

**Nuklearmedizinische Klinik und Poliklinik der Technischen
Universität München**

Klinikum rechts der Isar

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. M. Schwaiger)

**In Vitro Zytotoxizität und Biodistribution eines ^{213}Bi
markierten monoklonalen MUC1 Antikörpers
(PankoMab)**

Heinrich Maria Laurentius Mühlhofer

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. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Dr. R. Senekowitsch-Schmidtke
2. Univ.-Prof. Dr. J. Schlegel

Die Dissertation wurde am 09.10.2006 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 21.03.2007
angenommen.

Meinen Eltern
Ursula Mühlhofer und Heinz Mühlhofer sen.
sowie Anna Höing

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Zielsetzung	6
2. Material und Methoden	11
2.1 Chemikalien	11
2.2 Antikörper und Chelat	12
2.2.1 PankoMab	12
2.2.2 Anti-delta 9-E-Cadherin (d9Mak)	12
2.2.3 Cy3 konjugierter Sekundär-Antikörper	13
2.2.4 Chelator SCN-CHX-A“-DTPA	13
2.3 Radionuklide	15
2.3.1 ²¹³ Bi (Wismut-213)	15
2.3.2 ¹¹¹ In (Indium-111)	16
2.4 Der ²²⁵Ac/²¹³Bi-Generator	16
2.5 Zelllinien	17
2.5.1 HSC45-M2	17
2.5.2 OV-MZ-6-WT	17
2.6 Tiere	18
2.6.1 Versuchstiere	18
2.6.2 Tierhaltung	18
2.7 Lösungen	19
2.8 Geräte und sonstige Materialien	20
2.9 Methoden in vitro	21
2.9.1 Zellkultur	21
2.9.1.1 Zelllinien in Kultur	21
2.9.1.2 Verarbeitung und Passagieren der Zellen	21
2.9.1.3 Bestimmung der Zellzahl	21
2.9.1.4 Quantifizierung der Zellproliferation	22
2.9.2 Herstellung der Radioimmunkonjugate	22
2.9.2.1 Markierung der Antikörper mit ²¹³ Bi	22
2.9.2.2 Markierung der Antikörper mit ¹¹¹ In	23

2.9.3 Analyse der Bindung von PankoMab an HSC45-M2 und OV-MZ-6-WT Zellen	23
2.9.3.1 Immunfluoreszenz	23
2.9.3.2 Quantifizierung der Bindung der ²¹³ Bi-Immunkonjugate an die Zellen	24
2.9.3.3 Scatchard Assay	24
2.9.3.4 SDS Page des PankoMab	25
2.9.4 Zytotoxizitätstest	26
2.9.4.1 Ermittlung der optimalen Zellzahl/ Well	26
2.9.4.2 Klonogener Assay	27
2.10 Methoden in vivo	27
2.10.1 Inokulation der Tumorzellen	27
2.10.2 Biodistribution	28
3. Ergebnisse	30
3.1 Proliferationskinetik der HSC45-M2/ OV-MZ-6-WT Zellen	30
3.2 Effizienz der Kopplung der verwendeten Radionuklide an PankoMab	32
3.2.1 Kopplung von ²¹³ Bi	32
3.2.2 Kopplung von ¹¹¹ In	33
3.3 SDS-Page des PankoMab	34
3.4 Nachweis von MUC-1 mittels Immunfluoreszenz	36
3.5 Bindungskinetik des PankoMab	37
3.5.1 Antikörperbindungstest	37
3.5.2 Scatchard Assay zur Ermittlung der Anzahl der Antigenbindungsstellen	38
3.5.2.1 Antigenbindungsstellen auf OV-MZ-6-WT Zellen	38
3.6 Klonogener Assay	42
3.6.1 Klonogener Assay mit OV-MZ-6-WT Zellen	42
3.6.2 Klonogener Assay mit HSC45-M2 Zellen	44
3.7 Studie zur Biodistribution von ¹¹¹In-PankoMab und ²¹³Bi-PankoMab	46
3.7.1 Biodistribution von ¹¹¹ In-PankoMab 24 h nach Inokulation von OV-MZ-6-WT Zellen	47
3.7.1.1 Biodistribution des ¹¹¹ In-PankoMab 1 h nach i.p. Injektion	47
3.7.1.2 Biodistribution des ¹¹¹ In-PankoMab 3 h nach i.p. Injektion	48
3.7.2 Biodistribution von ¹¹¹ In-PankoMab 24 h nach Inokulation von HSC45-M2 Zellen	49
3.7.2.1 Biodistribution des ¹¹¹ In-PankoMab 1 h nach i.p. Injektion	49
3.7.2.2 Biodistribution des ¹¹¹ In-PankoMab 3 h nach i.p. Injektion	50

3.7.3	Biodistribution von ^{111}In -PankoMab 3 Wochen nach Inokulation von OV-MZ-6-WT Zellen	51
3.7.3.1	Biodistribution des ^{111}In -PankoMab 1 h nach i.p. Injektion	51
3.7.3.2	Biodistribution des ^{111}In -PankoMab 3 h nach i.p. Injektion	52
3.7.4	Biodistribution von ^{111}In -PankoMab 6 Wochen nach Inokulation von OV-MZ-6-WT Zellen	53
3.7.4.1	Biodistribution des ^{111}In -PankoMab 1 h nach i.p. Injektion	54
3.7.4.2	Biodistribution des ^{111}In -PankoMab 3 h nach i.p. Injektion	55
3.7.5	Biodistribution von ^{213}Bi -BSA 3 Wochen nach Inokulation von HSC45-M2 Zellen	56
3.7.5.1	Biodistribution des ^{213}Bi -BSA 1 h nach i.p. Injektion	56
3.7.5.2	Biodistribution des ^{213}Bi -BSA 3 h nach i.p. Injektion	57
4.	Diskussion	58
5.	Zusammenfassung	72
6.	Literaturverzeichnis	74
7.	Danksagung	82

Verwendete Abkürzungen

- ^{111}In Indium-111
- ^{131}I Jod-131
- ^{209}Bi Wismut-209
- ^{209}Pb Blei-209
- ^{209}Tl Thallium-209
- ^{213}Bi Wismut-213
- ^{213}Po Polonium-213
- ^{217}At Asat-217
- ^{221}Fr Francium-221
- ^{225}Ac Actinium-225
- ^{226}Ra Radium-226
- ^{229}Th Thorium-229
- ^{233}U Uran-233
- 6H8 Anti-delta 9-E-Cadherin monoklonaler Antikörper IgG2a
- A76-A/C7 PankoMab
- Aqua bidest. Entionisiertes Wasser
- BSA Rinderalbumin
- CD Cluster of differentiation
- Cpm Counts per minute
- d9MAK Anti-delta 9-E-Cadherin monoklonaler Antikörper IgG2a
- DOTA 1,4,7,10-tetra-azazyklododecane-N,N',N'',N'''-tetra-acetic-acid
- EDTA Ethylendiamintetraessigsäure
- FKS Fetales Kälberserum
- GBq Gigabecquerel
- HCL Salzsäure
- HWZ Halbwertszeit
- i.p. intraperitoneal

- kBq Kilobecquerel
- kD Kilodalton
- keV Kiloelektronenvolt
- M Molar
- MAK Monoklonaler Antikörper
- MBq Megabecquerel
- MeV Megaelektronenvolt
- min Minute
- MUC Mucin
- NaJ Natriumjodid
- NHL Non Hodgkin Lymphom
- PBS Phosphatpuffer
- RKI Robert-Koch-Institut
- TUM Technische Universität München
- U/min Umdrehungen pro Minute
- Vit. C Ascorbinsäure

1. Einleitung

„Nicht sesshaft, asozial und unsterblich“, so beschreibt Ursus-Nikolaus Riede maligne Tumoren (1998). Dieses Zitat beschreibt die Hauptprobleme, die die moderne Medizin mit malignen Tumorerkrankungen bis zum heutigen Tag hat und die „Krebs“ auf Platz zwei der Todesursachen in der westlichen Welt, nach Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems, rangieren lassen. Laut dem Robert-Koch-Institut erkranken jährlich in Deutschland 218.250 Männer und 206.000 Frauen an Krebs (2006). Neben Lungenkrebs und Brustkrebs, die die Statistik der Krebssterbefälle bei Männern bzw. Frauen anführen, gehören Magenkarzinom und Ovarialkarzinom zu den malignen Tumoren mit hohen Sterberaten. Das Magenkarzinom besetzt bei Männern in Deutschland Platz 4 der Krebssterbefälle, bei Frauen Platz 6, das Ovarialkarzinom Platz 5.

Die Anzahl der Neuerkrankungen von Magenkarzinomen lag bei 19.400 im Jahr 2002 in Deutschland. Obwohl sich die Inzidenz seit den 70er Jahren in Deutschland wie auch in anderen Industrienationen halbiert hat, steigt die Mortalität an (RKI 2006), weltweit sterben am Magenkarzinom ca. 700.000 Personen, das sind ca. 10,5% aller Krebstoten pro Jahr.

Die Anzahl der Neuerkrankungen beim Ovarialkarzinom lag im Jahr 2002 in Deutschland bei 9.950. Das entspricht 4,8% aller malignen Neuerkrankungen bei der Frau. Auffällig ist dabei ein Nord-Süd Gefälle in Europa. Hohe Inzidenzraten findet man u.a. in Litauen, Tschechien, Estland, Dänemark. Die niedrigsten Inzidenzraten findet man in Südeuropa (Italien, Portugal, Griechenland). Die Inzidenzen sind in den letzten 20 Jahren nahezu konstant, die Mortalität nimmt seit den 80er Jahren konstant ab, was auf die weite Verbreitung von oraler Kontrazeption zurückzuführen ist (International Agency for Research on Cancer, 1999).

Weltweit erkranken pro Jahr (2002) 204.500 Frauen, wobei 61% der Erkrankten am Ovarialkarzinom versterben. Die Prognose für Ovarialkarzinome ist daher im Vergleich zu anderen Tumoren der weiblichen Geschlechtsorgane mit einer Fünf-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 41% eher schlecht. Im Vergleich hierzu beträgt die Fünf-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit des Mammakarzinoms über alle Stadien betrachtet 79%, die des Korpus Uteri 77%.

Für den Erfolg einer Therapie mit kurativer Zielsetzung bei malignen Erkrankungen ist von entscheidender Bedeutung, dass der Tumor früh erkannt wird. Bei Fernmetastasierung bzw. bei weit vorgeschrittenen lokalen Tumoren mit Infiltration von benachbarten Geweben ist der therapeutische Erfolg von Operationen mit kurativem Ansatz gering. Ursachen hierfür sind auch Lokalrezidive, die selbst nach R₀ Resektion das Langzeitüberleben des Patienten drastisch reduzieren können. Heute wird bei Magenkarzinom durch Stadien angepasste Therapiekonzepte wie z.B. neoadjuvante Chemotherapie oder postoperative Radiochemotherapie das Lokalrezidivrisiko erfolgreich reduziert, (McDonald et al. 2001; Lordick und Siewert, 2005). Nach Bennet et al. (2005) beträgt das Rezidivrisiko nach einer Stadien angepassten R₀ Resektion 48%, laut D'Angelica et al. (2004) zeigen 29% der entsprechend behandelten Patienten eine Peritonealkarzinose. Siewert et al. (2006) ermittelten nach R₀ Resektion und neoadjuvanter Chemotherapie bei 34% der Patienten ein Rezidiv mit Peritonealkarzinose.

Auch die Therapie des Ovarialkarzinoms wird heute angepasst an das jeweilige Tumorstadium durchgeführt. 75% der Ovarialkarzinome werden aber erst in einem fortgeschrittenen Stadium FIGO II-IV diagnostiziert. Obwohl in den letzten Jahren Fortschritte in der Therapie gemacht wurden, vor allem durch verbesserte Operationstechniken, die immer öfter eine R₀ bzw. R₁ Resektion zulassen und durch die Verwendung von platin- und in jüngster Zeit taxanhaltiger First Line Chemotherapien, konnte die Prognose aber nicht entscheidend verbessert werden (Koudsi et al. 2003).

Nach Wu et al. (2005) findet sich bei 41,8% der Patienten im Stadium III des Ovarialkarzinoms auch eine Peritonealkarzinose.

Bei manifester Peritonealkarzinose sinkt die Überlebenswahrscheinlichkeit eines Patienten erheblich: Sadeghi et al. (2000) ermittelte eine mediane Überlebenswahrscheinlichkeit von 3-6 Monaten bei Patienten mit Magenkarzinom bedingter Peritonealkarzinose.

Die therapeutischen Optionen bei fortgeschrittenen Stadien von Magen- bzw. Ovarialkarzinom sind eingeschränkt. Neben Tumordebulking und Chemotherapie erlangt dabei die Immuntherapie einen immer größeren Stellenwert. Nach Rosenberg et al. (2006) verschlechtert sich die Prognose bei Nachweis von Tumorzellen in der peritonealen Lavage dramatisch. Der Abtötung von Tumorzellen im Frühstadium der

Peritonealenmetastasierung kommt daher eine wichtige Bedeutung im Hinblick auf die Verlängerung der Überlebenswahrscheinlichkeit des Patienten zu.

In neuesten Studien konnte Heiss et al. (2005) nachweisen, dass Patienten mit Peritonealkarzinose und / oder malignem Aszites von einer Immuntherapie mit trifunktionalen Antikörpern (trAb) profitieren. Die therapeutische Effizienz der Immuntherapie kann durch Kopplung von Radionukliden an MAK noch erhöht werden (Couturier et al. 2005).

