktion der Zellklone von 50% führten (ED50).

Der spezifische zytotoxische Effekt von $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ konnte im Cell Viability Assay mit MDA-MB-435-Zellen auch im Vergleich mit der unspezifischen Wirkung von freiem Wismut bestätigt werden (Insert Abb. 6). Hierzu wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen des markierten Proteins inkubiert und danach sowohl die Zellzahl als auch die Anzahl der toten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und zur Wirkung von freiem Wismut bestimmt. Der Anteil toter Zellen wird hierbei mit Trypanblau sichtbar gemacht, da Trypanblau nur bei Schädigung der Zytoplasma-Membran ins Zellinnere gelangen kann. Im Gegensatz zu $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ zeigt freies Wismut, wenn es als Kontrolle der unspezifische Zytotoxizität eingesetzt wird, erst bei höheren Konzentrationen eine Zunahme der Zytotoxizität. Unmarkiertes DTPA-(F3)₂ in unterschiedlichen Konzentrationen (10 pg/ml bis 100 ng/ml) hat keinerlei Einfluss auf das Wachstum oder Überleben der Zellen (Daten nicht gezeigt).

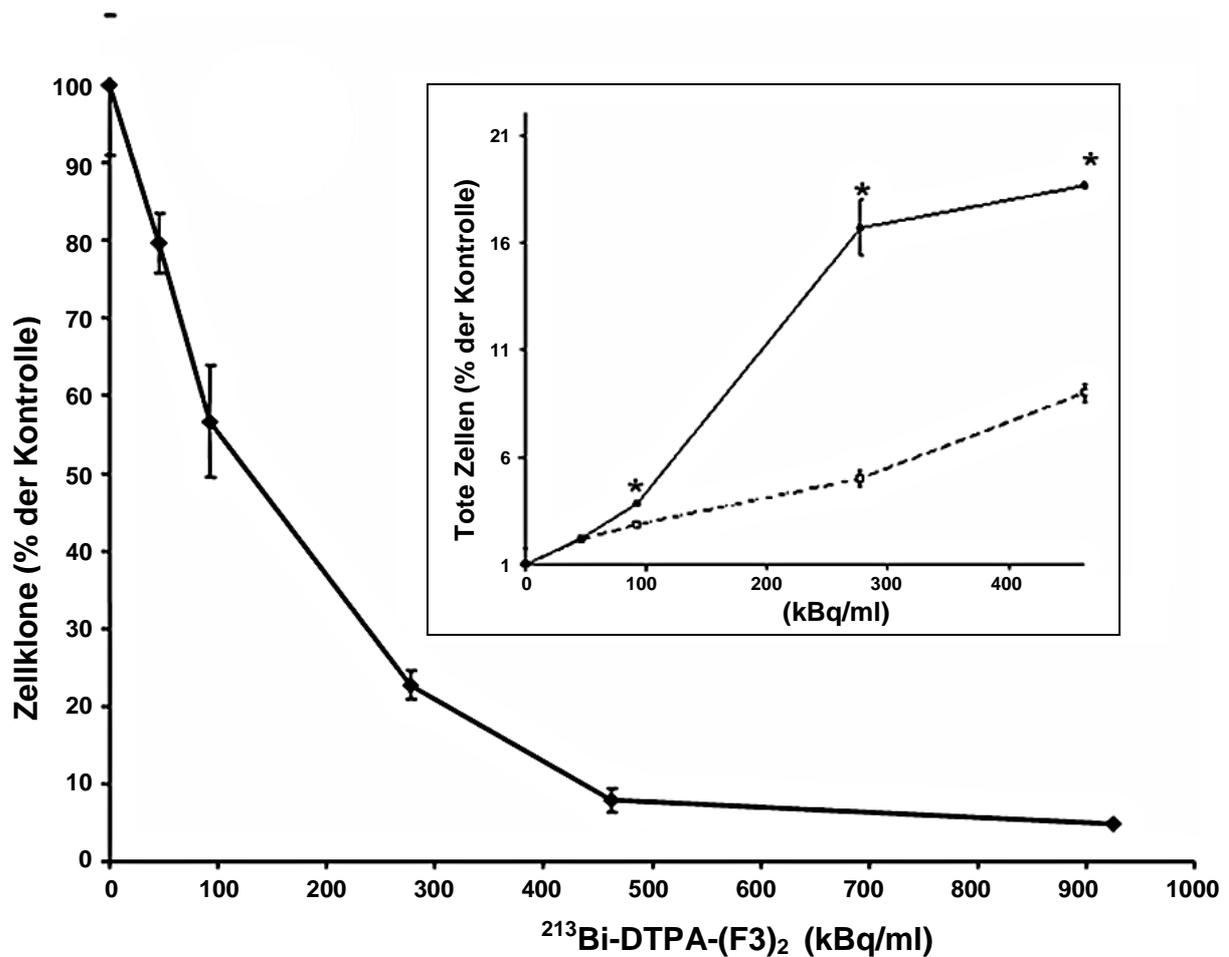


Abb. 6. Spezifische Zytotoxizität von $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ auf Tumorzellen *in vitro*. MDA-MB-435-Tumorzellen wurden über 12 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen von $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ inkubiert und dann in Soft Agar überführt. Die Zahl der Zellklone wurde nach 14 Tagen ausgezählt und mit der von unbehandelten Zellen verglichen. Die Darstellung erfolgte als Prozent der Zellklone der Kontrolle mit Standardabweichung ($p < 0,01$). Im Insert wird der durch unterschiedliche Konzentrationen von $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ induzierte Zelltod in Prozent der unbehandelten Kontrolle (durchgehende Linie) der unspezifischen und signifikant niedrigeren Wirkung von unkonjugiertem ^{213}Bi (gepunktete Linie) gegenübergestellt (*= $p < 0,01$; alle Werte über 50 kBq).

4.4 Biodistribution von $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ in Mäusen mit intraperitonealem Xenograft

$^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ (3.7 MBq) wurde Mäusen mit intraperitoneal gelegenen MDA-MB-435-Xenografts injiziert, um eine selektive Anreicherung des markierten Proteins *in vivo* zu untersuchen. Nach einer Zirkulationszeit von einer HWZ wurden die Tiere geopfert, die Organe entfernt und die Aktivität in jedem Organ bezogen auf die Masse im γ -Counter bestimmt.

Bis zu 32% der Gesamtaktivität/g akkumulierte im Tumor, während in keinem anderen untersuchten Organ außer den Nieren eine signifikante Anreicherung der Aktivität gemessen werden konnte (Abb.7). Die Akkumulation in den Nieren ist am wahrscheinlichsten durch die renale Ausscheidung des markierten Proteins bedingt. Durch die verzögerte Resorption von $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ in den Kreislauf zeigte sich eine Tumor-Blut-Ratio von 17,6:1. Die Tumor-Dünndarm-Ratio von 10,37:1 ist ein weiteres Indiz dafür, dass es sich um eine spezifische Anreicherung im Tumor handelt, da dieses intraperitoneal gelegene Organ inklusive anhaftender Serosa gemessen wurde.

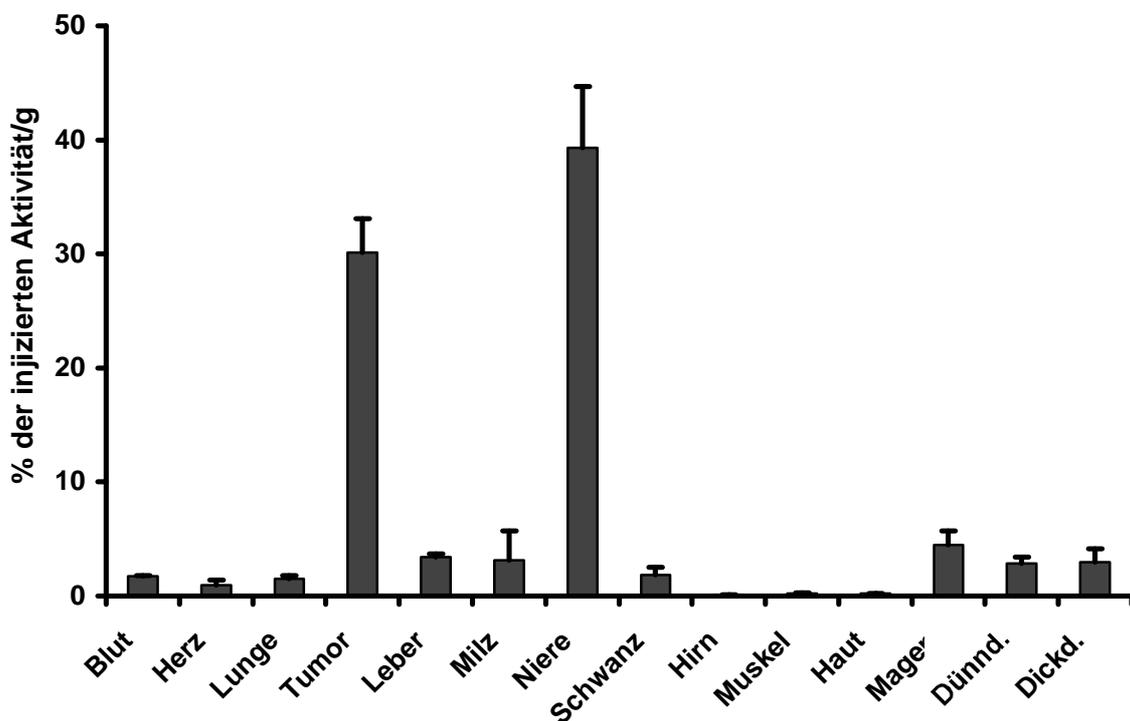


Abb. 7. Biodistribution von $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$. Hierzu wurde Mäusen mit intraperitonealem Xenograft 3,7 MBq $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ intraperitoneal verabreicht, die Organe/Gewebe sowie Blut nach einer Zirkulationszeit von 45 Minuten entfernt und die Aktivität im Gewebe ermittelt. Die Balken stellen den Prozentsatz der injizierten Aktivität im jeweiligen Gewebe dar (+/_SD).

Zur bildlichen Darstellung der Akkumulation des markierten Peptids im Tumor wurde DTPA-(F3)₂ mit dem γ -Emitter ^{68}Ga markiert und Mäusen mit intraperitonealem MDA-MB-435-Xenograft i. p. injiziert. Nach einer Zirkulationszeit von 90 Minuten wurde eine statische Aufnahme im Tier-PET durchgeführt. Eine repräsentative PET-Aufnahme zeigt eine deutliche Retention der Aktivität in den im Peritonealraum verteilten Tumormassen, während neben der Anreicherung in den Nieren keine systemische Anreicherung des Radionuklids (gleichmäßige

Hintergrundaktivität innerhalb der Maus) sichtbar wird. Die gleiche Menge des markierten Peptids zeigte in einem Kontrolltier ohne i.p.-Xenograft nach 1,5 Stunden neben einer systemisch erhöhten Hintergrundaktivität vornehmlich eine Anreicherung in Nieren und Blase (nicht gezeigt).

Da für den zytotoxischen Effekt von α -Emittlern eine ausreichend homogene Verteilung innerhalb eines Tumors entscheidend ist, wurde die Akkumulation und Verteilung von ^{213}Bi -DTPA-(F3)₂ innerhalb eines Tumors mittels Autoradiographie untersucht. Hierzu wurde nach Biodistribution von ^{213}Bi -DTPA-(F3)₂ i. p. der intraperitoneal gelegene Tumor sowie ein gut durchblutetes Kontrollorgan (Oberschenkelmuskulatur) entfernt, histologische Schnitte hergestellt und diese im Micro-Imager ausgewertet. Wie Abb. 8 zeigt, reichert sich das Radionuklid in der Peripherie des Tumors gleichmäßig an. Daneben zeigt sich eine inhomogene, punktförmige Akkumulation der Aktivität im Zentrum des Tumors. Vergleiche mit histologischen Schnitten in HE-Färbung zeigen, dass es sich bei der punktförmigen Akkumulation des Nuklids innerhalb des Tumors um perivaskuläre Regionen handelt. Die Aktivität innerhalb des Kontrollorgans war kaum wahrnehmbar.