Im Moment kommen im klinischen Alltag vor allem β -Emitter zum Einsatz. Am häufigsten ist in diesem Zusammenhang die Radiojodtherapie der Schilddrüse mit ^{131}I zu nennen. Besonders hervorzuheben ist Zevalin, dem ersten in Europa zugelassenen Radioimmuntherapeutikum. Zevalin ist in der EU für die Behandlung erwachsener Patienten mit CD20-positivem follikulärem B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom (NHL), die auf eine Rituximab Behandlung nicht ansprechen oder nach einer solchen Behandlung einen Rückfall erleiden, zugelassen. Bei Zevalin handelt es sich um einen monoklonalen anti-CD20-Antikörper, der gebunden an Yttrium-90 eingesetzt wird (Schering, 2004).

Weitere metallische β -Emitter, die durch ein Chelat an MAK gebunden werden, befinden sich in klinischen Tests zur Radioimmuntherapie (Goldberg et al. 2002).

Viel versprechend für den zukünftigen Einsatz in der Radioimmuntherapie sind auch α -Emitter wie das ^{213}Bi . ^{213}Bi eignet sich wegen seiner geringen Reichweite von bis zu $80\mu\text{m}$ im Gewebe, seiner hohen Energie von 2 MeV und dem daraus resultierenden hohen linearen Energietransfer von $100\text{ keV}/\mu\text{m}$ besonders gut für den Einsatz in der Radioimmuntherapie. Studien von Senekowitsch-Schmidtke et al. (2001), Seidl et al. (2005), Huber (2003), Miederer (2003) und Seidenschwang (2006), die den Einsatz von ^{213}Bi gekoppelten d9MAb, einem gegen das mutierte d9-E-Cadherin gerichteten Antikörper bei Peritonealkarzinose untersuchen, zeigen die Potenz dieses Therapieansatzes. Huber (2003) konnte eine signifikante Überlebensverlängerung bei Versuchstieren mit Peritonealkarzinose gegenüber einer Kontrollgruppe feststellen. Den Versuchstieren wurden nach Inokulation von Magen-CA Zellen (HSC45-M2) ^{213}Bi -d9MAk Radioimmunkonjugate verschiedener Aktivitäten injiziert.

Eine Phase-I-Studie wurde am Memorial Sloan-Kettering Cancer Center in New York mit ^{213}Bi -HuM195 an Leukämiepatienten durchgeführt (Jurcic et al, 2002). In

Heidelberg wurden Patienten mit Non-Hodgkin Lymphomen mit ^{213}Bi -anti-CD-20-MAK therapiert. Es konnte in beiden Studien vor allem eine geringe Toxizität des ^{213}Bi Radioimmunkonjugats nachgewiesen werden. Allen et al. (2002) behandelten Melanome mit ^{213}Bi -MAK, der intraläsional verabreicht wurde. Schon ab einer Aktivität von 4,3 MBq erfolgte die Abtötung fast aller Tumorzellen.

Ein weiterer Antikörper der potentiell zum Einsatz in der Radioimmuntherapie geeignet ist, ist der PankoMab. PankoMab ist ein monoklonaler Anti-MUC1 Antikörper. MUC1 ist ein transmembranöses Molekül, das auf der Oberfläche der meisten glandulären Epithelzellen vorkommt. Falls Zellen, die MUC1 an ihrer Oberfläche tragen, maligne entarten, erhöht sich zum einen die Expression von MUC1 und zum anderen ändert sich die Struktur seiner Glykosilierung (J. Taylor-Papadimitriou et al., 1999). Der extrazelluläre Anteil dieses Glykoproteins setzt sich aus einer variierenden Anzahl von 20-120 Tandemwiederholungen zusammen. Jede Tandemwiederholung besteht aus 20 Aminosäuren mit 5 potentiellen O-Glykosilierungsstellen (Baldus et al. 2004). Monklonalen Antikörpern, die gegen das MUC1 Antigen gerichtet sind, könnten in der Zukunft der Radioimmuntherapie eine wichtige Rolle zukommen.

Zielsetzung:

Ziel der vorliegenden Studie war die Evaluierung des möglichen Einsatzes des PankoMab im Rahmen einer α -Radioimmuntherapie mit ^{213}Bi . Hierzu wurde die Zytotoxizität des ^{213}Bi -PankoMab Konjugats in vitro an HSC45-M2 Magen- und an OV-MZ-6-WT Ovarialkarzinomzellen sowie die Biodistribution in Nacktmäusen mit und ohne intraperitonealem Tumor untersucht.

Die Anzahl der Antigenbindungsstellen auf HSC45-M2 bzw. OV-MZ-6-WT Zellen wurde mittels Scatchard Assays bestimmt. Zur Untersuchung der spezifischen Zytotoxizität des ^{213}Bi -PankoMab wurde das klonogene Überleben von HSC45-M2 bzw. OV-MZ-6-WT Zellen nach Inkubation mit unterschiedlichen Aktivitäten von ^{213}Bi -PankoMab bzw. ^{213}Bi -BSA ermittelt. Zur Analyse der Biodistribution von PankoMab wurde ^{111}In -PankoMab bzw. ^{213}Bi -BSA tumorfreien Swiss nu/nu Mäusen bzw. Mäusen mit Peritonealkarzinose injiziert und die Aktivitätskonzentrationen 1 h bzw. 3 h nach Injektion in verschiedenen Organen bestimmt. In dieser Studie sollte eine Abschätzung eines möglichen klinischen Einsatzes von PankoMab Radioimmunkonjugaten erfolgen.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

HCL Suprapur 30% (Merck)

NaJ (Sigma)

FKS (Fetales Kälberserum, Biochrom)

Ethanol 70% (Apotheke Klinikum Rechts der Isar)

EDTA 1% in PBS (C C Pro GmbH)

Tri-Na-Citrat (Biochrom)

$\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$ 3M (Sigma)

H_2O bidest

L-Ascorbinsäure (Sigma)

BSA Pulver (Sigma)

Fremdgelpuffer

Sammelgelpuffer

Acrylamid 30,8% (Roth)

TEMED (Sigma)

Amoniumpersulfat (Sigma)

CO_2

2.2 Antikörper und Chelat

2.2.1 PankoMab

Der Antikörper PankoMab ist unter der Bezeichnung A76-A/C7 (Nemod) bekannt. Er wurde der Nuklearmedizinischen Klinik der TUM von der Firma Nemod (Berlin) für Forschungszwecke zur Verfügung gestellt.

Bei diesem Antikörper handelt es sich um einen monoklonalen Maus IgG1, κ Antikörper. Die Zielstruktur, die dieser spezifisch erkennt, ist das so genannte MUC1 Antigen. Das MUC-Antigen gehört zur Familie der hoch molekularen glykolysierten Membranproteine, die in glandulären Epithel vorkommen. (Devine und McKenzie 1992; Strous und Dekker 1992; Jass und Robertson 1994; Yi Cao et al. 1997).

Das MUC1 Antigen setzt sich aus einem zytoplasmatischen, einem transmembranösen und aus einem extrazellulären Anteil zusammen. Der extrazelluläre Anteil dieses Glykoproteins setzt sich aus einer variierenden Anzahl von 20-120 Tandemwiederholungen zusammen. Jede Tandemwiederholung besteht aus 20 Aminosäuren mit 5 potentiellen O-Glykosilierungsstellen (Zotter et al. 1988; Girling et al. 1989; Ho et al. 1993; Patton et al. 1995; Yi Cao et al. 1997, Baldus et al. 2004). In den Tandemwiederholungen finden sich vor allem die Aminosäuren Serin und Threonin. Dieser Abschnitt ermöglicht potentielle O-Glykosilierung. Die Anzahl von exprimiertem MUC1 erhöht sich, wenn die Zelle maligne entartet (J. Taylor-Papadimitiou 1999).

2.2.2 Anti-delta 9-E-Cadherin (d9MAK)

Anti-delta 9-E-Cadherin (d9MAK, auch als 6H8 bezeichnet) ist ein monoklonaler IgG2a Antikörper aus der Ratte (K.-F. Becker und E. Kremer, 2002). Der 6h8 wurde vom Institut für Pathologie der GSF entwickelt und der Nuklearmedizinischen Klinik zu Verfügung gestellt.

2.2.3 Cy3 konjugierter Sekundär-Antikörper

Der Cy3 konjugierte Anti-Maus polyklonale IgG (Chemicon International) wurde als Sekundär-AK für Immunfluoreszenz-Untersuchungen eingesetzt. Als optimal für diese Verwendung erwies sich die Verdünnung 1:200.

2.2.4 Chelator SCN-CHX-A“-DTPA

Die Kopplung metallischer Radionuklide an Antikörper erfolgt über geeignete Chelatoren. Neben DOTA ist der bifunktionelle Chelator SCN-CHX-A“-DTPA (2-(4-isothiocyanatobenzyl)-Cyclohexyl-Diethylentriaminpentaessigsäure) zur Komplexierung des ^{213}Bi geeignet (siehe Abb. 1). Zur Chelatierung mit DOTA wäre eine Temperaturerhöhung erforderlich, was die MAK-Antigenbindung negativ beeinflussen könnte.

Folgende Anforderungen werden an einen Chelator für Radioimmunkonjugate mit einer relativ kurzen HWZ von 46 min wie ^{213}Bi gestellt:

Die Pharmakokinetik und die Bindung des Antikörpers soll nicht beeinflusst werden, die Stabilität des Chelat-MAK Konjugats sollte in Vivo die HWZ des verwendeten ^{213}Bi Nuklides um ein Mehrfaches übersteigen und die Reaktionszeit sollte wegen der kurzen HWZ von ^{213}Bi im Bereich von 5-10 min liegen.

CHX-A“-DTPA erfüllt diese Kriterien. Die Stabilität des Chelat-MAK Konjugats wird von anderen Chelatoren wie z.B. DOTA übertroffen, ist aber wegen der kurzen HWZ von ^{213}Bi immer noch absolut ausreichend (Nikula et al. ,1999). Es konnte gezeigt werden, dass durch Chelatierung des Antikörpers (9dMAK) weder die Bindungskinetik noch die Biodistribution des Radioimmunkonjugats negativ beeinflusst wurden (Fischer, 2001; Huneke et al. ,1992).

2. Material und Methoden

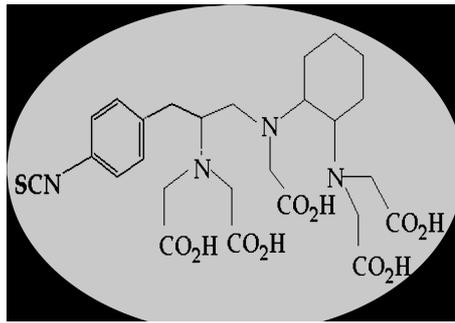


Abb.1:

Chemische Struktur des verwendeten Chelators SCN-CHX-A“-DTPA (2-(4-isothiocyanatobenzyl)-Cyclohexyl-Diethyltriaminopentaessigsäure

2.3 Radionuklide

2.3.1 ^{213}Bi (Wismut-213)

^{213}Bi ist ein Produkt aus dem Zerfall von ^{225}Ac (Abb. 2). Mit einer Halbwertszeit (HWZ) von 45,6 min zerfallen 98% des ^{213}Bi zu ^{213}Po unter der Abgabe von Elektronen (β -Emission). ^{213}Po wird mit einer HWZ von 4,2 μsec in ^{209}Pb umgewandelt, wobei α -Teilchen (doppelt geladene Heliumkerne) emittiert werden. Die Energie beträgt 8,54 MeV.

2% des ^{213}Bi zerfallen erst unter α -Emission zu ^{209}Tl , danach folgt der β - Zerfall zu ^{209}Pb mit einer HWZ von 2,2 min. ^{209}Pb zerfällt mit einer HWZ von 3,25 h zu dem stabilen Element ^{209}Bi .

Die beim ^{213}Bi -Zerfall auftretende γ -Strahlung weist ein Energiemaximum von 440 KeV auf. Diese Energie wird genutzt, um ^{213}Bi im γ -Counter (siehe 2.7 Geräte und sonstige Materialien) zu quantifizieren und im Szintigramm darzustellen.

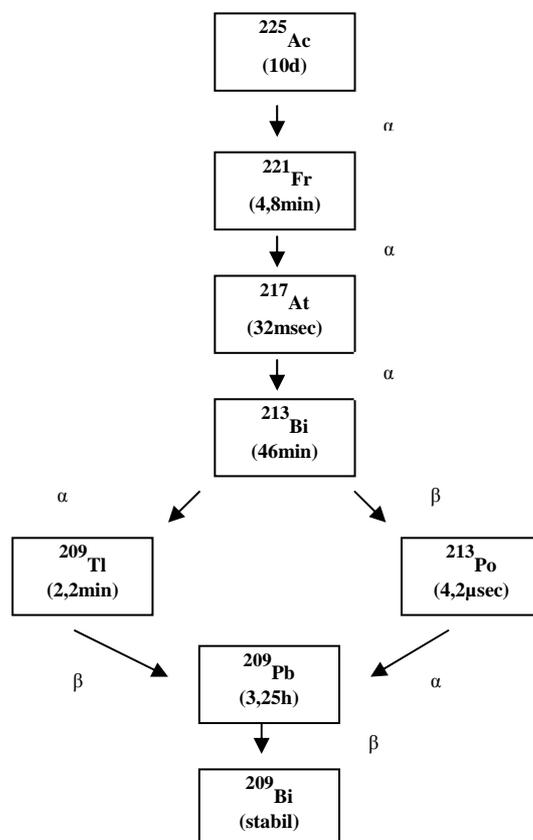


Abb. 2:
Zerfallschema von ^{225}Ac

2.3.2 ^{111}In (Indium-111)

Neben ^{213}Bi wurde ^{111}In ($^{111}\text{InCl}$ Amersham) für Biodistribution und Scatchard-Assays verwendet. ^{111}In zeichnet sich durch die im Vergleich zu ^{213}Bi deutlich längere HWZ (2,8 d) aus.