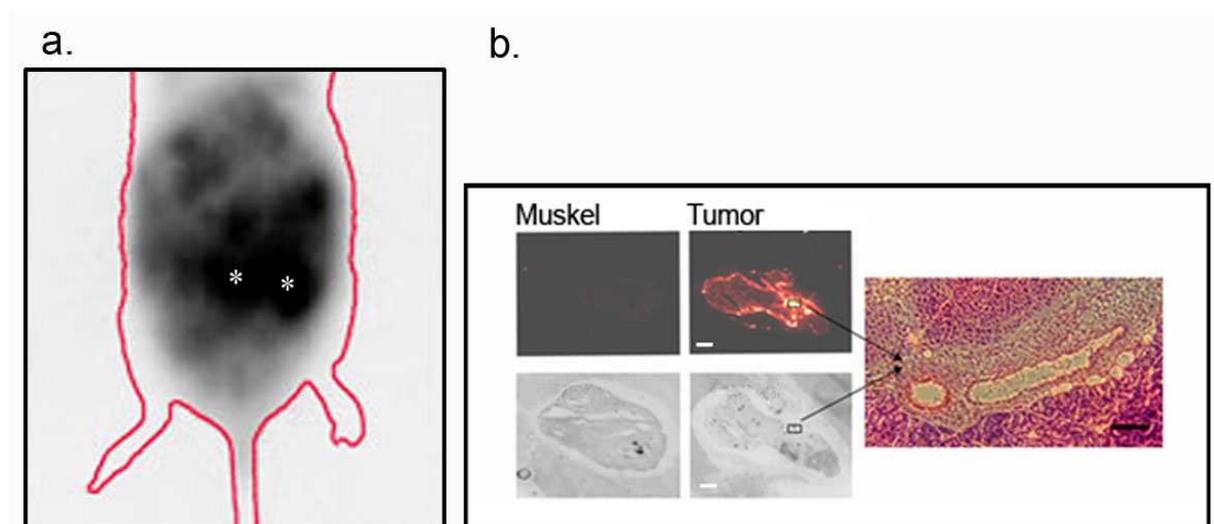


Abb. 8. Selektive Akkumulation von ^{213}Bi -DTPA-(F3)₂ in vivo. **a.** Akkumulation von i.p. injiziertem ^{68}Ga -DTPA-(F3)₂ nach 90 Minuten in einer Maus mit Peritonealkarzinose (20 Tage nach Inokulation der Tumorzellen). Bei der Maus mit Peritonealkarzinose zeigt sich neben der knotenförmigen Akkumulation im Bauchraum eine Anreicherung in den Nieren (*). **b.** Autoradiographie von Gefrierschnitten intraperitoneal gelegener Tumormassen 45 Minuten nach i.p. Injektion von ^{213}Bi -DTPA-(F3)₂. Es zeigt sich eine gleichmäßige Anreicherung in der Peripherie des Tumors und - im Vergleich mit mirror samples in HE-Färbung - eine perivaskuläre Anreicherung innerhalb des Tumors (Hämatoxylin-Eosin, 100fache Vergrößerung). Das Kontrollorgan (Muskel) zeigte keine detektierbare Aktivität.

4.5 Behandlung der Peritonealkarzinose durch fraktionierte Therapie mit $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$

Um die antitumorale Wirkung von $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ *in vivo* zu überprüfen, wurden SCID-Mäuse mit intraperitonealen MDA-MB-435-luc2-Xenografts mit einer fraktionierten Therapie des markierten Peptids behandelt. Diese bestand aus sechs intraperitonealen Injektionen von je 1,85 MBq $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ jeden zweiten Tag. Als Positivkontrolle dienten Injektionen mit PBS, als Kontrolle der unspezifischen Radiotoxizität von Wismut $^{213}\text{Bi-DTPA}$ (1,85 MBq/Injektion).

Eine fraktionierte Therapie wurde aufgrund der höheren Selektivität bei niedrigerer Ganzkörperbelastung gewählt, auch um der inhomogenen Verteilung des Nuklids innerhalb des Tumors Rechnung zu tragen. Die Biolumineszenz der verwendeten Tumorzellreihe wurde genutzt, um den Effekt der Therapie *in vivo* mittels Optical Imaging verfolgen zu können. In der Darstellung der Peritonealkarzinose können bei entsprechender Belichtung schon sehr kleine Tumorknoten gut dargestellt werden (Buchhorn, 2007 #16).

4.5.1 Behandlung des frühen Stadiums einer Peritonealkarzinose

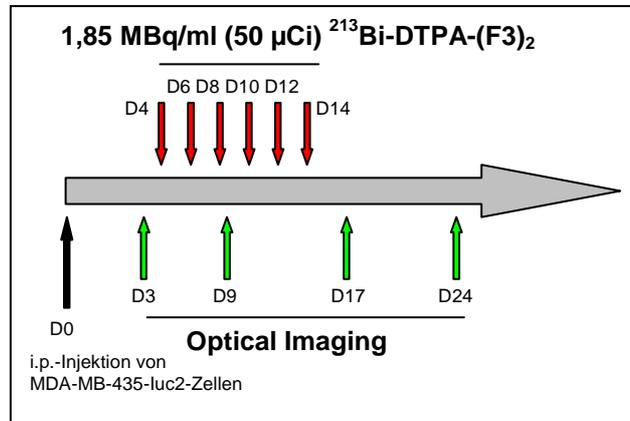
In einem ersten Ansatz sollte anhand einer beginnenden Peritonealkarzinose die Wirkung von $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ untersucht werden. Hierzu wurde die fraktionierte Therapie nach dem in Abb. 9. dargestellten Schema am vierten Tag nach Inokulation der Tumorzellen begonnen.

Im Optical Imaging, das therapiebegleitend an jeweils zwei Tieren aus jeder Gruppe durchgeführt wurde, zeigte sich bei den mit $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ behandelten Tieren eine leichte Zunahme der Signalintensität der Biolumineszenz auf das Doppelte des Ausgangswertes während der Therapieperiode von 10 Tagen, gefolgt von einer Abnahme der Biolumineszenz auf 39% des Ausgangswertes vor Therapie ($p < 0,02$ ab dem 24. Tag; Ergebnisse nicht gezeigt). Dies entspricht einer partiellen Remission. Bei der Kontrollgruppe mit PBS zeigte sich nach einem fast gleichbleibenden Signal vom dritten bis zum neunten Tag eine annähernd exponentielle Zunahme des Signals auf das 31,6fache des Ausgangswertes nach 48 Tagen.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe ergab sich für die Tiere unter Therapie mit $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ eine hoch signifikante ($p < 0,01$) Verlängerung der mittleren Überlebenswahrscheinlichkeit von 83,13 %. Die mittlere Überlebenswahrscheinlichkeit lag hier bei 93,63 (+/- 6,78 SD) Tagen gegenüber denen der Kontrollgruppe mit 51,13 (SD: +/- 16,5) Tagen. Die mit $^{213}\text{Bi-}$

DTPA-behandelten Tiere zeigten mit einer Überlebenswahrscheinlichkeit von 53,5 (SD: +/- 23,29) Tagen keinen signifikanten Unterschied zu den Kontrolltieren.

a.



b.

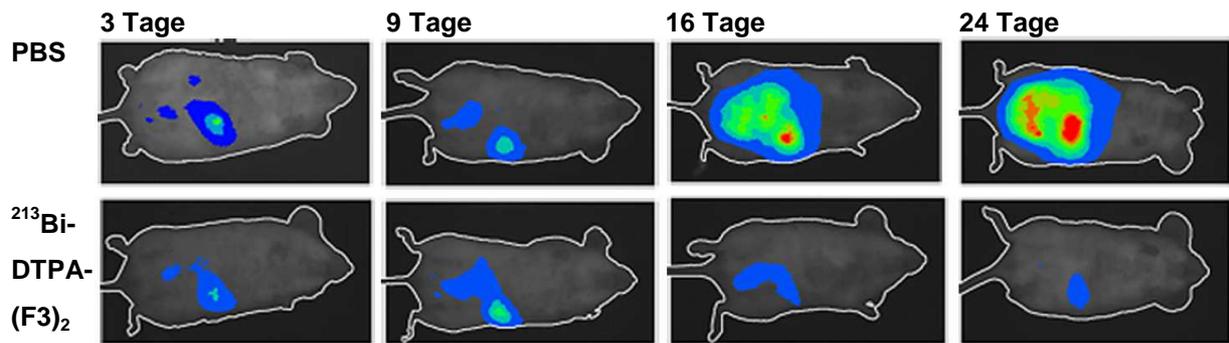


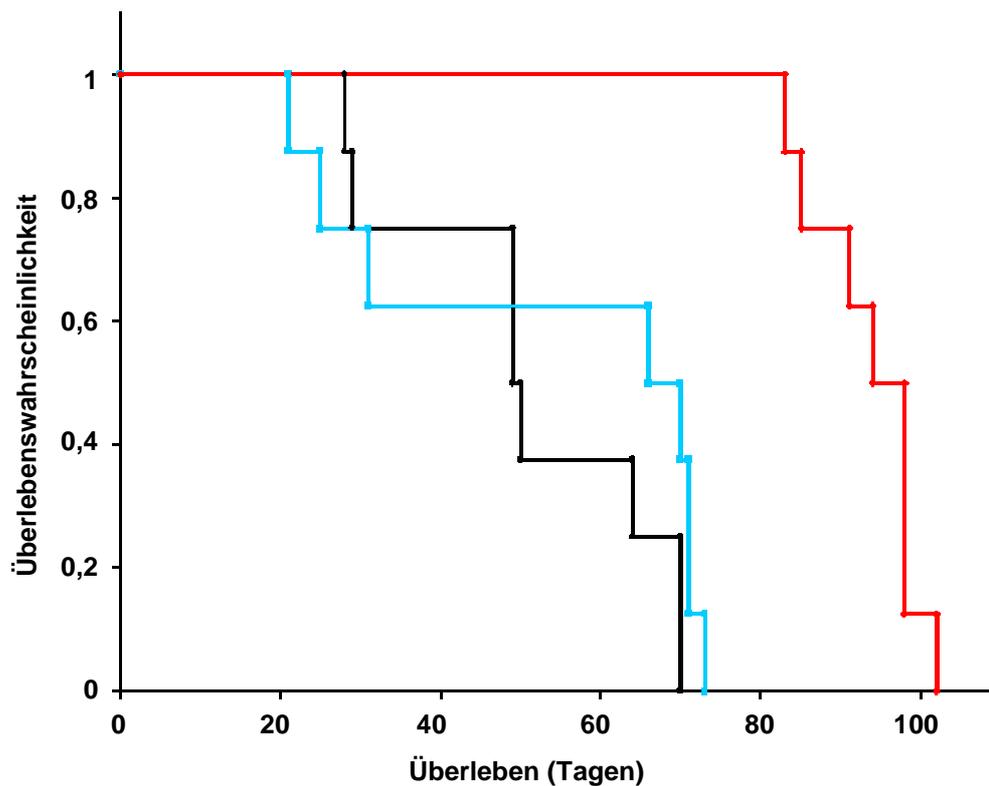
Abb. 9. Versuchsschema und Verlauf des Biolumineszenzsignals bei der frühen Peritonealkarzinose a. Schema der Zeitpunkte der i.p.-Injektionen von $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$, $^{213}\text{Bi-DTPA}$ und PBS (rote Pfeile) und der Biolumineszenzmessungen (grüne Pfeile) nach Inokulation mit Tumorzellen i.p. **b.** Optical Imaging des intraperitonealen Tumorwachstums von MDA-MB-435luc2-Xenografts bei einer Maus unter $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ i.p. gegenüber einer Kontrollmaus, die PBS i.p. erhielt.

Der überwiegende Grund für die Euthanasie der Kontrolltiere unter PBS war die Entwicklung von Aszites. Bei der Eröffnung der Bauchhöhle stellte sich die Tumormasse als disseminierte Peritonealkarzinose vieler ca. 1-3mm großer Metastasen und meistens eines großen Tumorkonglomerates im Bereich des rechten Oberbauches (Milzhilus, Kleine Magenkurvatur, Pankreas) dar. In der Gruppe unter Behandlung mit $^{213}\text{Bi-DTPA}$ verstarben drei der insgesamt 8 Tiere in den ersten drei Wochen nach Therapie aufgrund unspezifischer Radionuklidwirkung (Grund für die Euthanasie war hier größtenteils Gewichtsabnahme von $> 25\%$), eine zweite Gruppe um den 70. Tag durch Entwicklung von Aszites und anderen tumorassoziierten Symptomen. Grund für die Euthanasie der F3-behandelten Mäuse war ebenfalls die Ausbildung von Aszites; es standen jedoch häufiger andere tumorassoziierte Symptome wie blutiger Kot, Diarrhö und Apathie im Vordergrund als in den Vergleichsgruppen. In einem Fall lag zum Todeszeitpunkt eine Arrosion des Dickdarmes vor, in einem anderen war eine Gefäßarrosion mit Blutung in das Peritoneum feststellbar.

Ein Vergleich der makroskopischen Befunde der Peritonealkarzinose mit und ohne Therapie nach dem oben erläuterten Schema wurde anhand einer kleineren Gruppe von vier Tieren durchgeführt, von denen zwei mit $^{213}\text{Bi-DTPA}$ - (F3)₂ in der oben beschriebenen Weise behandelt wurden, während die zwei anderen nur PBS erhielten. Alle wurden 50 Tage nach Injektion der Tumorzellen geopfert, der Dick- und Dünndarm mit anhängendem Mesenterium präpariert und fotografiert.

Das makroskopische intraperitoneale Bild des Tumors unterschied sich dahingehend von der Kontrollgruppe ohne RNT, als hier keine makroskopisch erkennbare disseminierte Aussaat des Tumors vorlag, sondern eine Reduktion der Tumormasse auf vereinzelte Tumorknoten. Die hiermit erreichte lokale Eingrenzung der Tumormasse blieb außerdem über den gesamten Beobachtungszeitraum erhalten.

a.



b.

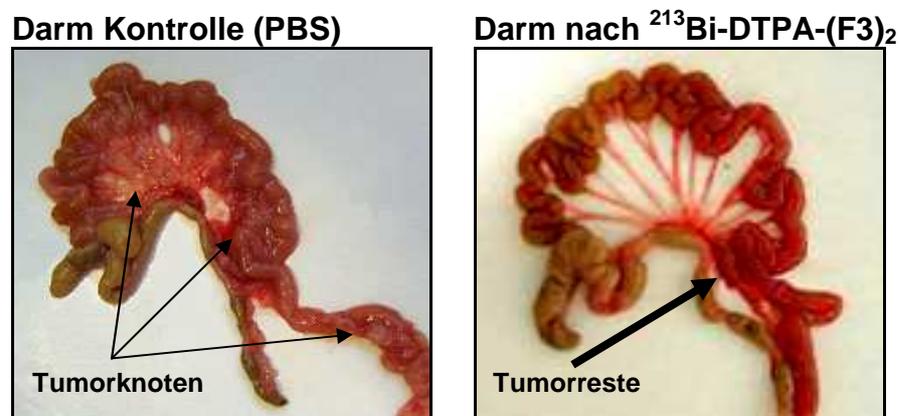


Abb. 10. a. Darstellung der Überlebenswahrscheinlichkeit der Versuchstiere nach Kaplan-Meier (frühe Peritonealkarzinose). Die Tiere wurden nach dem in Abb. 9 beschriebenen Therapieschema behandelt. Die schwarze Linie zeigt das Überleben der Kontrolltiere (PBS), die blaue das der $^{213}\text{Bi-DTPA}$ -Kontrolltiere, die rote Linie das Überleben der mit $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ i.p. behandelten Mäuse ($p < 0,01$).

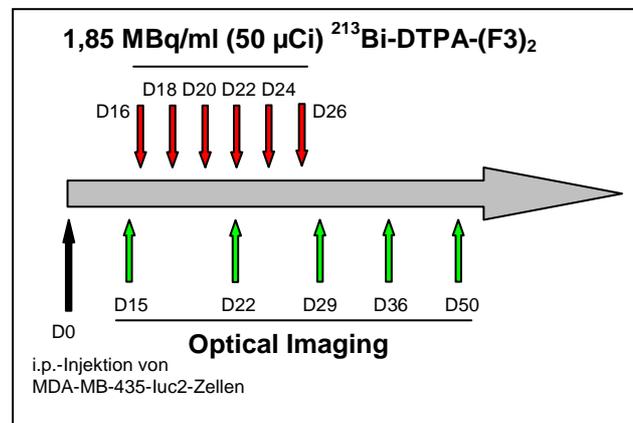
b. Makroskopisches Bild des Dick- und Dünndarms von Mäusen 50 Tage nach Inokulation mit Tumorzellen und Behandlung mit $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ (rechtes Bild) im Vergleich zu PBS (linkes Bild) nach dem in Abb. 9 beschriebenen Schema.

4.5.2 Behandlung der fortgeschrittenen Peritonealkarzinose

Bei Vorliegen einer fortgeschrittenen Peritonealkarzinose wurde die Therapie 16 Tage nach Tumorzellinjektion begonnen, um die Möglichkeit einer Reduktion der Tumorlast durch eine Therapie mit $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ *in vivo* zu untersuchen. Das Therapieschema ist in Abbildung 11 dargestellt.

Im Optical Imaging konnte durch die Behandlung mit $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ zunächst eine Wachstumsstagnation beobachtet werden; ab einer Woche nach Beendigung der Therapie kam es zu einer im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS) signifikanten Reduktion der Signalstärke ($p < 0,02$) bis auf das Niveau vor Therapiebeginn.

a.



b.

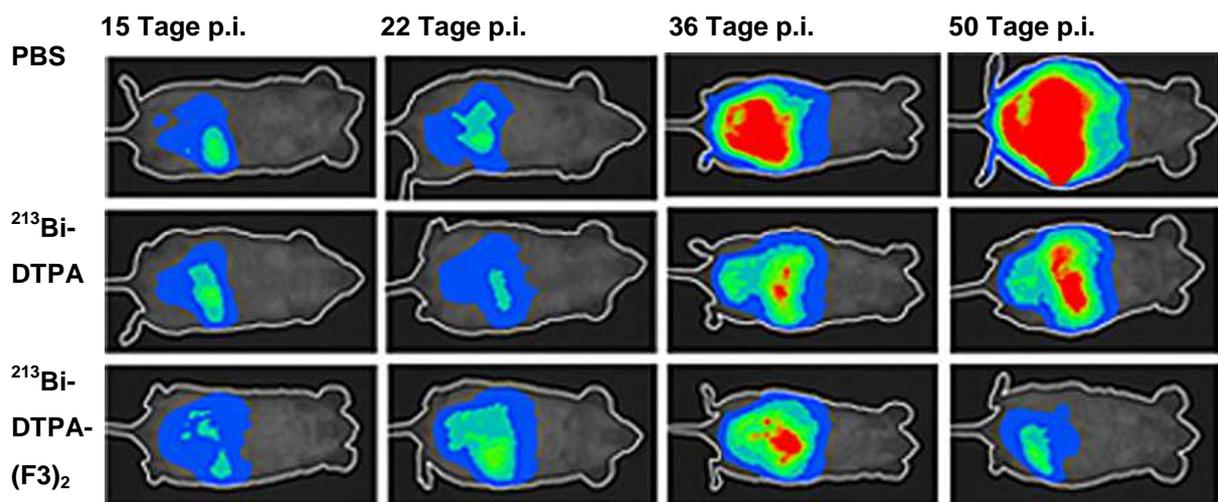


Abb. 11. Versuchsschema und Verlauf des Biolumineszenz-Signals bei dem Versuchsan-

satz der fortgeschrittenen Peritonealkarzinose. a. Schema der Zeitpunkte der i.p.-Injektionen von $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$, $^{213}\text{Bi-DTPA}$ und PBS und der Biolumineszenzmessung nach Inokulation mit Tumorzellen i.p.

b. Vergleich im Optical Imaging.

Unter der unspezifischen Wirkung von $^{213}\text{Bi-DTPA}$ trat im Therapiezeitraum ebenfalls eine Stagnation des Tumorwachstums auf; nach Beendigung der Therapie setzte sich das Tumorzellwachstum jedoch fort. Die Kontrollgruppe mit PBS zeigte auch bei der Untersuchung des disseminierten Befalles im Optical Imaging einen Verlauf, der dem der Kontrolltiere der frühen Peritonealkarzinose ähnelte. Im Verlauf der Peritonealkarzinose kam es zu einer Steigerung der Signalintensität im Optical Imaging bis zum 55fachen der Intensität vor der Therapie. 50 Tage nach Injektion der Tumorzellen zeigte die Gruppe unter $^{213}\text{Bi-DTPA}$ 50% und diejenige unter $^{213}\text{Bi-DTPA}-(\text{F3})_2$ nur 15% der Signalstärke der Kontrolle (Ergebnisse nicht gezeigt, $p < 0,05$ zur Kontrolle ab dem 36. Tag).

Die mittlere Überlebenswahrscheinlichkeit lag bei den $^{213}\text{Bi-DTPA}-(\text{F3})_2$ -Tieren bei 78,33 (SD: +/- 17,48) Tagen gegenüber 57,3 (+/- 4,7) Tagen der PBS-Kontrolle und erreichte damit ausgehend von den Mittelwerten eine Verlängerung der Überlebenswahrscheinlichkeit von 36,62 % mit einer Signifikanz von $p < 0,05$.

Die Überlebenswahrscheinlichkeit der Kontrollgruppe der unspezifischen Wismut-Wirkung zeigte eine geringere Lebensdauer als die PBS-Kontrolle. Dies ist wahrscheinlich auf ein Zusammenwirken der unspezifischen Nuklidwirkung mit der Schwächung des Organismus durch die fortgeschrittene Tumorerkrankung zurückzuführen.

Unabhängig vom unterschiedlichen Todeszeitpunkt der Gruppen ließen sich zwischen der Kontroll- und den Therapiegruppen auch hinsichtlich des makroskopischen Aspekts der Peritonealkarzinose zum Todeszeitpunkt Unterschiede feststellen. Bei den Tieren nach Therapie mit $^{213}\text{Bi-DTPA}-(\text{F3})_2$ bestand zwar ebenfalls ein disseminierter Tumorbefall. Dieser zeigte jedoch mehrere größere Karzinomabsiedlungen statt einem durchgehenden Tumor-„Rasen“ wie bei der Kontrollgruppe. Auch bei der fortgeschrittenen Peritonealkarzinose waren neben der Ausbildung von Aszites bei den Therapiegruppen häufiger andere tumorassoziierte Symptome letalitätsbestimmend, wie z.B. Blutungen durch Gefäßarrosion o.ä.

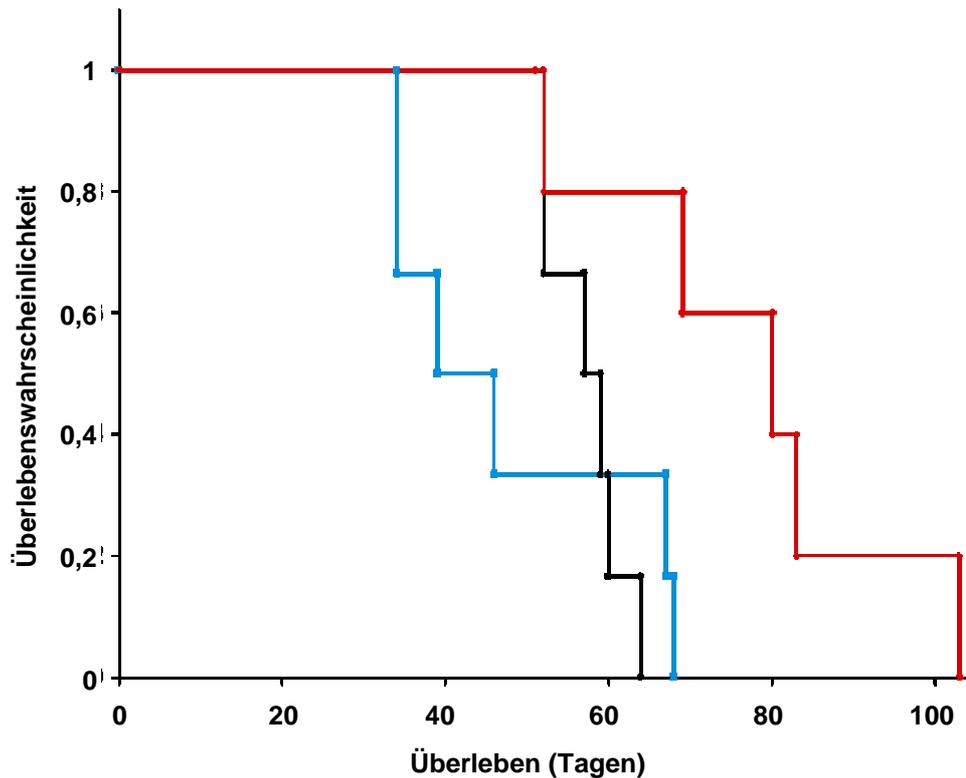
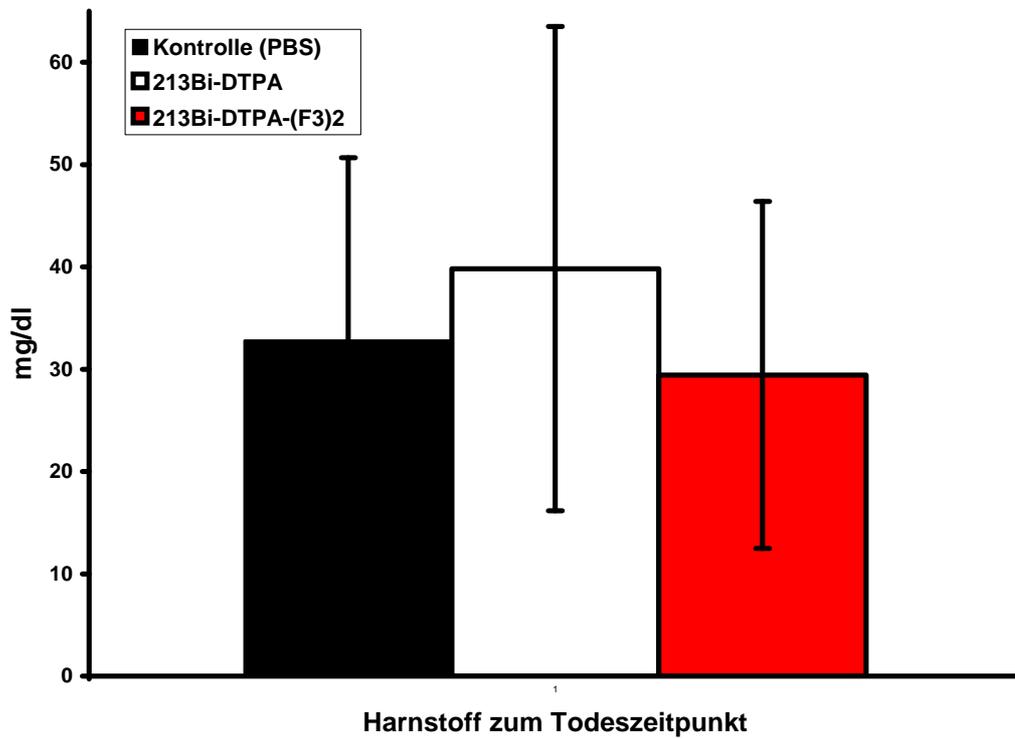


Abb. 12. Kaplan-Meier-Kurve der Tiere bei Therapie der fortgeschrittenen Peritonealkarzinose. Die Mäuse wurden nach dem in Abb. 11 beschriebenen Therapieschema behandelt. Die schwarze Linie zeigt das Überleben der Kontrolltiere (PBS), die blaue das der mit $^{213}\text{Bi-DTPA}$ i.p. behandelten Tiere, die rote Linie das Überleben der mit $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ i.p. behandelten Mäuse an ($p < 0,05$).