Aufgrund der Emission von Auger-Elektronen wird ^{111}In auch in der Therapie von neuroendokrinen Tumoren eingesetzt. ^{111}In besitzt eine γ -Komponente bei 172 und 247 keV und kann mit dem γ -Counter gemessen und mit der γ -Kamera dargestellt werden (Kaufmann et al 2001).

2.4 Der $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generator

^{213}Bi wurde aus einem $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generator gewonnen, der vom Institut für Transurane der Europäischen Kommission in Karlsruhe zur Verfügung gestellt wurde.

Das Mutternuklid ^{225}Ac lässt sich mittels unterschiedlicher Methoden gewinnen. Zum einen entsteht ^{225}Ac aus dem natürlichen Zerfall aus ^{233}U (Boll et al., 1997). Eine zweite Methode ist die Protonenbestrahlung von ^{226}Ra , $^{226}\text{Ra}(p,2n)^{225}\text{Ac}$. ^{226}Ra absorbiert ein Proton und gibt zwei Neutronen ab, so entsteht ^{225}Ac (Apostolidis et al., 2001). Daneben kann das Ausgangsnuklid von ^{225}Ac , nämlich ^{229}Th durch Neutronenbestrahlung hergestellt werden. Diese Methode hat sich aber als ineffektiv und aufwändig herausgestellt (van Geel et al. 1994).

Im Institut für Transurane in Karlsruhe wird ^{225}Ac aus einer ^{229}Th Quelle gewonnen. Die ^{229}Th Quelle besteht aus einer Titan-Phosphat-Säule, an die das Mutternuklid ^{229}Th Oxid gebunden ist. Bei jeder Elution können ca. 1,1 GBq ^{225}Ac gewonnen werden. Nach Elution mit 0,5 M HNO_3 müssen die Töchter ^{225}Ra , ^{224}Ra und ^{225}Ac getrennt werden. Dies erfolgt mittels einer Dowex 50 Wx8 Reinigungssäule (McDevitt et al. 1998; Koch 1999; Miederer 2005).

Bei allen Versuchen wurde ^{213}Bi aus dem $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generator gewonnen. Die Nutzung des Generators zur Elution von ^{213}Bi ist alle 2,5 h möglich, da 150 min nach Eluierung 90% des maximal verfügbaren ^{213}Bi vorliegen. Um 100% des potentiell im Generator verfügbaren ^{213}Bi zu erhalten, müssten 5 h abgewartet werden. Die Verwendung des Generators zur Gewinnung von ^{213}Bi ist aufgrund der

HWZ von ^{225}Ac von 10 d mehrere Wochen lang möglich. Der Generator besteht aus einem Fluoropolymer-Schlauch (55 mm x 6,4), in dem 185 bis 740 MBq ^{225}Ac an ein AGMP50 Harz adsorbiert sind. Bei der Eluation wurden 300 μl NaI und 300 μl HCl 0,1 M verwendet (McDevitt et al. 1998).

2.5 Zelllinien

2.5.1 HSC45-M2

HSC45-M2 Zellen sind Magenkarzinomzellen vom Siegelringtyp. Diffuse Karzinome dieses Typs zeigen oft eine intrazelluläre Ansammlung von Muzintröpfchen, durch die der Zellkern wie bei einem Siegelring an den Rand gedrängt wird (Böcker et al., 2001). Erstmals isoliert und in Kultur gebracht wurde dieser Zelltyp in Japan von einer 28jährigen weiblichen Patientin (Yanagihara et al., 1993).

Diese Zelllinie wurde vom Institut für Pathologie des Klinikums Rechts der Isar zur Verfügung gestellt.

2.5.2 OV-MZ-6-WT

OV-MZ-6-WT Zellen sind Ovarialkarzinomzellen eines serös-papillärem Zystadenokarzinoms. Diese Zelllinie wurde aus dem Aszites einer 70jährigen Patientin mit seröspapillärem Zystadenokarzinom im Figo Stadium IV an der Universitätsklinik in Mainz gewonnen und in Kultur gebracht (Möbus et al., 1991, 1993).

Die Zelllinie wurde von PD Dr. V. Magdolen von der klinischen Forschungsgruppe der Frauenklinik und Poliklinik des Klinikums Rechts der Isar der TUM zur Verfügung gestellt.

2.6 Tiere

2.6.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden Swiss Nu/Nu Mäuse im Alter zwischen 3-7 Wochen verwendet. Sie wurden aus einer pathogenfreien Zucht (Charles River, Frankreich) bezogen. Mäuse vom Typ Swiss nude eignen sich für die Xenotransplantation von humanen Tumoren. Auf Grund einer Thymushypoplasie fehlt ihnen das zelluläre Immunsystem völlig, das humorale ist stark supprimiert. Bedingt durch das Fehlen des zellulären Immunsystems kommt es nach Xenotransplantation von humanen Tumoren nicht zu einer Abstoßungsreaktion.

2.6.2 Tierhaltung

Die Mäuse wurden in Käfigen von 3-6 Tieren in einem Tierstall mit speziellem Lichtprogramm bei 26 °C und 50-60 % Luftfeuchtigkeit gehalten. Gefüttert wurden die Tiere mit dem Mäusestandardfutter Altromin 1314 und Leitungswasser ad libidum.

Zur Vermeidung einer Infektion der Tiere mit mäusepathogenen Keimen wurden folgende Hygienemaßnahmen unternommen:

Der Mäusestall wurde mit Kittel, Haarnetz, Mundschutz, Handschuhen und Füßlingen betreten. Die Hände wurden nach jedem potentiell kontaminierenden Kontakt mit 70 %igem Alkohol desinfiziert. Die Haltung der Tiere erfolgte nach den Richtlinien des Tierschutzgesetzes, genehmigt durch die Regierung von Oberbayern.

2.7 Lösungen

Dulbecco's MEM (Biochrom, Berlin)

NaHCO₃ (3,7g/l); D-Glucose (4,5g/l); N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamin(1,028 g/l); Na-Pyruvat

Phosphatpuffer (PBS) (Biochrom)

NaCl (8g/l); KCL (0,2g/l); KH₂PO₄ (0,2 g/l); Na₂HPO x 12 H₂O(2,85 g/l) pH 7,2

1% BSA/PBS (BSA Pulver Sigma)

PBS/EDTA (1% in PBS (CC Pro) 5ml in 500ml PBS)

Trypsin (0,05%)/ EDTA (0,02%) Solution (Biochrom)

Penicillin 10000 U/ Streptomycin10000 µg/ml Lösung (Biochrom)

SDS Probenpuffer reduzierend (SDS; Tris pH 6,8; Bromphenol Blau; DTT)

SDS Probenpuffer nicht reduzierend (SDS; Tris pH 6,8; Bromphenol Blau)

DMSO Freeze Medium (Bio Veris Cooperation)

2.8 Geräte und sonstige Materialien

Analysenwaage Sartorius, Typ LA 230S-OCE (Sartorius, Göttingen)

Biofuge 13(Heraeus Sepatech)

Cell Counter, Casy (Schärfe Systems)

Gamma Counter Typ 1480 Wizard TM 3(Wallacm, Finnland)

Laminair-Flow-Arbeitsbank (Heraeus-Instrumente)

Standardwaage Laboratory LC 1200S (Sartorius, Göttingen)

pH Stäbchenschnelltest, Merck

Haeraeus Brutschrank 6000 (Hanau, Deutschland)

6-,24-,96- Gewebekulturplatten mit Abdeckplatte (Greiner bio one)

Fluoreszenzmikroskop (Axiovert, Zeiss)

pH-Meter (WTW)

Power Supply Protean Ixi Cell (Bio-Rad)

SDS Elektrophorese System (Hoefler)

Zellkulturflaschen Cellstar 250ml, 75cm² mit Filter (Greiner bio one)

Zellkulturflaschen Cellstar 550ml, 175cm² mit Filter (Greiner bio one)

PD-10 Columns Sephadex contains 0,15% Kathon (Amerdhan)

Chromatographiepapier ITLC SG (Pall cooperation)

Wasserbad (GFL 1083)

Eppendorfgefäße 2ml (Eppendorf)

Zentrifugenröhrchen 50ml (corningstar)

PP-Testtubes 15ml (Cellstar)

PS Röhrchen 4,5ml (Greiner bio one)

Insulinspritzen (BD Microfine)

Pipetus classic (Hirschmann)

Multipipetten Aufsätze 5, 10,20,50ml (Costar)

Absauggerät Ecom-P4153 (Eppendorf)

2.9 Methoden in vitro

2.9.1 Zellkultur

2.9.1.1 Zelllinien in Kultur

Alle Arbeiten mit den Zellen wurden unter einer LaminAir HN 2472 flow bank (Haereus) durchgeführt und alle Gegenstände mit Ethanol desinfiziert. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen verschiedener Größen (175cm², 75cm², Cellstar, Greiner bio-one) vermehrt. Nach Aussaat in Dulbecco's MEM 500ml mit 4,5g/l D-glucose, 3,7g/l NaHCO₃ und stabilem Glutamin (Biochrom) mit Zusatz von 50ml fetalem Kälberserum (FKS), 5 ml 91 I.E. Penicilin und 91 mg/ml Streptomycin erfolgte die Inkubation bei 37° (5%CO₂ Haereus 600) zwischen 2 und 10 Tagen.

Ein Nährmediumwechsel wurde durchgeführt, falls bei HSC45-M2 Zellen ein Farbumschlag von rot nach gelb stattfand bzw. falls das Medium durch abgelöste Zellen getrübt war. Vor dem Wechsel des Nährmediums wurden die Zellen ein bis zweimal mit Phosphatpuffer (PBS) gewaschen, um wachstumsbehindernde Stoffwechselprodukte und abgestorbene Zellen zu entfernen.

2.9.1.2 Verarbeitung und Passagieren der Zellen

Alle Lösungen (PBS, PBS EDTA, Nährmedium) wurden vor Gebrauch auf 37° erwärmt. Das alte Nährmedium wurde abgesaugt und die Zellen mit 5ml PBS gewaschen. Zur Ablösung wurden die Zellen mit PBS-EDTA ca. 10 min bei 37° inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1200 U/min für 3 min zentrifugiert (Megafuge 1.0 Haereus). Nach dem Absaugen von PBS-EDTA wurden die Zellen in Nährmedium resuspendiert.

2.9.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Anzahl der Zellen in Suspension wurde mittels Zellzählgerät (CASY1, Schärfe Systems) bestimmt. Hierzu wurde die Zellsuspension zwischen 1:200 und 1:5000 verdünnt.

2.9.1.4 Quantifizierung der Zellproliferation

Es wurden 1×10^6 und 5×10^5 Zellen pro Zelllinie in Zellkulturflaschen mit einer Bodenfläche von 175 cm^2 ausgesät und bei 37° inkubiert. Nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h und 164 h wurden die Zellen in je einer Flasche abgelöst und im Zellzählgerät quantifiziert.

2.9.2 Herstellung der Radioimmunkonjugate

2.9.2.1 Markierung der Antikörper mit ^{213}Bi

Bei der Markierung der Antikörper mit ^{213}Bi wurde dem Eluat $100 \mu\text{l}$ 3M NH_4 Acetat als Puffersubstanz zugegeben. Der angestrebte pH-Wert betrug 5,5. Anschließend wurden $100 \mu\text{l}$ 4% Vit. C Lösung als Antioxidants zugegeben. Nach Zugaben von $100 \mu\text{g}$ Antikörper bzw. BSA wurde der Ansatz 5-10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Volumen schwankte je nach Konzentrationen des Antikörpers. Dies wurde bei Berechnung der Aktivität berücksichtigt.

Anschließend wurde dem Eluat-Antikörpergemisch PBS zugegeben, um ein Volumen von 2,5 ml zu erreichen, da dieses Volumen dem Volumen der PD 10 Säule entsprach. In der PD 10 Säule erfolgte die Abtrennung des nicht gebundenen ^{213}Bi . Das ^{213}Bi -Radioimmunkonjugat wurde mit 2 ml PBS aus der Säule gelöst.

Um die Aktivität und den Reinheitsgrad des Radioimmunkonjugats zu bestimmen, wurde ITLC SG Chromatographiepapier verwendet. Es wurden vor und nach dem PD 10 Reinigungsschritt $10 \mu\text{l}$ des Radioimmunkonjugats mit $990 \mu\text{l}$ PBS verdünnt, daraus wiederum $2 \mu\text{l}$ mit 500 PBS verdünnt und $2 \mu\text{l}$ auf das Chromatographiepapier übertragen. Das Chromatographiepapier wurde in $100 \mu\text{l}$ Tri-Na^+ -Citrat 1 min inkubiert und halbiert. Anschließend erfolgte die Messung im γ -Counter. Dadurch konnte die Aktivität_{gesamt}, die Aktivität_{frei} und die Aktivität_{gebunden} vor und nach der Reinigung errechnet werden.

2.9.2.2 Markierung der Antikörper mit ¹¹¹In

Zur Markierung der Antikörper mit ¹¹¹In wurden 1-10,8 MBq ¹¹¹InCl (100-1000µl), 100µl 4% Vit. C, 50µl NH₄Acetat und 100µg AK 10 min- 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Qualitätskontrolle erfolgte analog zur ²¹³Bi-Markierung.

2.9.3 Analyse der Bindung von PankoMab an HSC45-M2 und OV-MZ-6-WT Zellen

2.9.3.1 Immunfluoreszenz

Mittels Immunfluoreszenz sollte überprüft werden, ob die verwendeten Zellen das MUC1 Antigen exprimieren. Die mittels Immunfluoreszenz ermittelten Aussagen über die Expression von MUC1 sind nur qualitativ.