4.6 Bestimmung der Nierentoxizität einer intraperitonealen $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ -Therapie

Um eine chronische Nierenschädigung nach der Radionuklidtherapie auszuschließen, wurde Serum der Mäuse aus den Therapiegruppen zum Todeszeitpunkt gewonnen und deren Kreatinin- und Harnstoffwerte bestimmt. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe zeigten sich weder für $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ noch für $^{213}\text{Bi-DTPA}$ signifikante Veränderungen der genannten Serumwerte (Abb 13.).

a.



b.

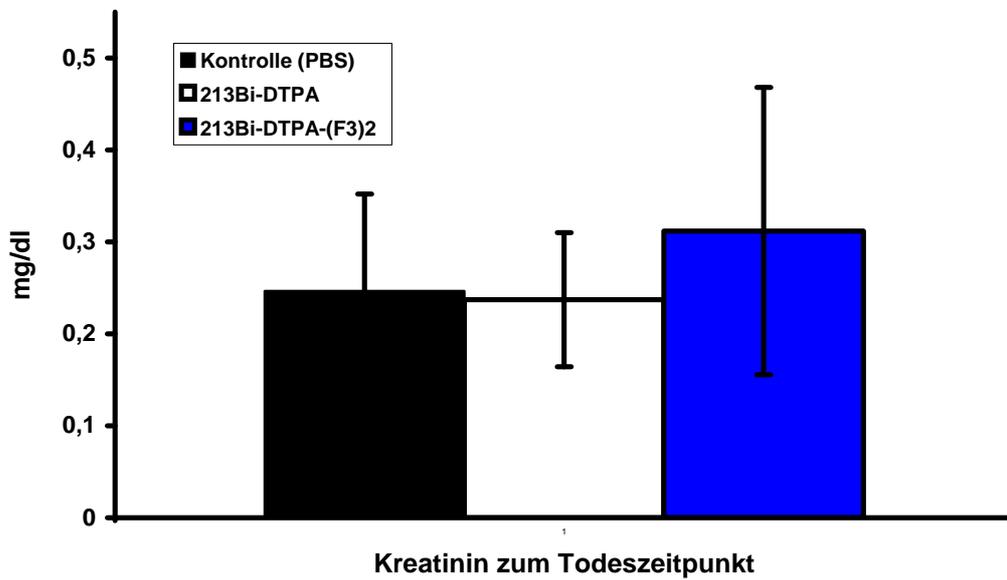


Abb. 13. Harnstoffwerte (a.) und Kreatininwerte (b.) im Serum von je 6 Tieren der $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ und $^{213}\text{Bi-DTPA}$ -Gruppe im Vergleich zu 4 Kontrolltieren der PBS-Gruppe, entnommen zum Todeszeitpunkt.

5. Diskussion

Die Metastasierung in Körperhöhlen ist eine schwer zu behandelnde Komplikation bei vielen fortgeschrittenen Tumorleiden. Die spezifische Radionuklidtherapie mit α -Strahlern stellt hierfür einen vielversprechenden Therapieansatz dar, denn sie bietet den Vorteil einer lokoregionären Therapie mit einer hohen lokalen Konzentration des Nuklids und einer verzögerten systemischen Verteilung. Die große Tumoroberfläche bietet hierbei eine maximale Kontaktfläche für spezifisch an Tumorzellen bindende Agenzien (Seidl, 2013 #57). Die Wahl eines geeigneten Nuklids mit kurzer HWZ kann zusätzlich zu einer verringerten systemischen Belastung genutzt werden.

Verglichen mit β -Emittern haben α -Emitter durch den hohen linearen Energietransfer bei einer kürzeren Reichweite eine wesentlich höhere biologische Effektivität. Das bedingt eine höhere Anzahl an irreversiblen Zellschädigungen als bei niedrigerer γ - und β -Strahlung, deren Wirkungsweise sich in Abhängigkeit ihres LET überwiegend über Ionisationsvorgänge innerhalb der Zelle aus radikalen Sauerstoff- und Wasserstoff-Verbindungen herleitet. Bei einem Alpha-Emitter reichen schon vier den Kern passierende Alpha-Partikel aus, um über Doppelstrangbrüche der DNA zur irreversiblen Schädigung der Zelle zu führen. Innerhalb der kurzen Distanz, die die Alpha-Partikel zurücklegen, kommt es hierbei zu gruppierten DNA-Doppelstrangbrüchen sowie zur Bildung von hoch reaktiven Hydroxyl-Radikalen (Dahle, 2011 #20; Baidoo, 2013 #4).

Für den Einsatz von Alpha-Emittern ist es aufgrund ihrer hohen biologischen Effektivität eine Notwendigkeit, dass sie in Form einer zielgerichteten Therapie eingesetzt werden. Hierfür werden Trägermoleküle benötigt, die sowohl eine stabile Bindung des Nuklids *in vivo* gewährleisten als auch eine selektive Anreicherung des Isotops im Tumorgewebe ermöglichen. Idealerweise sollte der gebundene Anteil des mit einem α -Emitter gekoppelten Moleküls in den Zellkern aufgenommen werden, um dessen kurze Reichweite bei hohem LET vollständig ausschöpfen zu können und die Toxizität auf das umgebende Gewebe zu verringern. Der ungebundene Anteil des Moleküls sollte außerdem schnell ausgeschieden werden.

Die oben beschriebenen Eigenschaften dieser Alpha-Emitter lassen sich besonders vorteilhaft bei einer Manifestation von soliden Tumoren in Körperhöhlen und disseminiertem Tumorbefall nutzen. Vor allem ^{213}Bi , ^{211}At und ^{225}Ac weisen geeignete Eigenschaften auf, die ihren Einsatz *in vivo* ermöglichen. Zu diesen Alpha-Emittern liegen inzwischen eine Reihe viel versprechender präklinischer Studien vor, in denen gezeigt werden konnte, dass α -

Emitter wie ^{213}Bi und ^{225}Ac gekoppelt an Antikörper sowohl in der Therapie von Metastasen innerhalb von Körperkompartimenten als auch gegenüber Mikrometastasen wirksam sind (Kennel, 1999 #35).

Beck et al. konnten zeigen, dass ein ^{213}Bi -gekoppelter monoklonaler Antikörper gegen mutiertes E-Cadherin, dass selektiv auf einer Untergruppe von Magenkarzinomen exprimiert wird, *in vitro* und auch *in vivo* schon bei einmaliger lokoregionärer Therapie in einem frühen Stadium der Peritonealkarzinose zu einer deutlichen Verlängerung der Überlebenszeit führt, in Abhängigkeit von der Zeitspanne zwischen der Inokulation der Tumorzellen und der Therapie (Beck, 2007 #5). Ähnliche Ergebnisse liegen für ^{213}Bi -gekoppelte MUC1-Antikörper bei der Peritonealkarzinose durch Ovarialkarzinomzellen vor (Song, 2008 #61). Auch eine intrathekale Injektion des Alpha-Emitters ^{211}At gekoppelt an Trastuzumab zeigte im Tiermodell eine deutliche Verlängerung der medianen Überlebenszeit gegenüber der Kontrollgruppe (Boskovitz, 2009 #13).

In mehreren Studien konnte außerdem die Überlegenheit einer fraktionierten Therapie gegenüber einer einzelnen Dosis, bei gleichbleibender Toxizität, nachgewiesen werden. Dies zeigt sich auch bei einer Folgestudie des Wismut-gekoppelten monoklonalen Antikörpers gegen mutiertes E-Cadherin am Modell der Peritonealkarzinose. Im Modell einer fortgeschritteneren Peritonealkarzinose dieses Modells zeigte die gleiche Dosis des Alpha-Emitters - verteilt auf zwei Applikationen - eine deutlich höhere Effektivität ohne Zunahme der Toxizität (Bloechl, 2005 #11).

Klinische Studien in Form von Phase I-Studien zur Testung der Dosimetrie und Toxizität existieren vor allem für die Alpha-Partikel-Emitter ^{211}At , ^{225}Ac und ^{213}Bi und haben bisher einzelne ermutigende Ergebnisse hervorgebracht (Kim, 2011 #36; Baidoo, 2013 #4).

Für ^{213}Bi liegen sowohl erste Studien zur systemischen Therapie von hämatologischen Erkrankungen vor als auch einzelne Studien zur Therapie metastasierter solider Tumore vor.

So zeigt eine Studie zur systemischen Therapie einer AML mit an den humanen monoklonalen CD33-Antikörper konjugiertes ^{213}Bi eine deutliche Reduktion der Blasten im Knochenmark und im Blut bei 93% (14 von 18) der Patienten. Die absorbierte Dosis war bei dem Vergleich mit an den gleichen Antikörper gebundenem β -Emitter 100fach höher. Es trat keine signifikante Toxizität auf (Jurcic, 2002 #34). Eine nachfolgende Studie, bei der der nuklidgekoppelte Antikörper in Verbindung mit den Chemotherapeutikum Cytarabin eingesetzt wurde, konnte zeigen, dass die kombinierte Therapie eine Sättigung der CD33-Bindungsstellen ermöglichte und zu einer signifikanten Reduktion der Blasten führte, die im Durchschnitt über 6 Monate anhielt (Rosenblat, 2010 #54).

Hinsichtlich der Therapie solider Tumore gibt es derzeit nur eine Pilotstudie zur Behandlung von 16 Melanom-Patienten mit in-transit-Metastasen (Allen, 2005 #1) sowie eine weitere mit fünf Patienten mit Gliomen mit einer funktionell kritischen Lokalisation (Cordier, 2010 #19), die jeweils eine intratumorale Administration des an Antikörper gebundenen Nuklids anwenden.

In der Studie der Patienten mit Malignem Melanom wurde ein Antikörper gegen eine Proteoglycan, das von Perizyten unreifer Gefäße und von Melanomzellen gebildet wird, an ^{213}Bi gekoppelt und intratumoral injiziert. In 20% der Patienten konnte eine komplette oder partielle Response auf die Therapie festgestellt werden, 50% zeigten eine stabile Erkrankung und 30% einen Progress. Nebenwirkungen der Therapie im Sinne einer toxischen Reaktion auf das Nuklid wurden nicht festgestellt.

Auch die Phase I-Studie zur Behandlung der Gliome konnte zeigen, dass die lokale Radiotherapie eine lokalisierte Tumornekrose auslöste und eine funktionelle Verbesserung erzielt werden konnte. Eine Toxizität trat auch hier nicht auf.

Zur Therapie innerhalb von Körperkompartimenten liegt eine Studie vor, die an ein Antikörperfragment gekoppeltes ^{211}At verwendet, um die Pharmakokinetik nach intraperitonealer Infusion zu untersuchen (Andersson, 2009 #2). In dieser Studie wurde 5 Patientinnen mit rezidivierender Peritonealkarzinose 2-5 Tage nach laparoskopischer Tumorreduktion über einen Katheter das antikörpergekoppelte Radionuklid einmalig zugeführt. Die Anreicherung und Verteilung des Nuklids wurde über eine γ -Kamera und SPECT verfolgt und zusätzlich Urin, Blut und Peritonealflüssigkeit gesammelt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass auch in dieser Konstellation bei Blockierung der Schilddrüse eine therapeutische Dosis erzielt werden kann ohne eine toxische Nebenwirkung.

Hier berichten wir erstmals von einem Tumor-homing Peptid als Trägermolekül für einen α -Partikel Emitter. Peptide können in vieler Hinsicht als Trägermolekül für Radioisotope von Vorteil sein, da sie kleiner als Antikörper sind und innerhalb von Stunden renal ausgeschieden werden können. Größere Proteine wie Antikörper zeigen hingegen Zirkulationszeiten von bis zu einer Woche. Dies führt zu einer erhöhten Belastung des Körpers durch nicht gebundenes Nuklid vor allem bei langlebigen Radionukliden wie ^{225}Ac . Dies wird bestätigt durch Ergebnisse einer Studie mit dem Peptid DOTATOC als Carrier von ^{225}Ac gegenüber einem β -Partikel emittierendes Isotop gekoppelt an DOTATOC (Miederer, 2008, #39). Tumorspezifische Peptide sind daher eine viel versprechende Alternative als Trägermolekül für α -Emitter.

Wir untersuchten eine Verbindung des Tumor Homing Peptids F3 mit DTPA, das eine stabile Bindung von Radiometallen wie ^{213}Bi ermöglichte. Durch Konjugation des Tumor Homing Peptids F3 an den Chelator DTPA konnten stabile Konjugate mit dem α -Partikel-Emitter ^{213}Bi hergestellt werden.

Anders als bei der Anwendung von Antikörpern zur Vermittlung der Ligandenbindung, bindet das Tumor Homing Peptid F3 an membranständiges Nukleolin von proliferierendem Endothel und Tumorzellen und wird in einem aktiven Prozess von den Zellen aufgenommen und in den Zellkern transportiert²¹. ^{213}Bi -DTPA-(F3)₂ wurde von Tumorzellen unterschiedlicher Herkunft in das Zytoplasma und den Zellkern internalisiert, wie es schon für Konjugate von F3 mit FITC berichtet wurde (Porkka, 2002 #47). Das Maximum der Aufnahme von ^{213}Bi -DTPA-(F3)₂ in den Zellkern wurde *in vitro* schon nach 15 Minuten erreicht und eine signifikante intrazelluläre Akkumulation von F3 war noch nach 90 Minuten feststellbar. Dies entspricht ca. zwei HWZ von ^{213}Bi , was gewährleistet, dass ein Großteil der Zerfälle des Isotops in unmittelbarer Nähe der DNA stattfinden und daher eine hohe toxische Wirkung auf die Tumorzellen entfalten kann, während das umgebende Gewebe durch die geringe Reichweite der α -Emitter wenig in Mitleidenschaft gezogen wird.

^{213}Bi -DTPA-(F3)₂ löste *in vitro* und *in vivo* Zelltod aus und reduzierte die Tumorzellklonalität *in vitro* und *in vivo* effektiv.

Bei allen getesteten Zellreihen führte die Behandlung mit ^{213}Bi -DTPA-(F3)₂ zu einer signifikant reduzierten Klonalität bereits nach 24 Stunden und zu signifikant erhöhtem Zelltod mit einem maximalen Ansprechen nach drei Tagen. Diese Wirkung konnte in mehreren Tumorzellreihen von Karzinomen unterschiedlicher Ausgangsgewebe *in vitro* nachgewiesen werden, unter anderem in Zelllinien von Pankreas-, Colon-, Mamma- und Ovarialkarzinomen. Das Maximum dieses Effektes zeigte sich *in vitro* nach drei Tagen, *in vivo* mit einer Latenz von fünf Tagen.

Diese Ergebnisse decken sich mit den Untersuchungen zur Toxizität des Alpha-Emitters ^{213}Bi von Seidl et al. die zeigen konnten, dass die Zellschädigung durch einen an den α -Emitter ^{213}Bi gekoppelten Antikörper zu einem Zellzyklusarrest in der G2-Phase und über eine Erhöhung von TGF- β zur Zellnekrose führt. Hierbei trat ein verzögerter Zelltod mit ersten morphologischen Veränderungen nach 24-48 Stunden und einer vollständigen Desintegration der Zellen nach 96 Stunden auf (Seidl, 2007 #58).

In der Anwendung innerhalb eines Kompartimentes und bei intravaskulärer Tumorausbreitung (z.B. infolge von hämatologischen Erkrankungen) konnten einige Studien einen Vorteil der Alpha-Emitter gegenüber den β -Emittern nachweisen. Im Tiermodell der

Peritonealkarzinose beim Magenkarzinom zeigte sich in einer Studie von Seidl et al., dass der β -Emitter ^{177}Lu gekoppelt an den monoklonalen Antikörper gegen mutiertes E-Cadherin gegenüber dem ^{213}Bi -gekoppelten Antikörper hinsichtlich der Verlängerung der mittleren Überlebenszeit nur vergleichbare Ergebnisse erzielte, obwohl der Anteil an markierten ^{177}Lu -Antikörper um mehr als das 1000fache höher war. Wegen der wesentlich längeren HWZ und der langsamen Ausscheidung des ^{177}Lu -Immunkonjugates entwickelten sich außerdem Zeichen der chronischen Myelotoxizität in Form von sekundären Lymphomen und eine chronische Nephrotoxizität (Seidl, 2011 #59).

Neben der Anwendung des Alpha-Emitters ^{213}Bi in Körperkompartimenten konnte dessen Effektivität auch in präklinischen Studien bei intravesikaler Instillation als Anti-EGFR-Konjugat zur Therapie des oberflächlichen Urothelkarzinoms (Pfohl, 2009 #46) und im Modell der disseminierten Metastasierung bei Her2-neu-exprimierendem Mammakarzinom als Immunkonjugat erfolgreich eingesetzt werden (Song, 2008 #62).

Mit einer fraktionierten Therapie mit $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ im Modell einer frühen Peritonealkarzinose konnte ich eine partielle Remission nachweisen, die z.T. unterhalb der Nachweisgrenze des Optical Imagings lag. Hierbei scheint die Bindung und Internalisierung in die Zellen eine wichtige Rolle zu spielen, denn die Verabreichung gleicher Mengen von $^{213}\text{Bi-DTPA}$ verursachte *in vivo* keinen signifikanten Effekt und führte *in vitro* lediglich zu einer kurzfristigen Reduktion der Tumormasse ohne Auswirkungen auf das Gesamtüberleben, wohingegen in vergleichenden Aufnahmen zur Verteilung und Ausscheidung beider Verbindungen die Resorption in den Kreislauf und der Blutpool für $\text{DTPA-}^{213}\text{Bi}$ wesentlich höher war als für $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$.

Die hierbei entstandene lokale Eingrenzung der Tumormasse blieb außerdem über einen langen Zeitraum erhalten.

Aber auch bei der fortgeschrittenen Peritonealkarzinose mit großen, vaskularisierten Tumorknoten in disseminierter Aussaat wurde mit $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ eine Tumorregression unterhalb des Ausgangsstadiums erreicht. Die fraktionierte intraperitoneale Injektion von $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ führte bei Mäusen mit Peritonealkarzinose einer Brustkrebszellreihe zu einer Stagnation des Tumorzustands während der Therapie und zu einer lang anhaltenden Regression des Tumorgewebes mit einer Latenz von 1-2 Wochen nach Therapieende.

Dies führte zu einer signifikanten Verlängerung der Überlebenszeit der Mäuse.

Bildgebende Verfahren wie PET und Autoradiographie zeigten eine Anreicherung in der Peripherie der Metastasen und in den zentralen perivaskulären Anteilen des Tumors, wohingegen nur geringe Mengen der Radioaktivität in zahlreichen untersuchten

Kontrollorganen und -Gewebe gefunden wurde, die am ehesten dem in den Organen vorhandenen Blutpool entsprechen. Lediglich in den Nieren zeigte sich eine Anreicherung des Nuklids, was auf die renale Elimination des nur 7,5 kDa großen Peptids zurückzuführen ist. Die unspezifische Wirkung des freien Wismut führte dagegen in den Zellversuchen erst ab einer vielfach höheren Dosis zu ähnlich zytotoxischer Wirkung, in der Biodistribution zu einer schnelleren Resorption aus dem Peritoneum in den Kreislauf und zu einer erhöhten Hintergrundbelastung für den Organismus. Im Therapieversuch mit DTPA-²¹³Bi kam es nur zu einer Stagnation des Tumorwachstums für die Dauer der fraktionierten Therapie. Dies zeigt, dass die F3-vermittelte Aufnahme in den Zellkern eine Verlängerung und Verstärkung der Wirkung des α -Emitters ermöglicht.

Obwohl α -Emitter starke zytotoxische Wirkung zeigen, haben wir bei den mit ²¹³Bi-DTPA-(F3)₂ in einer fraktionierten Therapie behandelten Tieren über einen Untersuchungszeitraum von drei Monaten keine schweren Nebenwirkungen der Therapie feststellen können.

In vorhergehenden Studien wurde an FITC gekoppeltes F3 auch in Progenitorzellen der Haut und des Knochenmarks gefunden. In meinen Biodistributionsversuchen wurde keine erhöhte Aufnahme in diesen Organen gefunden. Diese Diskrepanz ist wahrscheinlich darauf zurück zu führen, dass die mittels Biodistribution ermittelte Gesamtaktivität der Organe, also auch die innerhalb der Gefäße vorliegende ungebundene, zirkulierende Fraktion von ²¹³Bi-DTPA-(F3)₂ die Anreicherung innerhalb dieser kleinen Zellpopulation maskiert.

Es erfolgte in unserem Versuchsansatz zwar keine therapiebegleitende Untersuchung des Blutbildes zum Ausschluss einer Knochenmarkschädigung. Allgemeine Symptome einer Schädigung des teilungsfähigen Zellpools von Knochenmark, Haut und Schleimhäuten der Versuchstiere unter ²¹³Bi-DTPA-(F3)₂-Therapie, wie Ulzerationen, Diarrhoe oder erhöhte Blutungsneigung, wurden nicht beobachtet. Bei den mit ²¹³Bi-DTPA behandelten Tieren zeigten einige aber einen vorübergehenden Gewichtsverlust von bis zu 25% während und direkt im Anschluss an die Therapie.

Behr et al. beschreiben für einen intravasal eingesetzten Antikörper, der mit ²¹³Bi markiert war, eine chronische Nierenschädigung, die durch einen Anstieg der Harnstoff-, später auch der Kreatinin-Werte, 6-7 Wochen nach Therapie festgestellt werden konnte (Behr, 1997 #7). Peptide einer Größe bis 15 kDa wie F3 werden generell renal filtriert und z.T. tubulär rückresorbiert.

Nach fraktionierter Therapie von ²¹³Bi-DTPA-(F3)₂ zeigte sich jedoch im Vergleich zu den Kontrollgruppen keine signifikante Erhöhung von Harnsäure oder Kreatinin als Anzeichen für

die Entstehung eines strahleninduzierten chronischen Nierenschadens, obwohl alle Tiere mehr als sieben Wochen überlebten.

Zusammengenommen erscheint $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ als ein viel versprechendes Mittel für die Therapie einer Peritonealkarzinose.

Da bei manchen Tumorentitäten, wie z.B. dem Ovarialkarzinom, eine hohe Anzahl von Patienten schon bei Diagnosestellung an einer Peritonealkarzinose leiden, könnte $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ zur Behandlung kleinster Tumorabsiedlungen im Peritoneum sinnvoll eingesetzt werden. Die fortgeschrittene Peritonealkarzinose spricht sehr schlecht auf etablierte systemische Therapieansätze wie Chemotherapie an und ist mit schwerwiegenden Komplikationen wie Aszites vergesellschaftet. Da meine Versuche anhand eines Tiermodells auch hier zur Reduktion des Tumors führten, könnte durch die Therapie mit $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ eine Tumorreduktion und eine Verbesserung der damit verbundenen Komplikationen möglich sein.

Da auch mit einer fraktionierten Therapie keine vollständige Elimination der Tumorzellen zu belegen war, wäre ein sinnvoller kurativer Ansatz die Unterstützung der chirurgischen Therapie oder eine Kombination mit systemischen Therapieansätzen. Solche Therapieschemata existieren für solide Tumore in Form einzelner präklinischer Studien (Vallon, 2012 #69). In einem Tiermodell mit peritoneal metastasierten Kolonkarzinomen konnte gezeigt werden, dass eine Radioimmuntherapie die Prognose einer zytoreduktiven Therapie verbessert und zwar umso mehr, je geringer der zeitliche Abstand zwischen den beiden Therapien gewählt wird (Beck, 2007 #5).

Christian et al beschreibt die Aufnahme von F3 in eine Bandbreite von unterschiedlichen Tumorzelllinien. Unsere *in vitro* Versuche konnten die Wirksamkeit von $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ ebenfalls bei mehreren Zelllinien nachweisen. Dies macht $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ für die Behandlung einer Peritonealkarzinose als Folgeerkrankung einer Vielzahl von Tumorentitäten interessant.

6. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, eine geeignete Verbindung des Tumor Homing Peptids F3 und des Radionuklids Wismut (^{213}Bi) hinsichtlich der Stabilität und Bindungseigenschaften herzustellen und deren zytotoxische Wirkung in unterschiedlichen soliden Tumorentitäten zu bestimmen. Hierzu wurden zunächst Karzinomzelllinien unterschiedlicher Herkunftsgewebe getestet; in einem zweiten Schritt in einem Mausmodell mit intraperitonealen Xenograft-Tumoren die Eigenschaften *in vivo* überprüft.