Dazu wurden in 6 Well Platten je 5×10^5 Zellen in 2,5ml Nährmedium der beiden Zelllinien (HSC45-M2/OV-MZ-6-WT) ausgesät und 2 Tage im Brutschrank bei 37°C und 5%iger CO₂ Atmosphäre inkubiert. Nach Absaugen und zweimaligem Waschen mit PBS wurde 40µg PankoMab in 1,5ml PBS bzw. nur PBS zugegeben.

Die Platten wurden 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, erneut dreimal mit PBS gewaschen und mit IgG Anti-Maus CY3 beimpft und 1 h im Brutschrank inkubiert (Verdünnung 1:200). Anschließend wurde nicht gebundener Anti-Maus IgG CY3 durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Die Inkubation mit Anti-Maus IgG CY3 erfolgte im Dunklen, um ein Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes zu vermeiden. Die Auswertung erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskop (Axiovert, Zeiss) unter Verwendung eines Filtersatzes, der eine Anregung im Bereich von 550nm ermöglicht.

2.9.3.2 Quantifizierung der Bindung der ²¹³Bi-Immunkonjugate an die Zellen

Das Ziel dieses Tests ist die Bestimmung des prozentualen Anteils gebundenem bzw. freiem ²¹³Bi-Radioimmunkonjugats. Die Qualität von Antigen-Antikörperbindungen unterliegt einer Reihe von Variablen:

Z.B. Art des Antikörpers, Konzentration des MAK, dem pH-Wert in der Suspension, Art der Tumorzelllinie, Art des Antigens (in diesem Fall MUC1), Vitalität der Tumorzellen, Inkubationszeit des Antikörpers mit den Zellen. Bindungstests müssen daher standardisiert durchgeführt werden.

Aus technischen Gründen konnte die bei den Bindungstests eingesetzte MAK-Konzentration nicht konstant gehalten werden, da das bei diesem Versuch verwendete ²¹³Bi aus einem Generator gewonnen wurde, in dem aufgrund des Zerfalls von ²²⁵Ac, mit einer HWZ von 10 d, die Aktivität mit der Zeit geringer wurde. Bei den Bindungstests wurden immer 37kBq verwendet d.h. bei einem Generator mit geringerer ²²⁵Ac Beladung bzw. mit fortgeschrittenem ²²⁵Ac-Zerfall entsprachen 37kBq einer höheren MAK Konzentration.

Pro Ansatz und Zelllinie wurden 3×10^6 Zellen verwendet. Der Test wurde in der Regel mit 3 parallelen Ansätzen durchgeführt.

Die Zellen wurden in konusförmige Röhrchen bei 1200 U/min 3 min lang abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 500µl Medium resuspendiert und mit 37kBq des Radioimmunkonjugats für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit 1ml PBS gewaschen und die Aktivität im Zellpellet bzw. im Überstand mittels γ -Counter gemessen.

2.9.3.3 Scatchard Assay

Im Scatchard Assay wird die Antikörper-Antigen-Bindung bei unterschiedlichen MAK-Konzentrationen untersucht. Dies erlaubt eine Aussage über die Bindungskinetik eines Antikörpers und die maximale Anzahl von Antikörperbindungsstellen auf der Zelloberfläche.

Pro Ansatz wurden 1×10^6 Zellen in konusförmige Röhrchen gegeben. Die Zellen wurden bei 1200U/min 3 min abzentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Zellpellet wurde mit 100µl 1%iger BSA/PBS Lösung (0,5g BSA Pulver auf 50ml

PBS) resuspendiert, um die unspezifische Bindung des MAK an die Zellen zu reduzieren. Die Zellen wurden bis zur Inkubation mit dem markierten MAK für ca. 30 min im Kühlschrank aufbewahrt.

Die Zellen wurden mit 100µl des MAK (2000, 1500, 1000, 800, 600, 200, 100, 50 ngAK/ml) 20 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Es wurden also effektiv 200, 150, 100, 80, 60, 20, 10, 5 ng MAK eingesetzt. Nach 20 min wurden die Ansätze mit 1ml PBS gewaschen, zentrifugiert und der Überstand in ein weiteres Röhrchen dekantiert. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt, die ²¹³Bi Aktivität im γ -Counter bestimmt und graphisch dargestellt. In der Auswertung wurde der Quotient B/F (Bound=Zellen; Free=Überstand) errechnet. Die Bestimmung des gebundenen Anteils des MAK wurde durch Division der Aktivität_{Pellet} (Cpm) durch Aktivität_{gesamt} (Cpm), multipliziert mit der MAK-Konzentration_{effektiv}, erreicht. In der graphischen Darstellung wurde der Quotient B/F gegen den MAK_{gebunden} aufgetragen, eine Trendlinie eingeführt, die Steigung bestimmt und der Schnittpunkt mit der X-Achse berechnet. Der Schnittpunkt entspricht der Anzahl der Antigenbindungsstellen von 1×10^6 Zellen. Der Schnittpunkt der Trendlinie mit der Y-Achse kann auch als B_{max}/K_d ausgedrückt werden. Nach Umformung kann die Dissoziationskonstante K_d berechnet werden. Die Affinitätskonstante K_a ist der Kehrwert von K_d .

2.9.3.4 SDS Page des PankoMab

Die Überprüfung der Reinheit und Unversehrtheit der MAK wurde mittels SDS-Gelelektrophorese durchgeführt.

Die Elektrophorese wurde im diskontinuierlichen System mit Sammel- und Trenngel durchgeführt.

Das Sammel- (4% 0,75mm) und das Trenngel (12,5% 0,75mm) wurden am Tag vor der Gelelektrophorese hergestellt.

Zur Herstellung des Trenngels wurden 4,5 ml 4xTrenngelpuffer, 7,36 ml Acrylamid 30,8%ig, 18 ml Aqua bidest. , 18 µl TEMED und 180 µl Ammoniumpersulfat 10% in den zuvor vorbereiteten Gießstand gegossen. Nach erfolgter Polymerisation wurde Aqua bidest. in den Gießstand gegeben, um einen luftdichten Abschluss und eine glatte Oberfläche zu gewährleisten.

Zur Herstellung des Sammelgels wurden 1,25 ml 4xSammelgelpuffer, 0,65 ml Acrylamid 30,8% und 3,04 ml Aqua bidest. in einem Bluecup-Röhrchen vermischt.

Anschließend wurden 5 µl TEMED und 50 µl Ammoniumsulfat dazu pipettiert und das Sammelgel auf das Trenngel in den Gießstand gegossen, nachdem das Wasser verworfen wurde. Die Kämme wurden unverzüglich eingesetzt.

Die Proteinlösungen wurden 1:2 mit 2xSDS-Probenpuffer verdünnt, auf 95°C erhitzt, wieder auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 9000 U/min zentrifugiert, bevor sie aufgetragen wurden.

Die Gelelektrophorese erfolgte bei einer Stromstärke von 20 mA für ca. 120 min.

Die Proteinlösungen wurden mit reduzierendem und nicht reduzierendem Puffer versetzt und aufgetragen.

2.9.4 Zytotoxizitätstest

Das Ziel der Zytotoxizitätstests ist die Quantifizierung des klonogenen Überlebens nach Einwirkung einer zytotoxischen Substanz im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe.

2.9.4.1 Ermittlung der optimalen Zellzahl/ Well

Bei Aussaat einer bestimmten Anzahl von Zellen stimmt die Anzahl der Zellen nicht mit der Anzahl der sich entwickelnden Klone überein. In Vorversuchen wurden verschiedenen Mengen von Zellen ausgesät, um zu überprüfen, wie viele Klone sich daraus entwickeln würden. Es wurden 50, 100, 200, 400, 600, 800 und 1000 Zellen pro Zelllinie in 24 Well Platten in 1ml Nährmedium ausgesät und 10 Tage im Brutschrank inkubiert. Ideal für die Auswertung waren 50-100 Klone pro Well.

2.9.4.2 Klonogener Assay

Es wurden 100/ 200 HSC45-M2 Zellen bzw. 50/100 OV-MZ-6-WT Zellen in 1ml Nährmedium in 24-Well Platten ausgesät. Nach 24 h Inkubationszeit wurden die Platten mit ^{213}Bi -PankoMab (1850, 740, 370, 185, 37 kBq) beimpft. Die mikroskopische Auszählung der gebildeten Klone erfolgte nach einer 10tägigen Inkubation bei 37° und 5% CO_2 . Als Kontrollgruppe dienten unbehandelte 24-Well Platten.

Bei einer zweiten Versuchsreihe wurden neben ^{213}Bi -PankoMab (740, 278, 148, 74, 18,5 kBq) auch ^{213}Bi -BSA (740, 278, 148, 74, 18,5 kBq) verwendet. Als Kontrolle dienten wieder unbehandelte Platten.

2.10 Methoden in vivo

2.10.1 Inokulation der Tumorzellen

Das Ziel der Xenotransplantation der beiden verwendeten humanen Tumorzelllinien in Swiss nu/nu Mäusen ist die Erzeugung einer Peritonealkarzinose bzw. einer diffusen Verteilung der Tumorzellen im Bauchraum. Dabei sollte das Tumorwachstum möglichst genau dem humanen Krankheitsbild der Peritonealkarzinose entsprechen, entweder dem in der Frühphase, in der sich einzelne Tumorzellen im Aszites befinden (maligner Aszites), oder dem schon manifestierten Vollbild.

Pro Maus wurden 1×10^7 HSC45-M2 Zellen bzw. 5×10^6 , 1×10^7 , $1,5 \times 10^7$ OV-MZ-6-WT Zellen in 500 μl FKS freiem Nährmedium i.p. inokuliert. Nach 3-6 Wochen entwickelte sich bei Inokulation von HSC45-M2 Zellen eine Peritonealkarzinose bzw. ein solider Tumor. Bei Inokulation von 5×10^6 OV-MZ-6-WT Zellen entwickelte sich nicht bei allen Tieren die gewünschte Peritonealkarzinose, bei Inokulation von $1,5 \times 10^7$ Zellen sind Tiere frühzeitig, d.h. nach 10 Tagen verstorben, bei 1×10^7 Zellen waren die Ergebnisse zufrieden stellend. Das Verhalten der HSC45-M2 Zellen verlief analog. Vor der Inokulation wurden die Tumorzellen 4x mit PBS gewaschen, um einer etwaigen allergischen Reaktion der Mäuse auf das FKS und EDTA, das noch in Rückständen in der Suspension vorhanden ist, vorzubeugen.

Die Zellen sollten möglichst gleichmäßig in der Bauchhöhle verteilt sein. Bei der Injektion der Zellen müssen Leber, Milz und Darm unbedingt geschont werden. Die Zellen wurden unterhalb des Nabels auf der Linea Alba in einem Einstichwinkel von 20-30 Grad injiziert.

2.10.2 Biodistribution

Die Biodistribution d.h. die Verteilung von Radioimmunkonjugaten nach i.p. Injektion im Organismus wurde wie folgt untersucht:

Bei den Versuchen wurde ^{111}In (HWZ 2,8d) und ^{213}Bi (HWZ 46min) zur Markierung der MAK verwendet. Die Verteilung wurde nach 1 h und nach 3 h bestimmt.

^{213}Bi wurde in der 1 h Gruppe mit einer Aktivität von 3,7 MBq, in der 3 h Gruppe mit einer Aktivität von 11,1 MBq injiziert, bei Verwendung von ^{111}In wurde beiden Gruppen 740 kBq injiziert. Bei der Biodistribution sollte der Anteil des freien ^{111}In und ^{213}Bi gering sein, um die Ergebnisse nicht zu verfälschen. Aus diesem Grund erfolgte bei jeder Markierung eine Qualitätskontrolle. Man konnte beobachten, dass bei Inkubation von ^{111}In -PankoMab nach 1 h der Anteil des freien ^{111}In geringer war als nach 10-15 min.

Die Tiere wurden 1 h bzw. 3 h nach i.p. Injektion des Radioimmunkonjugats getötet. Die Verteilung von ^{111}In -PankoMab und ^{213}Bi -BSA wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Tumorzellinkulation untersucht (siehe Tabelle 1).

2. Material und Methoden

Anzahl der Tiere (n)	Zeitpunkt nach i.p Injektion	Zelllinie	Zeitraum nach Zellin- okulation	Radionuklid	Antikörper
n=5	1h	Keine		¹¹¹ In	PankoMab
n=5	3h	Keine		¹¹¹ In	PankoMab
n=5	1h	HSC45-M2	24h	¹¹¹ In	PankoMab
n=5	3h	HSC45-M2	24h	¹¹¹ In	PankoMab
n=5	1h	OV-MZ-6-WT	24h	¹¹¹ In	PankoMab
n=5	3h	OV-MZ-6-WT	24h	¹¹¹ In	PankoMab
n=5	1h	OV-MZ-6-WT	2 Wochen	¹¹¹ In	PankoMab
n=5	3h	OV-MZ-6-WT	2 Wochen	¹¹¹ In	PankoMab
n=5	1h	OV-MZ-6-WT	6 Wochen	¹¹¹ In	PankoMab
n=5	3h	OV-MZ-6-WT	6 Wochen	¹¹¹ In	PankoMab
n=5	1h	HSC45-M2	3 Wochen	²¹³ Bi	BSA
n=5	3h	HSC45-M2	3 Wochen	²¹³ Bi	BSA

*Tab. 1:
Einteilung der Gruppen für Biodistributionsversuche*

Die Tötung der Tiere erfolgte durch Durchtrennen der Aorta bei eröffnetem Brustkorb nach CO₂-Narkose.