Bei Wismut (^{213}Bi) handelt es sich um einen α -Emitter. α -Emitter sind Radionuklide mit einem hohen linearen Energietransfer; sie übertragen bei ihrem Zerfall einen Heliumkern. Aufgrund ihrer geringen Masse wird die dadurch frei werdende hohe Energie nur innerhalb eines kleinen Radius von ein bis zwei Zelldurchmessern übertragen. Die Übertragung dieser hohen Energie auf nur wenige Zellen in unmittelbarer Nähe zu dem Nuklid hat meistens eine letale Wirkung, da auf chromosomaler Ebene vor allem irreparable Schäden verursacht werden, in erster Linie Doppelstrangbrüche. Auf zellulärer Ebene sind die genauen Mechanismen, die nachgeschaltet zum Zelluntergang führen, noch nicht vollständig geklärt, aber es spricht vieles dafür, dass es zu einer verzögerten Nekrose der Zellen über eine Aktivierung von TGF- β kommt (Seidl, 2007 #58).

Wismut zeichnet sich zusätzlich dadurch aus, dass es bei seinem Zerfall neben den α -Partikeln auch γ -Strahlen frei setzt. Diese wiederum können in einer γ -Kamera oder einem γ -Counter zu diagnostischen Zwecken detektiert werden.

Die hohe zytotoxische Wirkung von α -Emittern kann gewinnbringend in der onkologischen Therapie eingesetzt werden, wenn man eine selektive Anreicherung dieser Nuklide innerhalb des gewünschten neoplastischen Gewebes erreichen kann. Dies trifft vor allem für kleine Tumorabsiedlungen zu, da eine vollständige Tumorelimination bei dem kleinen Wirkungsradius der α -Emitter eine homogene Verteilung im neoplastischen Gewebe voraussetzt. Deshalb sind α -Emitter für kleinste metastatische Tumorabsiedlungen, wie eine rasenartige Metastasierung in Körperkompartimenten (z.B. der Peritonealkarzinose), besonders geeignet.

Dies konnte in vielen präklinischen Studien mit Antikörpern als Trägermoleküle gezeigt werden (Borchardt, 2003 #12; Palm, 2007 #44; Raja, 2007 #49; Beyer, 2004 #9; Milenic, 2004 #42). Es handelt sich bei Antikörpern jedoch um große Proteine von ca. 150 kDa, die deshalb nicht renal filtriert werden können und lange Zirkulationszeiten aufweisen, was

gerade bei intravenöser Injektion zu einer unspezifischen Hintergrundbelastung von gut durchbluteten Organsystemen führen kann.

Daher wurde in der vorliegenden Studie ein kleines Peptid als Trägermolekül untersucht, da es *in vivo* besser in unterschiedliche Kompartimente wechseln und zusätzlich renal filtriert werden kann, was eine wesentlich schnellere Elimination aus dem Körper ermöglicht.

Bei dem Peptid F3 handelt es sich um ein Tumor Homing Peptid, das mit der Phage Display Methode gefunden wurde (Siehe Einleitung, Seite 12). Dieses Peptid besteht aus 31 Aminosäuren und stellt ein Fragment des High Mobility Group Proteins HMGN2 dar, einem ubiquitär vorkommenden Nicht-Histon-Protein des Zellkerns. Es konnte nachgewiesen werden, dass F3 mit hoher Affinität selektiv an Karzinomzellen und neu gebildete, „unreife“ Endothelien bindet, wie sie entstehen, wenn ein Karzinom durch Ausschüttung von Wachstumsfaktoren (z.B. EGF) eine eigene Gefäßversorgung induziert (sog. angiogenic switch) (Porkka, 2002 #47). Ursprünglich waren diese Endothelien die eigentliche Zielstruktur, da es sich hierbei nicht um eigentlich neoplastisches Gewebe handelt. Somit sind die Gefäße zum einen nicht spezifisch für eine Tumorentität, sondern bei vielen Neoplasien in gleicher Weise vorhanden (Angiogenese tritt ansonsten bei erwachsenen Individuen nur noch bei chronisch entzündlichen und degenerativen Erkrankungen auf). Zum anderen unterliegt dieser nicht neoplastische „Anteil“ des Tumors auch nicht dem Problem der „Entdifferenzierung“, die über eine genetische Instabilität des Gewebes zu einer Variabilität im Therapieansprechen führen kann.

In einer nachfolgenden Studie konnte man den Bindungspartner für F3 an der Zytoplasmamembran isolieren. Hierbei handelt es sich um Nukleolin, ein hoch konserviertes, ubiquitäres Protein, das in fast allen Säugetierzellen exprimiert ist, aber nur in proliferierenden Zellen an die Oberfläche der Zellen transferiert wird (Christian, 2003 #18; Hovanessian, 2000 #30). Dementsprechend konnte es in allen untersuchten neoplastischen Zelllinien an der Zellmembran nachgewiesen werden.

Dass F3 außerdem noch, entweder über die Vermittlung des Bindungspartners Nukleolin oder aber über das im F3-Peptid vorhandene Kernlokalisierungssignal selbst, in den Zellkern transportiert wird und somit in unmittelbare Nachbarschaft zur DNA gelangt, lässt es als einen idealen Vektor für einen α -Emitter erscheinen.

Um eine *in vitro* und *in vivo* zuverlässige Bindung zwischen dem Peptid F3 und dem α -Emitter ^{213}Bi zu erreichen, wurden zwei F3-Peptide an den Chelator DTPA kovalent gebunden. DTPA bildet mit Radiometallen wie ^{213}Bi oder ^{68}Ga , einem γ -Emitter, einen Komplex, der gut wasserlöslich ist und hinsichtlich seiner Bindungseigenschaften mit denen einer kovalenten Bindung gleich zu setzen ist.

Das Wismut wurde aus einem $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ - in-House-Generator gewonnen. Eine Konzentration von 3,3 μg des Peptids in Wasser gelöst pro mCi (37 MBq) Wismut ergab in Vorversuchen die geeignete spezifische Bindung von >90%. Die Stabilität der Verbindung wurde außerdem über mehrere Halbwertszeiten des Nuklids in Kulturmedium, Mäuseserum und malignem Aszites *in vitro* bestätigt.

Auch der γ -Emitter ^{68}Ga wurde für die Durchführung eines Tier-PETs auf ähnliche Weise an das Peptid gekoppelt.

In den *in vitro* Versuchen wurde zunächst die Spezifität der Bindung von ^{213}Bi -DTPA-(F3)₂ an Nukleolin durch Zugabe eines Überschusses von unmarkiertem DTPA-(F3)₂ erfolgreich nachgewiesen.

Unter Verwendung der auch später für die *in vitro*-Versuche benutzten humanen Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-435, konnte die Bindung und Internalisierung von ^{213}Bi -DTPA-(F3)₂ in den unterschiedlichen Zellkompartimenten (Zytoplasmamembran und Zytoplasma versus Zellkern) nachgewiesen werden. Die Zellen wurden hierbei mit ^{213}Bi -DTPA-(F3)₂ oder gleichen Konzentrationen von freiem ^{213}Bi in aufsteigenden Inkubationszeiten von bis zu zwei HWZ des Nuklids inkubiert, der Überstand und die genannten Zellkompartimente voneinander getrennt und der jeweils darin vorhandene Nuklidgehalt mit dem γ -Counter ermittelt und auf das Volumen umgerechnet.

Hierbei ergab sich schon nach 5 Minuten eine Anreicherung der Aktivität pro μl im Zellkern von dem bis zu 200fachen der Aktivität des Überstandes, im Zytoplasma war die Aktivität pro μl bis zu 30fach höher als die im Überstand. Da die Werte auch über die gesamte Expositionszeit von max. 2 HWZ deutlich erhöht blieb (Zellkern ca. 100fach, Zytoplasma ca. 30fach) konnte hierdurch gezeigt werden, dass durch die Koppelung des α -Emitters ^{213}Bi an DTPA-(F3)₂ eine Mehrzahl der Zerfälle in unmittelbarer Nähe der DNA stattfindet.

Danach wurde an der Zelllinie MDA-MB-435 ein Cell Viability Test durchgeführt, bei dem die Wirkung von aufsteigenden Konzentrationen von ^{213}Bi -DTPA-(F3)₂ gegenüber freiem

^{213}Bi auf das Überleben der Zellen getestet wurde, in dem die Anzahl der vitalen Karzinomzellen nach einer Inkubationszeit von drei Tagen bestimmt wurde. Hiermit konnte nachgewiesen werden, dass die spezifische Toxizität von $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ aufgrund ihrer Aufnahme in die Zellen signifikant höher ist als die unspezifische Toxizität des Wismuts.

Diese Ergebnisse konnten durch einen Colony Formation Assay bestätigt werden, in dem wiederum an MDA-MB-435-Zellen zunächst die spezifische Aktivität des $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ der unspezifischen Aktivität des Wismuts gegenüber gestellt wurde. Hierzu wurden die Zellen über 12 Stunden mit aufsteigenden Konzentrationen von $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ bzw. freiem Wismut inkubiert, die Zellen dann abgelöst, sodass eine Einzelzellsuspension entstand, die dann in Soft Agar mit Nährmedium überführt und 14 Tage im Brutschrank belassen wurde. Danach konnten die Zellkolonien, die aus den noch teilungsfähigen, vitalen Zellen entstanden waren, am Mikroskop ausgezählt und mit einer mitgeführten, unbehandelten Kontrollgruppe verglichen werden. Zusätzlich zu der genannten Zelllinie wurden außerdem noch weitere Zelllinien solider Tumore, die häufig eine Peritonealkarzinose verursachen (humane Ovarialkarzinomzelllinie OVCAR3, humane Pankreaskarzinomzelllinie MIAPACA, humane Kolonkarzinomzelllinie CMT6) untersucht und für jede ein ED50-Wert ermittelt (Effektivdosis, die zu 50% der gewünschten Wirkung führt). Alle untersuchten Karzinomzelllinien zeigten sogar ein noch besseres Ansprechen auf $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ als unsere Standardzelllinie.

Nach der Bestätigung der spezifischen Wirkung von $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ *in vitro* wurde die Wirkung von $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ in einem Mausmodell *in vivo* getestet. Hierzu wurden die mit Luziferase transfizierten Zellen der Zelllinie MDA-MB-435 intraperitoneal injiziert und zur Simulation unterschiedlich fortgeschrittener Stadien der Peritonealkarzinose nach einer Latenz von 4 und 16 Tagen mit insgesamt 11,1 MBq $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ in sechs Fraktionen i.p. behandelt. Als Kontrolle dienten gleiche Konzentrationen von $^{213}\text{Bi-DTPA}$, als Negativkontrolle wurde PBS injiziert. Der Gesundheitszustand der Tiere wurde laufend kontrolliert und anhand ihrer Überlebenszeit eine Kaplan-Meier-Kurve erstellt.

Die Kontrolle des Tumorwachstums und des Therapieansprechens erfolgte mittels *in vivo* Biolumineszenz Imaging (sog. Optical Imaging) von jeweils zwei bis drei Tieren jeder Gruppe. Hierbei wurde durch i.p.-Injektion von D-Luciferin die mit Luciferase transfizierten Tumorzellen zur Lichtemission angeregt. Mit einer CCD-Kamera wurde die Lichtemission gemessen und ausgewertet.

Zusätzlich wurde an je drei Tieren eine Biodistribution und an zwei Mäusen exemplarisch ein Tier-PET durchgeführt, um die Aufnahme und Verteilung von an ein Nuklid gekoppeltes DTPA-(F3)₂ (im Tier-PET ⁶⁸Ga-DTPA-(F3)₂) verfolgen zu können.

Da nach dem Tod der Tiere bei der makroskopischen Examination der Bauchhöhle Unterschiede in der Ausbreitung und Verteilung der Tumorabsiedlungen auffielen, wurde auch hier exemplarisch an jeweils zwei Tieren eine Therapie nach dem oben beschriebenen Schema mit ²¹³Bi-DTPA-(F3)₂ im Vergleich zu ²¹³Bi-DTPA durchgeführt und nach einem festgelegten Zeitraum von 50 Tagen die makroskopisch sichtbare Verteilung der Peritonealkarzinose anhand der Präparation von Dick- und Dünndarm belegt.

Um eine Schädigung der Nieren durch ²¹³Bi-DTPA-(F3)₂ zu überprüfen, was wegen der renalen Elimination des Peptids am ehesten als Nebenwirkung zu erwarten war, wurden zusätzlich in beiden Therapiegruppen nach dem Tod der Tiere die Kreatinin- und Harnstoffwerte der Tiere gegenüber der Kontrollgruppe untersucht.

Auch *in vivo* konnte eine Anreicherung der Aktivität innerhalb der Tumorabsiedlungen mittels Biodistribution und Tier-PET nachgewiesen werden. Die eine Stunde nach i.p.-Injektion durchgeführte Biodistribution zeigte, dass insgesamt ca. 30 % der Aktivität innerhalb des neoplastischen Gewebes vorliegt. Auch nach 90 Minuten (2 HWZ von ²¹³Bi) ist in der bildlichen Darstellung mittels Tier-PET noch eine deutliche Anreicherung im Peritoneum sichtbar sowie aufgrund der schnellen renalen Elimination eine Anreicherung in den Nieren.