Folgende Organe wurden entnommen: Blut, Herz, Lunge, Muskel, Pankreas, Peritoneum, Milz, Magen, Darm (Teil des Dick- und des Dünndarms, im Lumen befindlicher Inhalt wurde ausgestrichen) Niere, Leber (Teil), großer Tumor, kleine Tumorknötchen, subkutaner Tumor und Aszites. Aszites wurde nach der Messung bei 200g zentrifugiert, das Zellpellet 3x mit 1 ml PBS gewaschen, Zellpellet und vereinigte Überstände wurden erneut im γ -Counter gemessen.

Die Messung der ¹¹¹In bzw. ²¹³Bi Aktivität erfolgte im γ -Counter, die Ergebnisse (cpm) wurden mit Hilfe des Standards (1% der injizierten Aktivität) in Prozent der injizierten Aktivität pro Gramm Gewebe umgerechnet.

3. Ergebnisse

3.1 Proliferationskinetik der HSC45-M2/OV-MZ-6-WT Zellen

Die Proliferationskinetik liefert Aussagen hinsichtlich folgender Parameter:

Anzahl der pro Experiment auszusäenden Zellen, Notwendigkeit der Passagierung bzw. des Mediumwechsels und der Abschätzung des Zellzyklus zu einem bestimmten Zeitpunkt nach Aussaat.

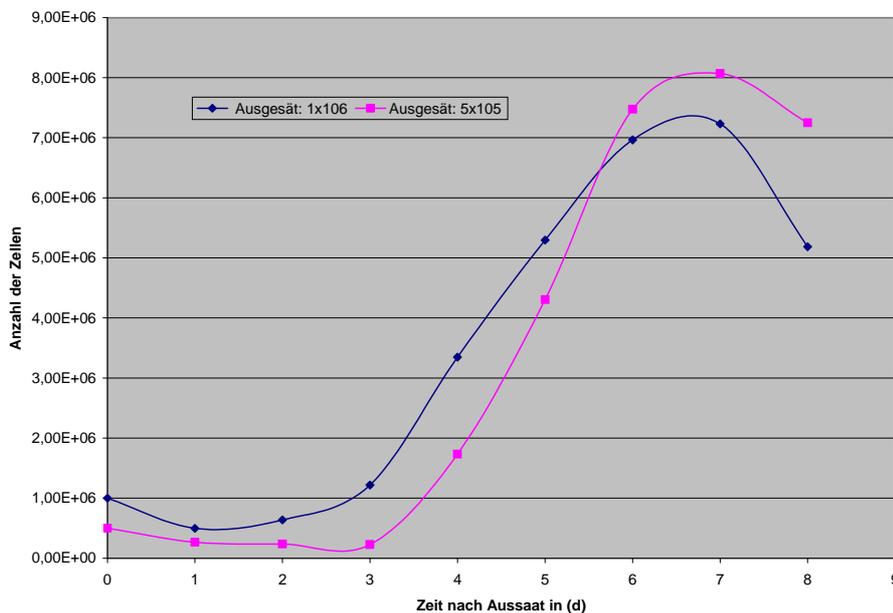


Abb. 3:

Proliferation von HSC45-M2 über einen Zeitraum von 8 Tagen nach Aussaat. Aussaat von 5×10^5 und 1×10^6 Zellen in jeweils 16 Zellkulturflaschen der Größe 250ml, 75cm². Zu jedem Zeitpunkt wurden zwei Zellkulturflaschen pro Zellzahl abgelöst, mit dem Casy 1 Zellzähler gezählt und der Mittelwert gebildet. Zeitpunkt 0 entspricht der Aussaat.

In der Abbildung 3 ist die Proliferationskinetik der HSC45-M2 Zellen dargestellt. 1 Tag nach Aussaat der Zellen wurde jeweils nur noch die Hälfte der ausgesäten Zellen registriert. Bei der Aussaat von 1×10^6 Zellen noch 5×10^5 , bei Aussaat von 5×10^5 noch $2,7 \times 10^5$ Zellen. Grund hierfür könnte sein, dass ein Teil der Zellen nach der Aussaat abstirbt bzw. nicht anwächst oder sich nicht alle Zellen vollständig aus der Zellkulturflasche lösen lassen und somit bei der Zählung nicht erfasst werden. Im Zeitraum vom 0. Tag bis 2,5. Tag nach Aussaat bleibt die Zellzahl relativ konstant. Die exponentielle Wachstumsphase zeigte sich in einem Zeitraum vom 3. bis zum 6.

3. Ergebnisse

Tag. In dieser Phase betrug die Verdopplungszeit 37 h in der 1×10^6 Reihe bzw. 30 h in der 5×10^5 Reihe. Die gemessenen Zellzahlen stiegen bis zum 7. Tag an. Die registrierten Maximalwerte waren $7,2 \times 10^6$ bei 1×10^6 ausgesäten Zellen bzw. $8,1 \times 10^6$ bei 5×10^5 Zellen. Zwischen 7. und 8. Tag wurde eine Abnahme der Zellzahlen auf $5,2 \times 10^6$ bei 1×10^6 ausgesäten Zellen und auf $7,3 \times 10^6$ bei 5×10^5 ausgesäten Zellen beobachtet. Diese Abnahme könnte auf die beschränkte Kapazität der Zellkulturflaschen mit einer Grundfläche von 75 cm^2 , Nahrungskonkurrenz und auf die Sekretion toxischer Stoffwechselprodukte der HSC45-M2 Zellen zurückzuführen sein.

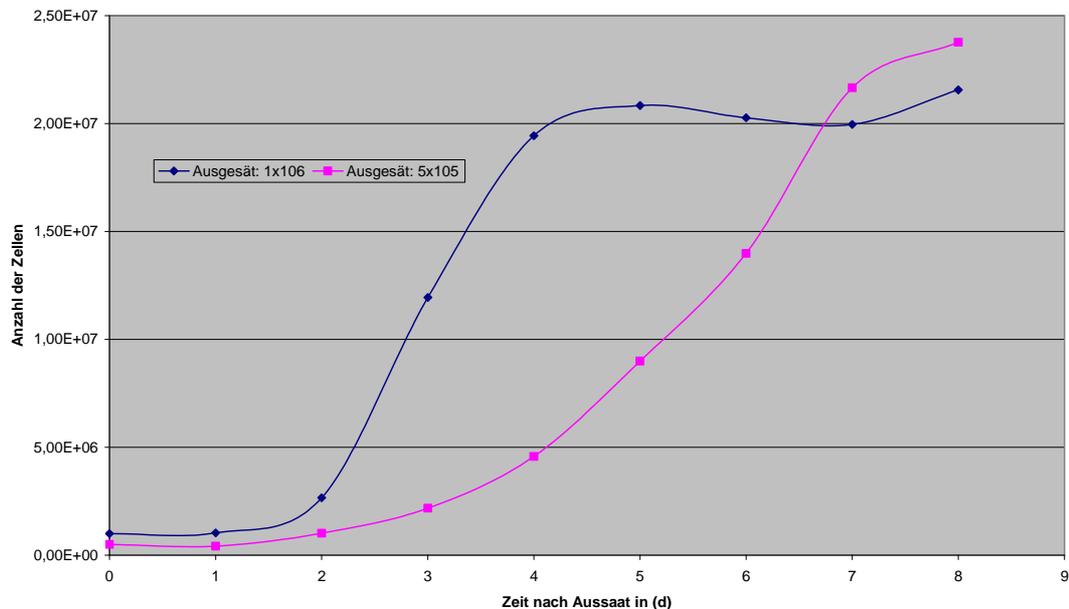


Abb. 4:

Proliferation von OV-MZ-6-WT über einen Zeitraum von 8 Tagen nach Aussaat. Aussaat von 5×10^5 und 1×10^6 Zellen in jeweils 16 Zellkulturflaschen der Größe 250ml, 75 cm^2 . Zu jedem Zeitpunkt wurden zwei Zellkulturflaschen pro Zellzahl abgelöst, mit dem Casy 1 Zellzähler gezählt und der Mittelwert gebildet. Zeitpunkt 0 entspricht der Aussaat.

In der Abbildung 4 ist die Proliferationskinetik der OV-MZ-6-WT Zellen dargestellt. Bei dieser Zelllinie ergab die Zellzählung 24 h nach Aussaat annähernd genauso viele Zellen wie auch ausgesät. Ermittelt wurden 1×10^6 Zellen nach Aussaat von 1×10^6 und $4,2 \times 10^5$ Zellen nach Aussaat von 5×10^5 . Gründe hierfür könnten sein: Schnellere Verdopplungszeit, bessere Ablösung aus den Zellkulturflaschen. Bei

3. Ergebnisse

Aussaat von 1×10^6 Zellen begann die exponentielle Wachstumsphase nach ca. 2 Tagen und endete mit dem 4. Tag. Für diesen Zeitraum ließ sich eine Verdopplungszeit von 20 h berechnen. Die exponentielle Wachstumsphase der 5×10^5 Gruppe begann ca. am 4. Tag nach Aussaat der Zellen und endete am 7. Tag. Die Verdopplungszeit betrug 26 h. Die ermittelten Maximalwerte waren $2,2 \times 10^7$ Zellen in der 1×10^6 Gruppe nach 8 Tagen und $2,4 \times 10^7$ bei Aussaat von 5×10^5 nach 8 Tagen.

Die Versuchsreihe zeigte, dass OV-MZ-6-WT Zellen und HSC45-M2 Zellen unterschiedliche Proliferationskinetiken aufweisen und diese von der Anzahl der pro Flasche ausgesäten Zellen bestimmt werden.

3.2 Effizienz der Kopplung der verwendeten Radionuklide an PankoMab

3.2.1 Kopplung von ^{213}Bi

Die Kopplung von ^{213}Bi an PankoMab erfolgte wie unter 2.8.2.1 beschrieben. Dabei wurden 100 µg Antikörper mit 16,4-248,9 MBq ^{213}Bi inkubiert. Die Ergebnisse sämtlicher Kopplungsversuche sind in Tabelle 2 und 3 zusammengestellt. Die Ausbeute variierte zwischen 20,1% und 99,46%.

Datum	^{213}Bi Aktivität eingesetzt (MBq)	gebunden	frei	gebunden (MBq)	frei (MBq)	Spezifische Aktivität (MBq/mgAK)
03.03.2003	18,9	27%	73%	4,97	13,9	49,7
24.03.2003	16,4	20,1%	79,9%	3,3	13,1	33
07.08.2003	248,9	82,2%	17,8%	201,6	47,3	2010

Tab. 2:

Effizienz der Kopplung von ^{213}Bi an PankoMab. Es erfolgte keine PD 10 Reinigung. Die Werte wurden aus den mit Hilfe des γ -Counters ermittelten Messwerten errechnet.

3. Ergebnisse

Datum	^{213}Bi Aktivität eingesetzt (MBq)	gebunden	frei	gebunden (MBq)	frei (MBq)	Spezifische Aktivität (MBq/mgAK)
20.01.2003	3,3	81,7%	18,3%	2,7	0,6	27
24.02.2003	2,7	71,1%	28,9%	2,6	1	26
27.02.2003	4,8	91,5%	8,5%	4,4	0,4	44
28.07.2003	1,7	93,4%	6,6%	1,6	0,1	16
07.08.2003	138,3	99,5%	0,5%	137,6	0,7	1370

Tab. 3:

Effizienz der Kopplung von ^{213}Bi an PankoMab. Es erfolgte vor der Messung eine PD 10 Reinigung des Radioimmunkonjugats. Die Werte wurden aus den mit Hilfe des γ -Counters ermittelten Messwerten errechnet.

3.2.2 Kopplung von ^{111}In

Die Kopplung erfolgte wie unter 2.9.2.2 beschrieben. Es erfolgte keine Reinigung über PD 10. Die Inkubationszeit variierte zwischen 10 min und 2 h. Die Ausbeute lag zwischen 48,4% und 93,7%.

Datum	^{111}In Aktivität eingesetzt (MBq)	gebunden	frei	gebunden (MBq)	frei (MBq)	Spezifische Aktivität (MBq/mgAK)
14.03.2003	1,4	80,9%	19,1%	1,1	0,3	11
18.11.2003	1,4	84%	16%	1,2	0,2	12
22.12.2003	1,4	84,7%	15,3%	1,2	0,2	12
03.06.2004	1,4	90%	10%	1,3	0,1	13
02.09.2003	3,6	93,7%	6,3%	3,4	0,2	34
04.09.2003	3,6	91,2%	8,8%	3,3	0,3	33
06.09.2003	3,6	90,3%	9,7%	3,3	0,3	33
09.09.2003	3,6	86,3%	13,7%	3,1	0,5	31
29.04.2004	3,6	48,4%	51,6%	1,7	1,9	17
02.05.2004	3,6	71,2%	28,8%	2,6	1,0	26
07.06.2004	3,6	83,5%	17,5%	3,0	0,6	30
08.06.2004	3,6	78,6%	21,4%	2,8	0,8	28

Tab. 4:

Effizienz der Kopplung von ^{111}In an PankoMab ohne PD 10 Reinigung. Messung der Werte mit Hilfe des γ -Counters und Berechnung.

3.3 SDS-Page des PankoMab

Mittels SDS-Page lassen sich Molekulargewicht, Reinheit und Zustand eines Antikörpers bestimmen, denn nach langjähriger nicht steriler Lagerung können MAK aufgrund bakterieller Einwirkungen partiell abgebaut werden.

Aufgetragen wurden BSA, PankoMab sowie Anti-delta9-E-Cadherin (6H8) jeweils in reduzierendem bzw. nicht reduzierendem Puffer. Zur Bestimmung der Molekulargewichte der Antikörperfragmente wurde ein Vergleichs-Molekulargewichtsmarker (Albumin) eingesetzt.

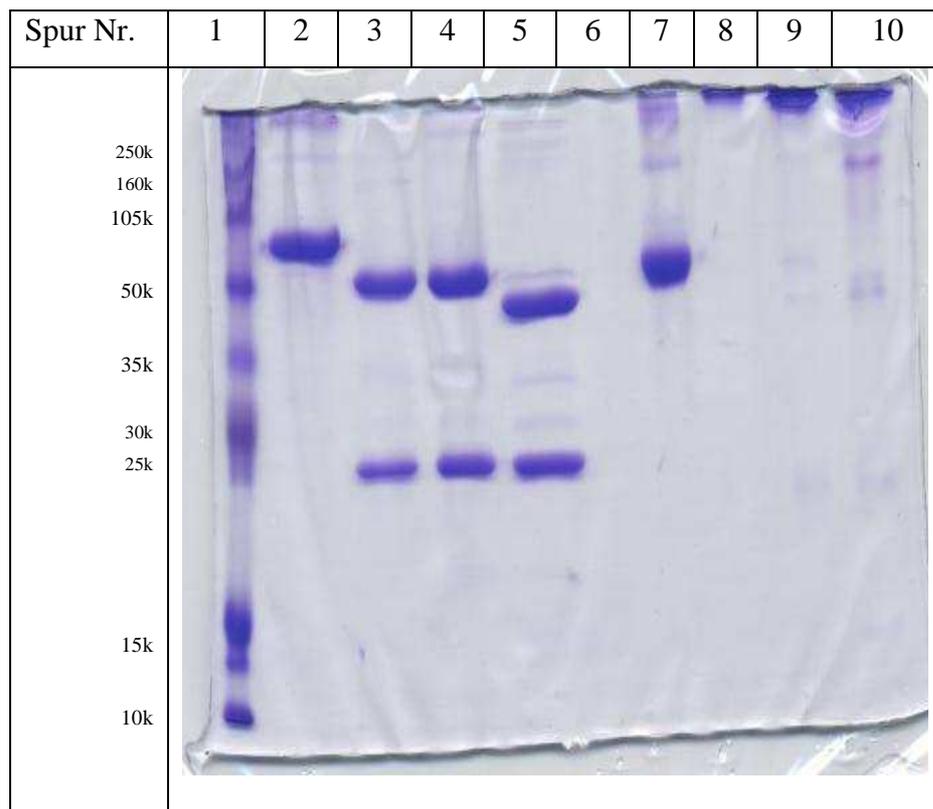


Abb. 5:

SDS-Page von BSA, PankoMab und 6H8. (1) Standard; (2) BSA red.; (3) PankoMab₁ red.; (4) PankoMab₂ red.; (5) 6H8 red.; (6) H₂O; (7) BSA; (8) PankoMab₁; (9) PankoMab₂; (10) 6H8;

3. Ergebnisse

In den Spuren Nr. 3 und Nr. 4, in denen PankoMab in reduzierendem Puffer aufgetragen wurde, ließen sich 2 prominente Banden anfärben. Weitere Banden, die nicht so stark gefärbt sind, lassen sich auf andere Proteine zurückführen. Es lässt sich eine Auftrennung des PankoMab in schwere Ketten (55,5kD) und in leichte Ketten (25kD) erkennen. Es ließen sich keine weiteren prominenten Banden anfärben, die auf eine Verunreinigung hinweisen würden.

In Spur Nr. 8 und 9 ließen sich jeweils nur eine prominente Bande anfärben. Da hier PankoMab in nicht reduzierendem Puffer aufgetragen wurden, konnte gezeigt werden, dass PankoMab als ganzes Molekül vorliegt.

In Spur Nr. 5, in der 6H8 mit reduzierendem Puffer aufgetragen wurden, stellten sich zwei prominente Banden dar; diese entsprechen den leichten Ketten (25kD) und den schweren Ketten (48kD). Es lassen sich weitere, nicht so stark angefärbte Banden bei 50kD, bei 36kD und bei 30kD erkennen, die auf weitere Proteine hinweisen.

In Spur Nr. 10 6H8 stellten sich neben einer stark angefärbten Bande noch drei weitere Banden dar. Diese Banden entsprachen Proteinen mit einem Molekulargewicht von 86kD, 50kD und 20kD. Die Reinheit entspricht in etwa dem PankoMab.

BSA stellt bei 67kD, wie mit Hilfe des Molekulargewichtsstandards bestimmt, eine relativ scharfe Bande dar.

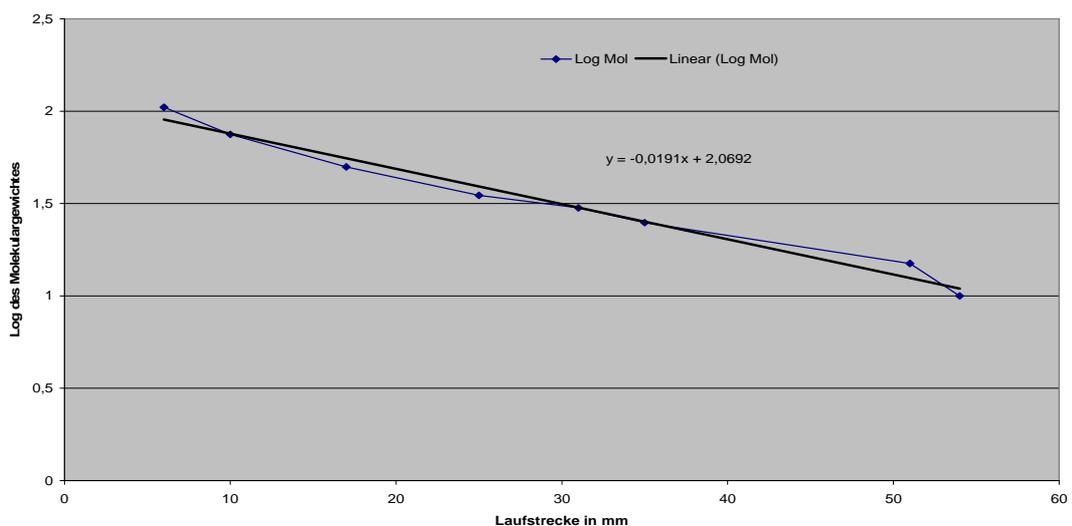


Abb. 6:

Bestimmung der Molekulargewichte der MAK Fragmente mittels Standardprotein

3.4 Nachweis von MUC-1 mittels Immunfluoreszenz

Mittels Immunfluoreszenz sollte nachgewiesen werden, ob das MUC-1 Antigen von OV-MZ-6-WT Zellen bzw. auf HSC45-M2 Zellen exprimiert wird. Dazu wurden die Zellen mit PankoMab und einem cy3 konjugierten Anti-Maus Antikörper inkubiert und dann unter einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet (siehe 2.9.3.1) Beide Zelllinien waren in den Versuchen positiv.

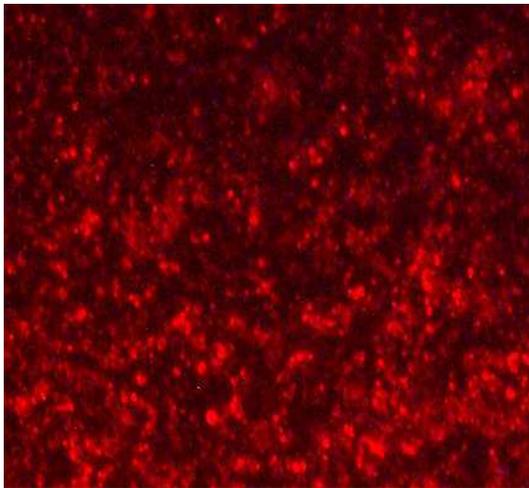


Abb. 7:
HSC45-M2: (5fache Vergrößerung)
indirekter Nachweis des gebundenen
Primärantikörpers PankoMab an HSC45-
M2, mittels cy3 konjugiertem Anti-Maus
AK.

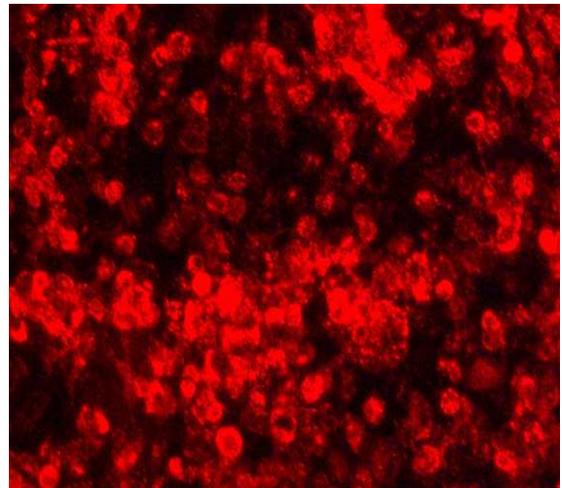


Abb. 8:
OV-MZ-6-WT: (10fache Vergrößerung)
indirekter Nachweis des gebundenen
Primärantikörpers PankoMab an OV-MZ-
6-WT, mittels cy3 konjugiertem Anti-Maus
AK

3.5 Bindungskinetik des PankoMab

3.5.1 Antikörperbindungstest

Ziel der Antikörperbindungstests war die Bestimmung des prozentualen Anteils von an die HSC45-M2 bzw. OV-MZ-6-WT Zellen gebundenem bzw. freiem ^{213}Bi -Radioimmunkonjugat. Pro Ansatz und Zelllinie wurden 3×10^6 Zellen verwendet. Die Zellen wurden 30 min mit 37 kBq ^{213}Bi -PankoMab auf Eis inkubiert, anschließend zweimal mit 1ml PBS gewaschen und die Aktivität im Zellpellet und den vereinigten Überständen gemessen.

	Nr.1	Nr.2	Nr.3	Nr.4	Nr.5	Nr.6	Nr.7	Nr.8	Nr.9	Nr.10	Nr.11	Nr.12
Zelllinie	HSC	OV	OV	OV	HSC	OV	HSC	OV	HSC	HSC	OV	OV
Zellzahl pro Ansatz	3×10^6											
Eingesetzte Aktivität(kBq)	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37
Verwendetes Radionuklid	^{214}Bi	^{213}Bi										
PD-10 column (Ja/ Nein)	Ja	ja	ja	nein	nein	nein	ja	ja	ja	nein	ja	nein
Anteil freies Radionuklid (%)	16	16	8,5	73	80	80	6,6	6,6	0,5	17,8	0,5	17,8
Anteil geb. Radionuklid (%)	84	84	91,5	27	20	20	93,4	93,4	99,5	82,2	99,5	82,2
Effektive Menge an MAK (μg)	0,31	0,31	0,8	0,2	0,23	0,23	1,3	1,3	0,02	--	0,02	--
Anteil geb. (%)	3,8	19,5	4,1	11,2	6,5	17,3	7,6	5,7	2,4	5,2	15,2	36,8
Anteil frei (%)	96,2	80,5	85,9	88,8	93,5	82,7	92,4	94,3	97,6	94,8	84,8	63,2

Tab. 5 :

Durchgeführte Antikörperbindungstests. 3×10^6 Zellen mit 37 kBq ^{213}Bi -PankoMab 30 min auf Eis inkubiert.

3.5.2 Scatchard Assay zur Ermittlung der Anzahl der Antigenbindungsstellen

Mit Hilfe eines Scatchard Assays sollte die Anzahl der Antigenbindungsstellen auf den OV-MZ-6-WT bzw. HSC45-M2 Zellen bestimmt werden. Dazu wurden 1×10^6 Zellen mit unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen inkubiert und die Antigen-Antikörperbindung untersucht (siehe 2.9.3.3)

3.5.2.1 Antigenbindungsstellen auf OV-MZ-6-WT Zellen

Bei den Versuchen mit Ovarialkarzinomzellen wurde PankoMab an ^{111}In gebunden. ^{111}In wurde bei den Scatchard-Assays dem ^{213}Bi vorgezogen, da es im Vergleich zum ^{213}Bi eine deutlich längere HWZ von 2,8 d hat. Die Praxis hat gezeigt, dass bei einem mit ^{213}Bi durchgeführten Scatchard Assay zum Messzeitpunkt der Zerfall des ^{213}Bi so weit fortgeschritten war, dass die Ergebnisse teilweise nicht mehr zu verwenden waren.

In der graphischen Darstellung der Scatchard Assays wurde eine Trendlinie angelegt. Durch Bestimmung der Steigung der Trendlinie lässt sich der Schnittpunkt mit der X-Achse errechnen. Mit Hilfe des Wertes dieses Schnittpunktes kann die Anzahl der Antigenbindungsstellen pro Zelle errechnet werden, die potentiell bei vollständiger Besetzung aller Antigenbindungsstellen pro Zelle gebunden werden können.

Mit den OV-MZ-6-WT Zellen wurden 6 Scatchard Assays durchgeführt, die im Folgenden graphisch dargestellt sind (Abb. 9 bis Abb. 14)

Für die OV-MZ-6-WT Zellen konnte folgende Anzahl von gebundenen PankoMab Molekülen pro Zelle errechnet werden:

Scatchard Assay Nr.1 (Abb. 7): 52800 Moleküle pro Zelle, Nr.2 (Abb. 8): 99200 Moleküle pro Zelle, Nr.3 (Abb.9) und Nr.4(Abb. 10): nicht auswertbar (siehe Diskussion), Nr. 5 (Abb. 11): 72400 Moleküle pro Zelle, Nr. 6 (Abb. 13): 94400 Moleküle pro Zelle.