Bei der Behandlung des frühen Stadiums der Peritonealkarzinose konnte nach Therapie mit ²¹³Bi-DTPA-(F3)₂ mittels Optical Imaging eine vorübergehende, signifikante Abnahme der Biolumineszenz korrespondierend zur intraperitonealen Tumormasse von 39% des Ausgangswertes erreicht werden, was einer partiellen Remission entspricht (p<0,02). Im Vergleich zur Kontrollgruppe ergab sich für die Tiere eine hoch signifikante Verlängerung der Überlebenszeit von über 80% (p<0,01).

Außerdem konnte anhand der makroskopischen Examination des Peritoneums bzw. des Dünn- und Dickdarms zum Todeszeitpunkt der Tiere gezeigt werden, dass die intraperitoneale Ausbreitung bei der ²¹³Bi-DTPA-(F3)₂-Gruppe lokal begrenzt bleibt, auch über den langen Zeitraum von ca. einem Monat nach der Therapie.

Bei der fortgeschrittenen Peritonealkarzinose erfolgte durch die Therapie mit $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ ebenfalls eine signifikante Reduktion der Tumorlast bis auf das Niveau vor der Therapie. Auch in dieser Gruppe konnte trotz der fortgeschrittenen Tumorerkrankung eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit gegenüber den Kontrollgruppen erreicht werden ($p < 0,05$).

Hinweise auf signifikante Nebenwirkungen der fragmentierten Therapie mit $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ oder $^{213}\text{Bi-DTPA}$ traten nicht auf; insbesondere die Kreatinin- und Harnstoffwerte der Tiere unterschieden sich nicht von denen der PBS-behandelten Tiere der Kontrollgruppe.

Abschließend lässt sich somit schlussfolgern, dass diese präklinische Studie vielversprechende Ergebnisse zur Therapie mit $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ liefern konnte.

In Zusammenschau mit einzelnen schon vorliegenden Phase-I-Studien zur Radionuklidtherapie mit α -Emittern von soliden und hämatologischen neoplastischen Erkrankungen stellt $^{213}\text{Bi-DTPA-(F3)}_2$ einen weiteren vielversprechenden Kandidaten insbesondere zur Therapie von in Körperkompartimente metastasierte solide Karzinome dar. Hierbei ist auch eine begleitende zytoreduktive Radionuklidtherapie denkbar.

1. Allen, B.J., Raja, C., Rizvi, S., Li, Y., Graham, P., Thompson, J.F., Reisfeld, R.A., Kearsley, J., Intralesional targeted alpha therapy for metastatic melanoma. *Cancer Biol Ther*, 2005. **4**(12):1318-24.
2. Andersson H., E. Cederkrantz, T. Bäck, C. Divgi, J. Elgqvist, J. Himmelman, G. Horvath, L. Jacobsson, H. Jensen, S. Lindegren, S. Palm, R. Hultborn, R. Andersson, Intraperitoneal alpha-particle radioimmunotherapy of ovarian cancer patients: pharmacokinetics and dosimetry of (211)At-MX35 F(ab')₂- a phase I study. *J Nucl Med*, 2009. **50**(7):1153-60.
3. Arap, W., M. G. Kolonin, M. Trepel, J. Lahdenranta, M. Cardo-Vila, R. J. Giordano, P. J. Mintz, P. U. Ardel, V. J. Yao, C. I. Vidal, L. Chen, A. Flamm, H. Valtanen, L. M. Weavind, M. E. Hicks, R. E. Pollock, G. H. Botz, C. D. Bucana, E. Koivunen, D. Cahill, P. Troncoso, K. A. Baggerly, R. D. Pentz, K. A. Do, C. J. Logothetis, R. Pasqualini, Steps toward mapping the human vasculature by phage display. *Nat Med*, 2002. **8**(2): p. 121-7.
4. Baidoo, K.E., K. Yong, and M.W. Brechbiel, Molecular pathways: targeted alpha-particle radiation therapy. *Clin Cancer Res*, 2013. **19**(3): p. 530-7.
5. Beck, R., Seidl, C. B. Pfof, A. Morgenstern, F. Bruchertseifer, H. Baum, M. Schwaiger, R. Senekowitsch-Schmidtke, 213Bi-radioimmunotherapy defeats early-stage disseminated gastric cancer in nude mice. *Cancer Sci*, 2007. **98**(8): p. 1215-22.
6. Behr, T.M., G.Sgorous, M. G. Stabin, M. Behe, C. Angerstein, R. D. Blumenthal, C. Apostolidis, R. Molinet, R. M. Sharkey, L. Koch, D. M. Goldenberg, W. Becker, Studies on the red marrow dosimetry in radioimmunotherapy: an experimental investigation of factors influencing the radiation-induced myelotoxicity in therapy with beta-, Auger/conversion electron-, or alpha-emitters. *Clin Cancer Res*, 1999. **5**(10 Suppl): p. 3031s-3043s.
7. Behr, T.M., R.M.Sharkey, G. Sgouros, R. D. Blumenthal, R. M. Dunn, K. Kolbert, G. L. Griffiths, J. A. Siegel, W. S. Becker, D. M. Goldenberg, Overcoming the nephrotoxicity of radiometal-labeled immunoconjugates: improved cancer therapy administered to a nude mouse model in relation to the internal radiation dosimetry. *Cancer*, 1997. **80**(12 Suppl): p. 2591-610.
8. Bergers, G. and L.E. Benjamin, Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(6): p. 401-10.
9. Beyer, G.J., M. Miederer, S. Vranjes-Duric, J. J. Comor, G. Kunzi, O. Hartley, R. Senekowitsch-Schmidtke, D. Soloviev, F. Buchegger, Targeted alpha therapy in vivo: direct evidence for single cancer cell kill using 149Tb-rituximab. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2004. **31**(4): p. 547-54.
10. Bicknell, K., G. Brooks, P. Kaiser, H. Chen, B. K. Dove, J. A. Hiscox, Nucleolin is regulated both at the level of transcription and translation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **332**(3): p. 817-22

11. Bloechl, S., R. Beck, C. Seidl, A. Morgenstern, M. Schwaiger, R. Senekowitsch-Schmidtke, Fractionated locoregional low-doseradioimmunotherapy improves survival in a mouse model of diffuse-type gastric cancer using a ²¹³Bi-conjugated monoclonal antibody. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(19 Pt 2):7070s-1014s.
12. Borchardt, P.E., R. R. Yuan, M. Miederer, M. R. McDevitt, D. A. Scheinberg, Targeted actinium-225 in vivo generators for therapy of ovarian cancer. *Cancer Res*, 2003. **63**(16): p. 5084-90.
13. Boskovitz, A., R.E. McLendon, T. Okamura, J. H. Sampson, D. D. Bigner, M. R. Zalutsky, Treatment of HER2-positive breast carcinomatous meningitis with intrathecal administration of alpha-particle-emitting (²¹¹At)-labeled trastuzumab, *nucl med Biol*. 2009. **36**(6):659-69.
14. Bosman, F., Carneiro, F, Hruban, RH, Theise, ND, WHO Classification of Tumours of the Digestive System. 2010: IARC Press. p. 283.
15. Breeman, W.A., M. de Jong, E. de Blois, B. F. Bernard, M. Konijnenberg, E. P. Krenning, Radiolabelling DOTA-peptides with ⁶⁸Ga. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2005. **32**(4): p. 478-85.
16. Buchhorn, H.M., C. Seidl, R. Beck, D. Saur, C. Apostolidis, A. Morgenstern, M. Schwaiger, R. Senekowitsch-Schmidtke, Non-invasive visualisation of the development of peritoneal carcinomatosis and tumour regression after ²¹³Bi-radioimmunotherapy using bioluminescence imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2007. **34**(6): p. 841-9.
17. Bustin, M., Chromatin unfolding and activation by HMGN(*) chromosomal proteins. *Trends Biochem Sci*, 2001. **26**(7): p. 431-7.
18. Christian, S., J. Pilch, M. E. Akerman, K. Porkka, P. Laakkonen, E. Ruoslahti, Nucleolin expressed at the cell surface is a marker of endothelial cells in angiogenic blood vessels. *J Cell Biol*, 2003. **163**(4): p. 871-8.
19. Cordier, D., f. Forrer, F. Bruchertseifer, A. Morgenstern, C. Apostolidis, S. Good, J. Muller-Brand, H. Macke, J. C. Reubi, A. Merlo, Targeted alpha-radionuclide therapy of functionally critically located gliomas with ²¹³Bi-Dota-[Thi8, Met(O₂)11]-substance P: a pilot trial, *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2010. **37**(7):1335-44.
20. Dahle, J., N. Abbas, O. S.Bruland, R. H. Larsen, Toxicity and relative biological effectiveness of alpha emitting radioimmunoconjugates. *Curr Radiopharm*, 2011. **4**(4): p. 321-8.
21. Davidoff, A.M., C. Y. Ng, P. Brown, M. A. Leary, W. W. Spurbeck, J.Zhou, E. Horwitz, E. F. Vanin, A. W. Nienhuis, Bone marrow-derived cells contribute to tumor neovasculature and, when modified to express an angiogenesis inhibitor, can restrict tumor growth in mice. *Clin Cancer Res*, 2001. **7**(9): p. 2870-9.

22. de Verdugo, U.R., H. C. Selinka, M. Huber, B. Kramer, J. Kellermann, P. H. Hofschneider, R. Kandolf, Characterization of a 100-kilodalton binding protein for the six serotypes of coxsackie B viruses. *J Virol*, 1995. **69**(11): p. 6751-7.
23. Folkman, J., Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*, 1995. **1**(1): p. 27-31.
24. Forrer, F., H. Uusijarvi, D. Storch, H. R. Maecke, J. Mueller-Brand, Treatment with ¹⁷⁷Lu-DOTATOC of patients with relapse of neuroendocrine tumors after treatment with ⁹⁰Y-DOTATOC. *J Nucl Med*, 2005. **46**(8): p. 1310-6.
25. Ginisty, H., H. Sicard, B. Roger, P. Bouvet, Structure and functions of nucleolin. *J Cell Sci*, 1999. **112** (Pt 6): p. 761-72.
26. Gunn, A.J., M.W. Brechbiel, and P.L. Choyke, The emerging role of molecular imaging and targeted therapeutics in peritoneal carcinomatosis. *Expert Opin Drug Deliv*, 2007. **4**(4): p. 389-402.
27. Hastings, J.W., Chemistries and colors of bioluminescent reactions: a review. *Gene*, 1996. **173**(1 Spec No): p. 5-11.
28. Hock, R., T. Furusawa, T. Ueda, M. Bustin, HMG chromosomal proteins in development and disease. *Trends Cell Biol*, 2007. **17**(2): p. 72-9.
29. Hovanessian, A.G., Midkine, a cytokine that inhibits HIV infection by binding to the cell surface expressed nucleolin. *Cell Res*, 2006. **16**(2): p. 174-81.
30. Hovanessian, A.G., F. Puvion-Dutilleul, S. Nisole, J. Svab, E. Perret, J. S. Deng, B. Krust, The cell-surface-expressed nucleolin is associated with the actin cytoskeleton. *Exp Cell Res*, 2000. **261**(2): p. 312-28.
31. Huang, Y., H. Shi, H. Zhou, X. Song, S. Yuan, Y. Luo, The angiogenic function of nucleolin is mediated by vascular endothelial growth factor and nonmuscle myosin. *Blood*, 2006. **107**(9): p. 3564-71.
32. Imam, S.K., Advancements in cancer therapy with alpha-emitters: a review. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2001. **51**(1): p. 271-8.
33. Jordan, P., H. Heid, V. Kinzel, D. Kubler, Major cell surface-located protein substrates of an ecto-protein kinase are homologs of known nuclear proteins. *Biochemistry*, 1994. **33**(49): p. 14696-706.
34. Jurcic, J.G., S.M. Larson, G. Sgouros, M. R. McDevitt, R. D. Finn, C. R. Divgi, A. M. Ballangrud, K. A. Hamacher, D. Ma, J. L. Humm, M. W. Brechbiel, R. Molinet, D. A.

- Scheinberg, Targeted alpha particle immunotherapy with ²¹³Bi-an alpha particle emitter, *Blood*, 2002. **100**(4):1233-9.
35. Kennel, S. J., R. Boll, M. Stabin, H. M. Schuller, S. Mirzadeh, Radioimmunotherapy of micrometastases in lung with vascular targeted ²¹³Bi. *Br J Cancer*, 1999. **80**(1-2):175-84.
36. Kim, Y. and M.W. Brechbiel, An overview over targeted alpha therapy. *Tumour Biol*, 2011. **33**(3):573-90.
37. Ma, N., S. Matsunaga, H. Takata, R. Ono-Maniwa, S. Uchiyama, K. Fukui, Nucleolin functions in nucleolus formation and chromosome congression. *J Cell Sci*, 2007. **120**(Pt 12): p. 2091-105.
38. McDevitt, M.R., D. Ma, L. T. Lai, J. Simon, P. Borchardt, R. K. Frank, K. Wu, V. Pellegrini, M. J. Curcio, M. Miederer, N. H. Bander, D. A. Scheinberg, Tumor therapy with targeted atomic nanogenerators. *Science*, 2001. **294**(5546): p. 1537-40.
39. Miederer, M., G. Henriksen, A. Alke, I. Mossbrugger, L. Quintanilla-Martinez, R. Senekowitsch-Schmidtke, M. Essler, Preclinical evaluation of the alpha-particle generator nuclide ²²⁵Ac for somatostatin receptor radiotherapy of neuroendocrine tumors. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(11): p. 3555-61.
40. Miederer, M., D.A. Scheinberg, and M.R. McDevitt, Realizing the potential of the Actinium-225 radionuclide generator in targeted alpha particle therapy applications. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008. **60**(12): p. 1371-82.
41. Miederer, C. Seidl, G. J. Beyer, D. E. Charlton, S. Vranjes-Duric, J. J. Comor, R. Huber, T. Nikula, C. Apostolidis, C. Schuhmacher, K. F. Becker, R. Senekowitsch-Schmidtke, Comparison of the radiotoxicity of two alpha-particle-emitting immunoconjugates, terbium-149 and bismuth-213, directed against a tumor-specific, exon 9 deleted (d9) E-cadherin adhesion protein. *Radiat Res*, 2003. **159**(5):612-20.
42. Milenic, D., K. Garmestani, E. Dadachova, L. Chappell, P. Albert, D. Hill, J. Schlom, M. Brechbiel, Radioimmunotherapy of human colon carcinoma xenografts using a ²¹³Bi-labeled domain-deleted humanized monoclonal antibody. *Cancer Biother Radiopharm*, 2004. **19**(2): p. 135-47.
43. Nayak, T.K., J. P. Norenberg, T. L. Anderson, E. R. Prossnitz, M. G. Stabin, R. W. Atcher, Somatostatin-receptor-targeted alpha-emitting ²¹³Bi is therapeutically more effective than beta(-)-emitting ¹⁷⁷Lu in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Nucl Med Biol*, 2007. **34**(2): p. 185-93.
44. Palm, S., T. Back, I. Claesson, A. Danielsson, J. Elgqvist, S. Frost, R. Hultborn, H. Jensen, S. Lindegren, L. Jacobsson, Therapeutic efficacy of astatine-211-labeled trastuzumab on radioresistant SKOV-3 tumors in nude mice. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2007. **69**(2): p. 572-9.

45. Pasqualini, R. and E. Ruoslahti, Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries. *Nature*, 1996. **380**(6572): p. 364-6.
46. Pfost, B., C. Seidl, M. Autenrieth, D. Saur, F. Bruchertseifer, A. Morgenstern, M. Schwaiger, R. Senekowitsch-Schmidtke, Intravesical alpha-radioimmunotherapy with ²¹³Bi-anti-EGFR-mABdefeats human bladder carcinoma in xenografted nude mice. *J Nucl Med*, 2009. **50**(10):1700-8.
47. Porkka, K., P. Laakkonen, J. A. Hoffman, M. Bernasconi, E. Ruoslahti, A fragment of the HMGN2 protein homes to the nuclei of tumor cells and tumor endothelial cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(11): p. 7444-9.
48. ProtocolOnline. <http://www.bio.com/protocolstools/protocol.jhtml?id=p2151>, Cell Viability Assay. (Stand: 13.11.2007).
49. Raja, C., P. Graham, S. M. Abbas Rizvi, E. Song, H. Goldsmith, J. Thompson, A. Bosserhoff, A. Morgenstern, C. Apostolidis, J. Kearsley, R. Reisfeld, B. J. Allen, Interim analysis of toxicity and response in phase 1 trial of systemic targeted alpha therapy for metastatic melanoma. *Cancer Biol Ther*, 2007. **6**(6): p. 846-52.
50. Rehemtulla, A., L. D. Stegman, S. J. Cardozo, S. Gupta, D. E. Hall, C. H. Contag, B. D. Ross, Rapid and quantitative assessment of cancer treatment response using in vivo bioluminescence imaging. *Neoplasia*, 2000. **2**(6): p. 491-5.
51. Reubi, J.C., H.R. Macke, and E.P. Krenning, Candidates for peptide receptor radiotherapy today and in the future. *J Nucl Med*, 2005. **46 Suppl 1**: p. 67S-75S.
52. Reyes-Reyes, E.M. and S.K. Akiyama, Cell-surface nucleolin is a signal transducing P-selectin binding protein for human colon carcinoma cells. *Exp Cell Res*, 2008. **314**(11-12): p. 2212-23.
53. Rosai, J., *Surgical Pathology*. Edinburgh, London, New York. Mosby. 9. ed. 2004. Volume 1, p. 1069-1073.
54. Rosenblat, T.L., M.R. McDevitt, D. A. Mulford, N. Pandit-Taskar, C. R. Divgi, K. S. Panageas, M. L. Heaney, S. Chanel, A. Morgenstern, G. Sgouros, S. M. Larson, D. A. Scheinberg, J. G. Jurcic, Sequentialcytarabine and alpha-particle immunotherapy with bismuth-213-lintuzumab (HuM195) for acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*, 2010. **16**(21):5303-11.
55. Ruoslahti, E., Targeting tumor vasculature with homing peptides from phage display. *Semin Cancer Biol*, 2000. **10**(6): p. 435-42.

56. Schicha H, , O. Schober, Ed. Nuklearmedizin. Basiswissen und klinische Anwendung. 6 ed. 2007, Schattauer Verlag: Stuttgart, New York. S. 22-34.
57. Seidl, C., M. Essler, Radioimmunotherapy for peritoneal cancers. *Immunotherapy*, 2013. **5**(6):395-405.
58. Seidl c., M. Port, K. P. Gilbertz, A. Morgenstern, F. Bruchertseifer, M. Schwaiger, B. Roper, R. Senekowitsch-Schmidtke, M. Abend, 213Bi-induced death of HSC45-M2 gastric cancer cells is characterized by G2 arrest and up-regulation of genes known to prevent apoptosis but induce necrosis and mitotic catastrophe. *Mol Cancer Ther*, 2007. **6**(8): 2346-59.
59. Seidl, C., C. Zockler, R. Beck, L. Quintanilla-Martinez, F. Bruchertseifer, R. Senekowitsch-Schmidtke, 177Lu-immunotherapy of experimental peritoneal carcinomatosis shows comparable effectiveness to 213Bi-immunotherapy, bur causes toxicity not observed with 213Bi. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2011. **38**(2): 312-22.
60. Shi, H., Y. Huang, H. Zhou, X. Song, S. Yuan, Y. Fu, Y. Luo, Nucleolin is a receptor that mediates antiangiogenic and antitumor activity of endostatin. *Blood*, 2007. **110**(8): p. 2899-906.
61. Song, E. Y., C. F. Qu, S. M. Rizvi, C. Raja, J. Beretov, A. Morgenstern, C. Apostolidis, F. Bruchertseifer, A. Perkins, B. J. Allen, Bismuth-213 radioimmunotherapy with C595 anti-MUC1 monoclonal antibody in an ovarian cancer ascites model. *Cancer Biol Ther* 2008. **7**(1): 76-80.
62. Song, H., K. Shaverdi, D. L. Huso, C. Esaias, J. Fox, A. Liedy, Z. Zhang, R. T. Reilly, C. Apostolidis, A. Morgenstern, G. Sgouros, 213Bi (alpha-emitter)-antibody targeting of breast cancer metastases in the neu-N transgenic mouse model. *Cancer Res*, 2008. **68**(10):3873-80.
63. Srivastava, M. and H.B. Pollard, Molecular dissection of nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights. *Faseb J*, 1999. **13**(14): p. 1911-22.
64. StuartLab. <http://www.bio.com/protocolstools/protocol.jhtml?id=p1123>. Soft Agar Assay for Colony Formation. (Stand 02.04.2007).
65. Tavassoli, F.A. and P. Devilee, Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. WHO Classification of tumours. 2003, London: IARC Press. p. 119-120.
66. Turck, N., O. Lefebvre, I. Gross, P. Gendry, M. Kedinger, P. Simon-Assmann, J. F. Launay, Effect of laminin-1 on intestinal cell differentiation involves inhibition of nuclear nucleolin. *J Cell Physiol*, 2006. **206**(2): p. 545-55.

67. TVT, A.f.T.i.d.G.-S.u.A.i.d. www.tierschutz-tvt.de/merkblatt73.pdf. Kriterien zur vorzeitigen Tötung von tumortragenden Mäusen und Ratten. (Stand 15.09.2008).
68. Ueda, T., Y.V. Postnikov, and M. Bustin, Distinct domains in high mobility group N variants modulate specific chromatin modifications. *J Biol Chem*, 2006. **281**(15): p. 10182-7.
69. Vallon, M., C. Seidl, B. Blechert, Z. Li, K. P. Gilbertz, A. Baumgart, M. Aichler, A. Feuchtinger, F. C. Gaertner, F. Bruchertseifer, A. Morgenstern, A. K. Walch, R. Senekowitsch-Schmidtke, M. Essler, Enhanced efficacy of combined ²¹³Bi-DTPA-F3 and paclitaxel therapy of peritoneal carcinomatosis is mediated by enhanced induction of apoptosis and G2/M phase arrest. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2012. **39**(12): 1886-97.
70. van Essen, M., E. P. Krenning, B. L. Kam, M. de Jong, R. Valkema, D. J. Kwekkeboom, Peptide-receptor radionuclide therapy for endocrine tumors. *Nat Rev Endocrinol*, 2009. **5**(7): p. 382-93.

8. Danksagung

Viele Personen haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Markus Essler bedanken. Zunächst einmal für das Vertrauen, das er mir entgegenbrachte, in dem er mir einen Themenkomplex zur Bearbeitung zuwies, der interessant und fordernd war und an dessen Entwicklung und Ausgestaltung ich Anteil nehmen konnte.

Zu schätzen wusste ich auch seine mitreißende Begeisterung für sein Forschungsgebiet, die Entwicklungsmöglichkeiten eines Projektes oder auch neue Ideen zu konkreten Versuchsreihen. Stets konnte man sich seiner Unterstützung durch Rat und Tat sicher sein.

Die allwöchentlichen Labortreffen waren problemorientiert und sehr informativ und ein darüber hinaus notwendiger Dialog wurde immer freundlich und hilfsbereit gewährt.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. H. Höfler, der sich in der allerletzten Phase meiner langgezogenen Doktorarbeit helfend einbrachte.

Daneben bin ich besonders unserer Medizinisch-technischen Assistentin Birgit Blechert dankbar, die im Labor der „gute Geist“ war und ein Kontinuum gewährleistete. Ihre wohlwollende, interessierte, hilfsbereite und zupackende Art sorgte dafür, dass die praktische Arbeit gut von der Hand ging. Man konnte sich auf ihre Hilfe zur Not auch am Wochenende verlassen. Und sie war immer bereit und interessiert auch ihr unbekannte Versuchsprotokolle mit aus zu probieren und zu ergänzen.

Unsere Biologen waren mir ebenfalls eine große Hilfe. Hier allen voran Mario Vallon, der mir durch seine ruhige, überlegte und stetige Arbeitsweise ein großes Vorbild war. Oft wusste er Rat, wenn sich in der Durchführung der Versuche Probleme ergaben.

Jan Mueller zeichnete sich durch seine große Hilfsbereitschaft aus und war immer interessiert. Bei fachlichen und logistischen Problemen war er immer zur Stelle.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei meinem Mitdoktoranden Florian Gärtner, dessen Luciferin-transfizierte Zellen eine wesentliche Voraussetzung für meine Arbeit waren, und bei Dr. Thorsten Poetko aus der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Senekowitsch-Schmidtke, der für mich die Markierung mit ^{68}Ga durchgeführt hat. Bei Fragen zur Markierung und der zytotoxischen Wirkung von unterschiedlichen Radionukliden durfte ich außerdem von dem Wissen von Dr. Christoph Seidl profitieren. Er hat mich nicht nur in die Markierung mit ^{213}Bi eingewiesen, sondern auch zu mehreren Gelegenheiten stets geduldig meine Fragen

beantwortet, mich auf Problemfelder hingewiesen und mir mehrmals Literatur und Protokolle zur Verfügung gestellt.

Daneben war der private Zuspruch bei der Durchführung und der Fertigstellung meiner Arbeit unverzichtbar. Deshalb möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie, vor allem meinem Mann, meiner Mutter, meiner Schwiegermutter und meiner Tochter, bedanken; zunächst für die vielen Stunden der Unterstützung, und dann die unglaubliche Geduld, die auch sie in diese Arbeit investiert haben.