Des weiteren konnten folgende Affinitätskonstanten K_a errechnet werden: Scatchard Assay Nr.1 (Abb. 7): 8×10^6 , Scatchard Assay Nr. 2 (Abb. 8): 3×10^6 , Scatchard Assay Nr. 5 (Abb. 11): 3×10^6 , Scatchard Assay Nr. 6 (Abb. 12): 1×10^6

3. Ergebnisse

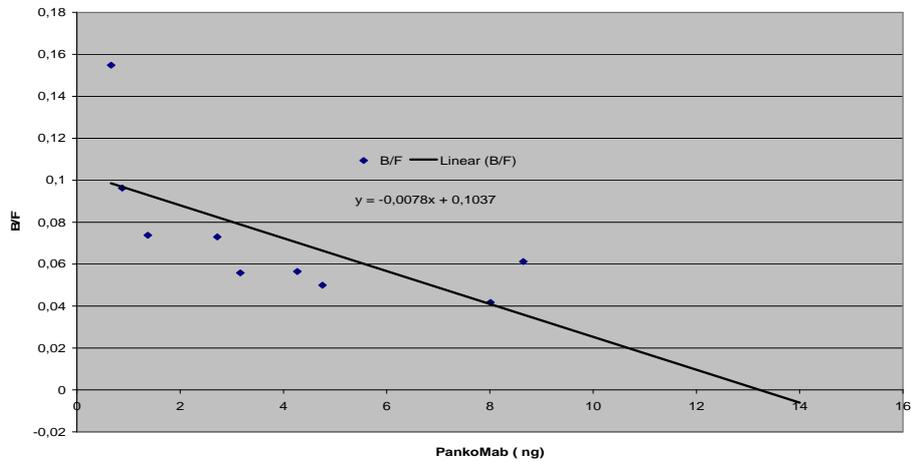


Abb. 9:

Graphische Darstellung des Scatchard Assays Nr.1. Es wurden OV-MZ-6-WT Zellen mit 9 verschiedenen Antikörperkonzentrationen (1000ng/ml, 750ng/ml, 500ng/ml, 400ng/ml, 300ng/ml, 200ng/ml, 100ng/ml, 50ng/ml) für 20 min inkubiert. Auf der X-Achse sind die gebundenen Mengen PankoMab (ng) aufgetragen. Auf der Y-Achse ist der Quotient aus Zellpellet und Überstand aufgetragen.

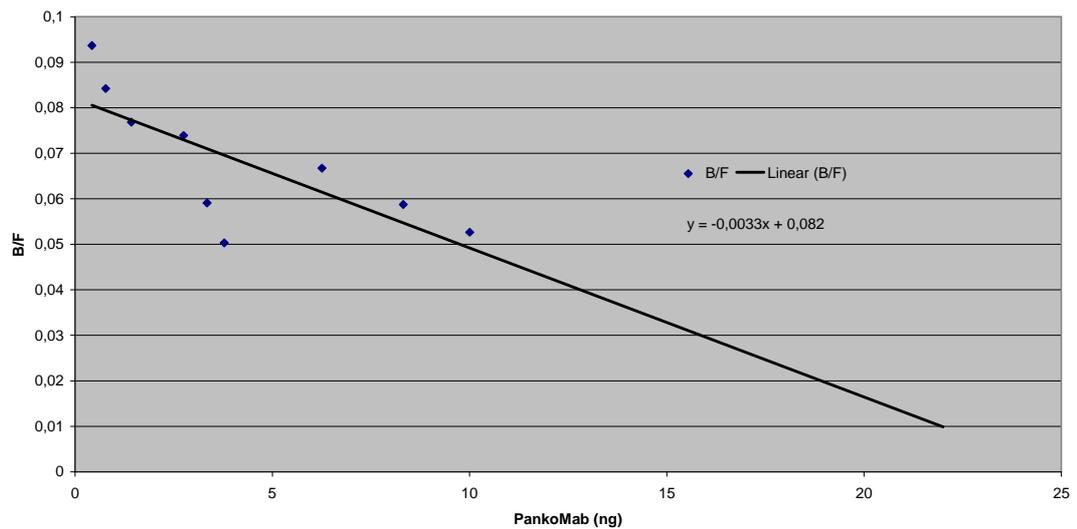


Abb. 10:

Graphische Darstellung des Scatchard Assays Nr.2-Legende vgl. Abb. 9

3. Ergebnisse

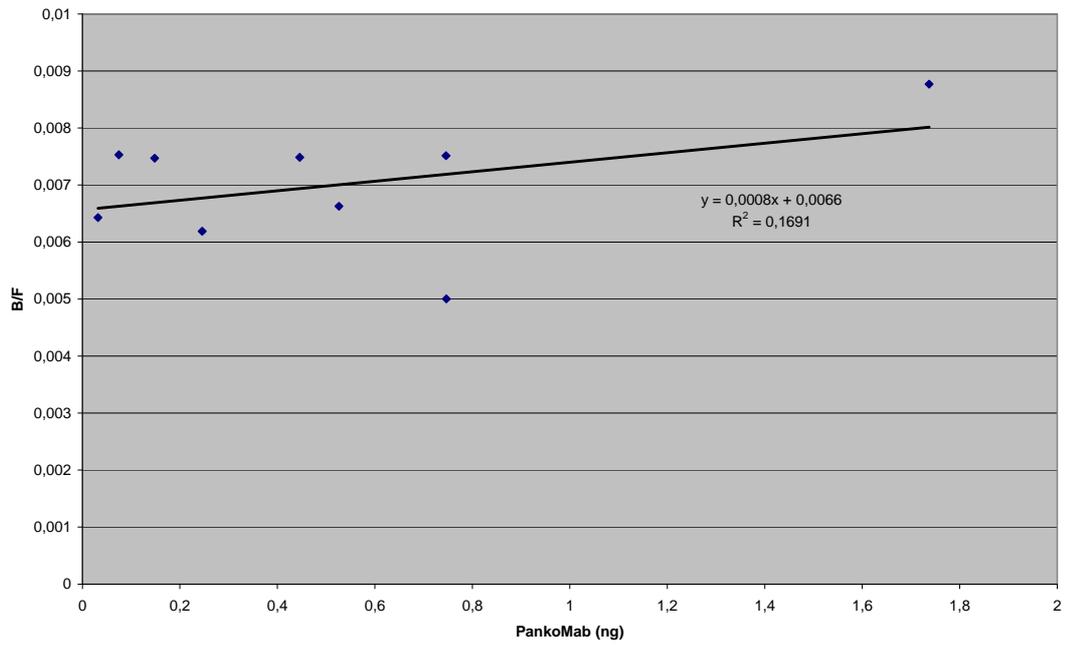


Abb.11:

Graphische Darstellung des Scatchard Assays Nr. 3 – Legende vgl. Abb.9

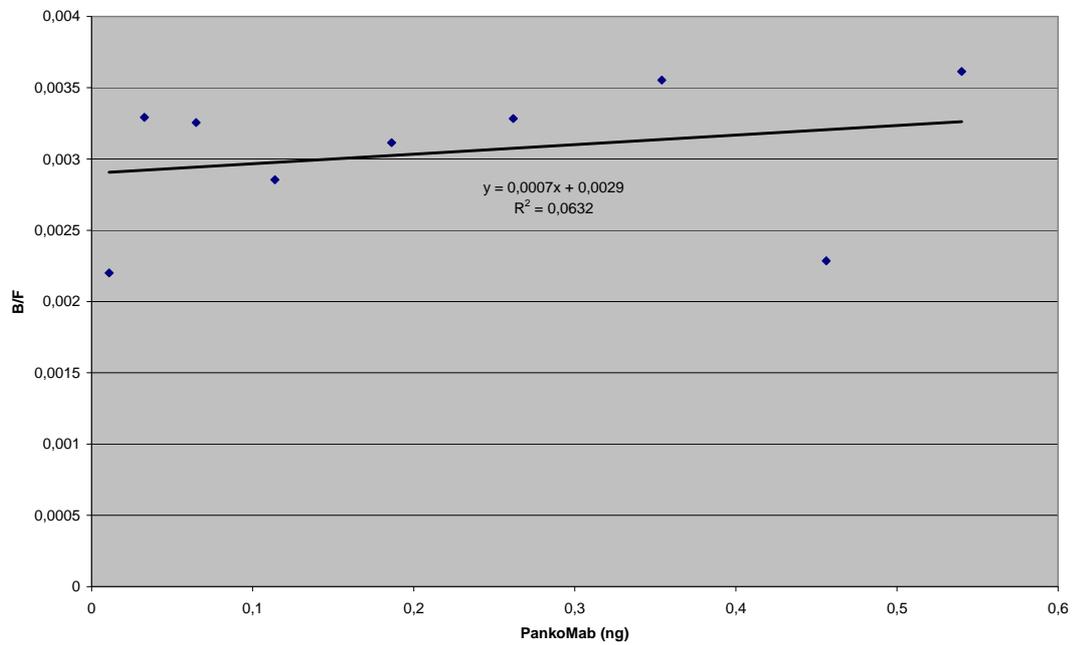


Abb. 12:

Graphische Darstellung des Scatchard Assays Nr.4 – Legende vgl. Abb. 9

3. Ergebnisse

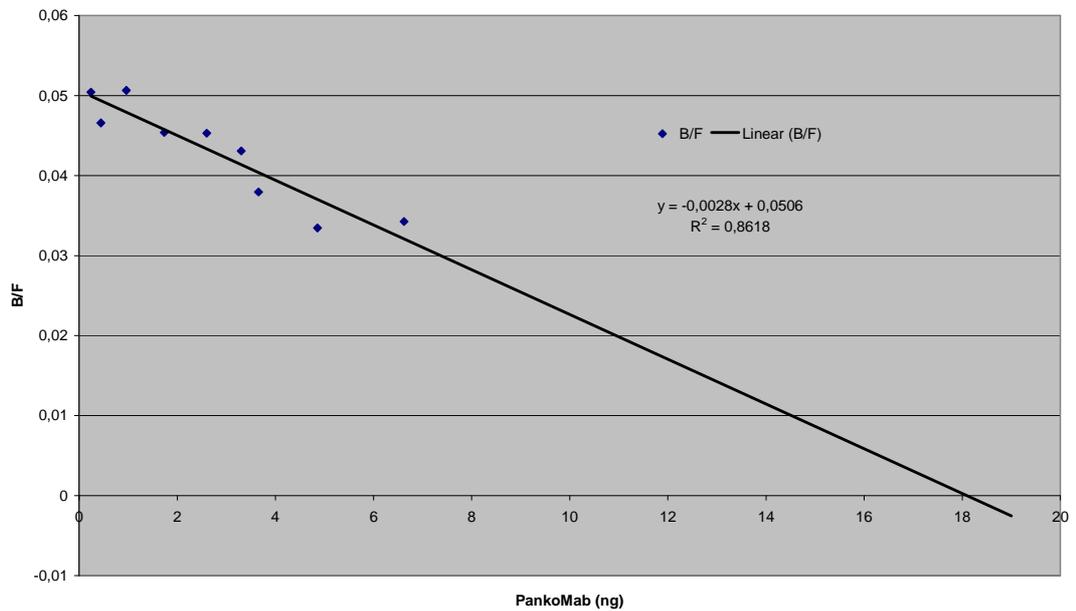


Abb. 13:
Graphische Darstellung des Scatchard Assays Nr. 5 – Legende vgl. Abb. 9

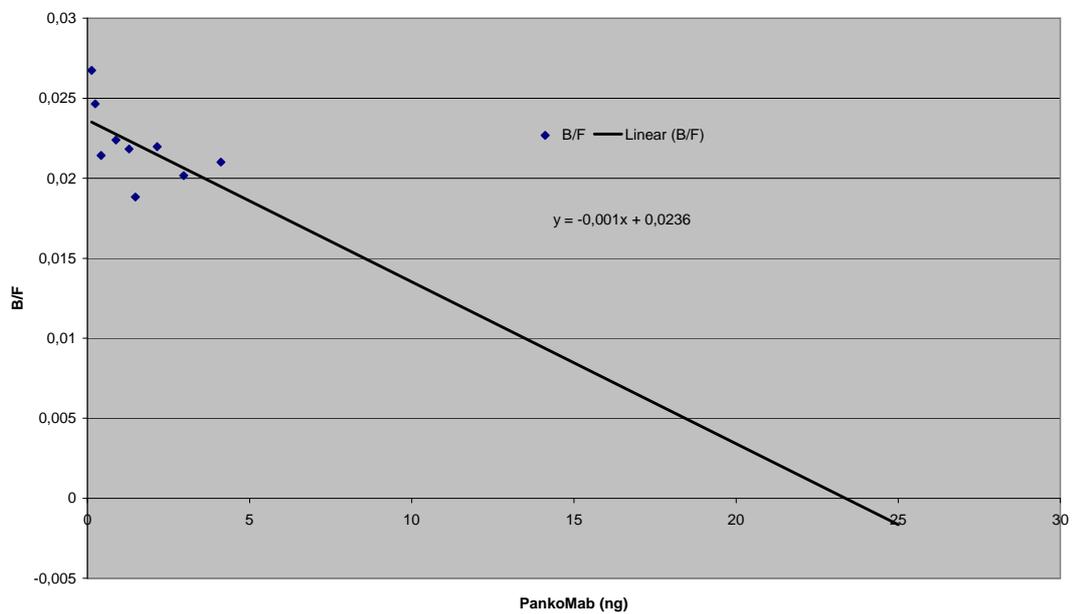


Abb.14:
Graphische Darstellung des Scatchard Assays Nr. 6 – Legende vgl. Abb. 9

3.6 Klonogener Assay

In diesem Versuch sollte die Zytotoxizität von ^{213}Bi -PankoMab an OV-MZ-6-WT/HSC45M2 Zellen untersucht werden. Dazu wurden 24-Well-Platten (50 OV-MZ-6-WT Zellen Pro Well/ 100 HSC45-M2 Zellen pro Well) mit ^{213}Bi -PankoMab/ ^{213}Bi -BSA verschiedener Aktivitäten beimpft und nach 10 Tagen die gebildeten Klone ausgezählt. Als Kontrollgruppe dienten nicht behandelte Platten.

3.6.1 Klonogener Assay mit OV-MZ-6-WT Zellen

In Abb. 15 ist das klonogene Überleben in Prozent von OV-MZ-6-WT Zellen bei verschiedenen Aktivitäten aufgetragen. Als 100% des klonogenen Überlebens wurde der Mittelwert der ausgezählten Klone der Kontrolle definiert. Mit steigender Aktivität sinkt das klonogene Überleben. Bei Behandlung mit 37 kBq beträgt das klonogene Überleben 76%, bei Verzehnfachung der Aktivität auf 370 kBq sinkt das klonogene Überleben proportional zur Aktivität auf 7,8% ab. Ab einer Aktivität von 740 kBq ist in dieser Testreihe kein klonogenes Überleben mehr nachweisbar.

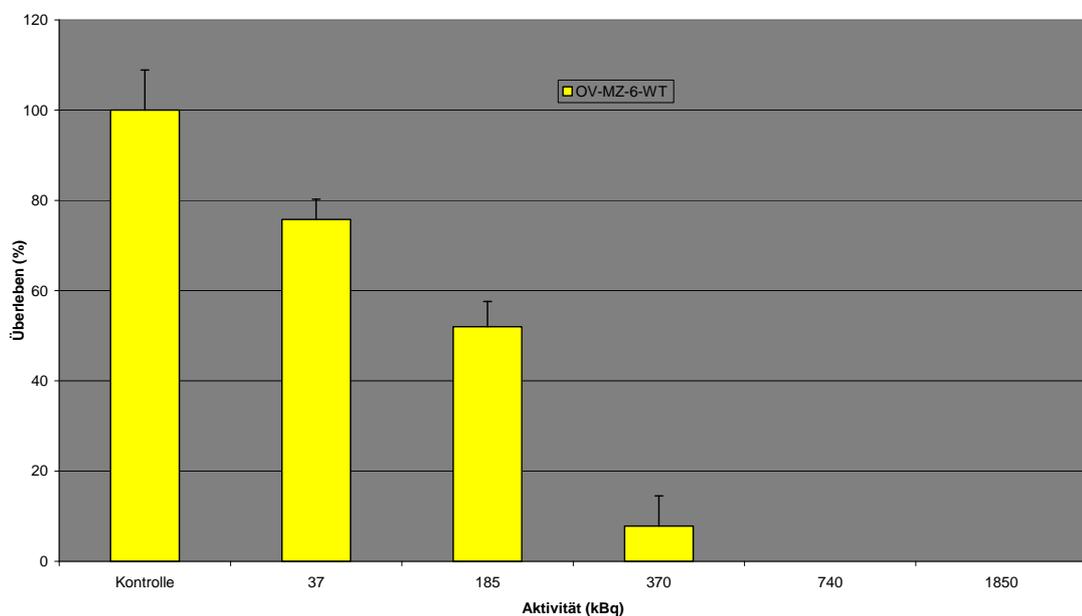


Abb. 15:
Klonogenes Überleben (%) von OV-MZ-6-WT 10 Tage nach Inkubation mit ^{213}Bi -PankoMab verschiedener Aktivitäten.

3. Ergebnisse

In Abb. 16 ist das klonogene Überleben von OV-MZ-6-WT Zellen nach Behandlung mit ^{213}Bi -PankoMab einer Behandlung mit ^{213}Bi -BSA gegenübergestellt. Es konnte ein Rückgang des klonogenen Überlebens auf 57,2% nach Behandlung mit 18,5 kBq ^{213}Bi -PankoMab und auf 85,5% nach Behandlung mit 18,5 kBq ^{213}Bi -BSA beobachtet werden. Bei Behandlung mit 148 kBq fiel das klonogene Überleben auf 9,4% (^{213}Bi -PankoMab) und auf 43,1% (^{213}Bi -BSA) ab. Nach Inkubation mit 278 kBq zeigte die Gruppe, die mit ^{213}Bi -PankoMab behandelt wurde, kein klonogenes Überleben mehr, nach Behandlung mit ^{213}Bi -BSA betrug das klonogene Überleben 17,1%.

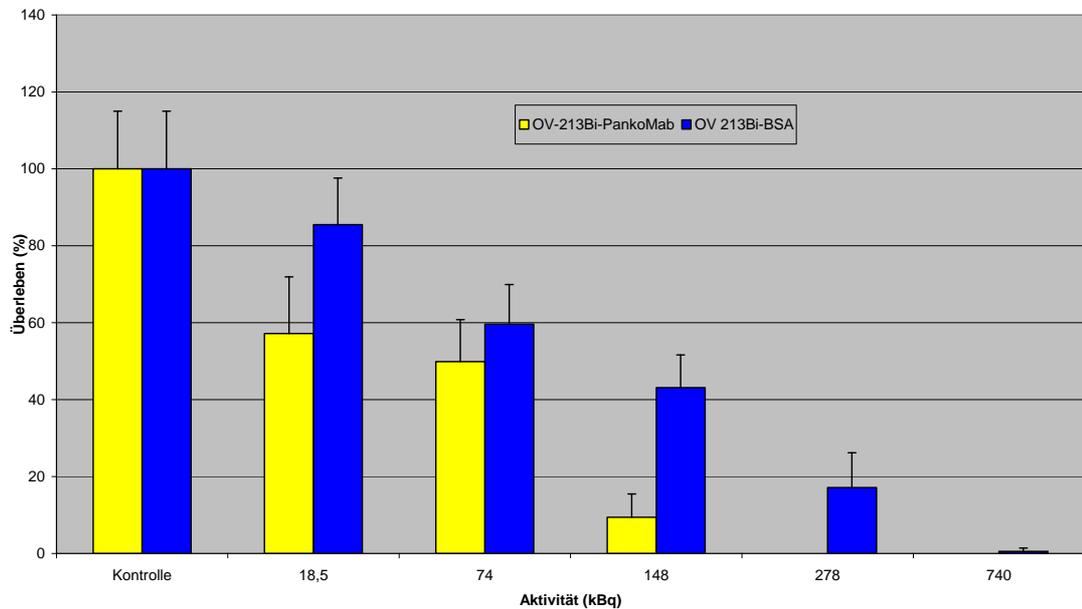


Abb. 16:
Klonogenes Überleben (%) von OV-MZ-6-WT 10 Tage nach Behandlung mit ^{213}Bi -PankoMab bzw. mit ^{213}Bi -BSA

3.6.2 Klonogener Assay mit HSC45-M2 Zellen

Abb. 17 zeigt das klonogene Überleben von HSC45-M2 Zellen im klonogenen Test. Nach einer Behandlung mit 37 kBq konnte ein klonogenes Überleben von 56% beobachtet werden, nach Verzehnfachung der Aktivität auf 370 kBq überlebten noch ca. 6%. Ab einer Aktivität von 740 kBq konnte kein klonogenes Überleben mehr beobachtet werden.

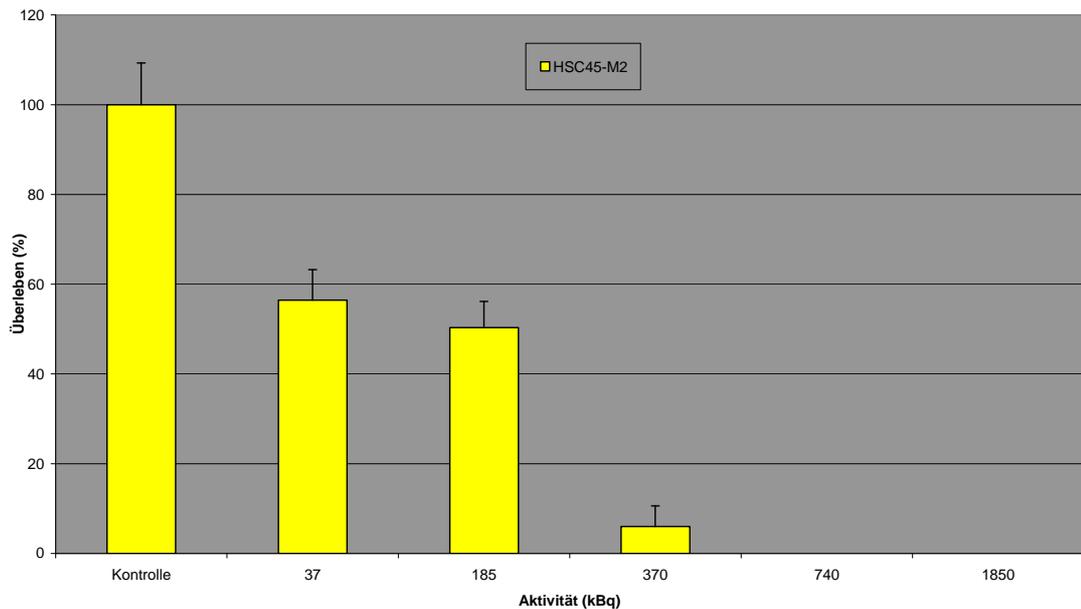


Abb. 17:

Klonogenes Überleben (%) von HSC45-M2 10 Tage nach Behandlung mit ^{213}Bi -PankoMab.

Analog zu den OV-MZ-6-WT Zellen wurde das klonogene Überleben der HSC45-M2 Zellen nach Behandlung mit ^{213}Bi -PankoMab dem klonogenen Überleben nach Behandlung mit ^{213}Bi -BSA gegenübergestellt. Wie in Abb. 18 dargestellt, verringerte sich das klonogene Überleben nach Behandlung mit 18,5 kBq ^{213}Bi -PankoMab auf 88%, nach Behandlung mit ^{213}Bi -BSA auf 94,4%. Nach Inkubation mit 278 kBq ^{213}Bi -PankoMab konnte ein Rückgang des klonogenen Überlebens auf 26,4% beobachtet werden, nach Inkubation mit 278 kBq ^{213}Bi -BSA reduzierte sich das klonogene Überleben auf 37%. Bei Behandlung mit 740 kBq konnte weder in der ^{213}Bi -PankoMab Gruppe noch in der ^{213}Bi -BSA Gruppe klonogenes Überleben registriert werden.

3. Ergebnisse

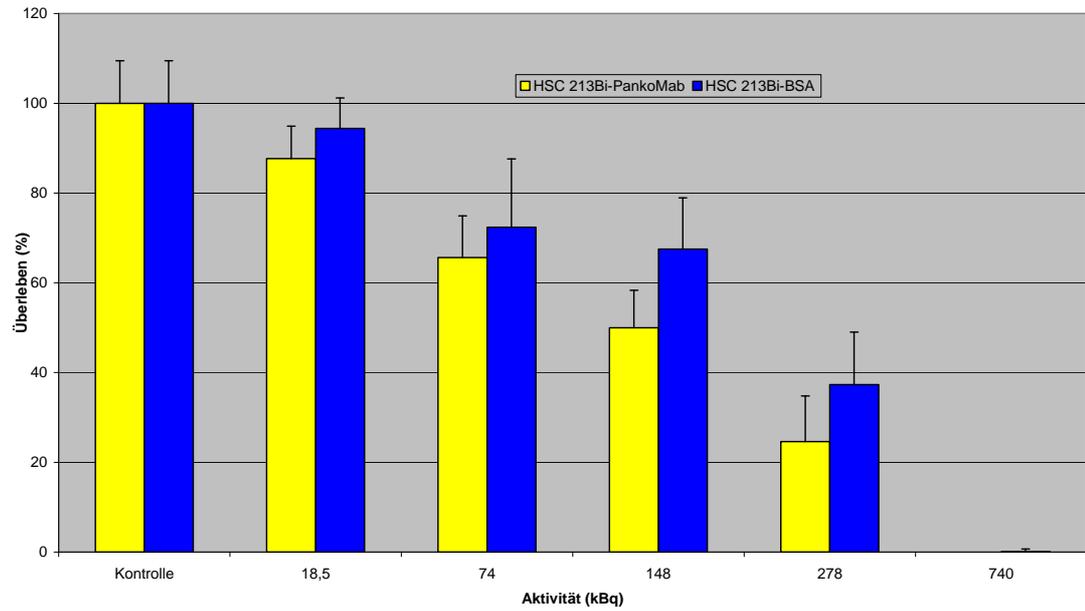


Abb. 18:

Klonogenes Überleben (%) von HSC45-M2 10 Tage nach Behandlung mit ^{213}Bi -PankoMab bzw. mit ^{213}Bi -BSA

3.7 Studie zu Biodistribution von ^{111}In -PankoMab und ^{213}Bi -PankoMab

Um die Verteilung des MUC1 Antikörpers PankoMab im Organismus festzustellen, wurde ^{111}In -PankoMab bzw. ^{213}Bi -BSA gesunden Swiss Nu/Nu Mäusen bzw. Mäusen mit Peritonealkarzinose injiziert. Die Injektion erfolgte unterhalb der Linea Alba in einem Winkel von 20-30 Grad. Nach einem Zeitraum von 1 h bzw. 3 h wurden die Organe entnommen und im γ -Counter gemessen (siehe 2.10). Aus den ermittelten Messwerten wurde der prozentuale Anteil der injizierten Aktivität pro Gramm Gewebe umgerechnet. Es wurden verschiedene Zeitpunkte nach Tumorzellinokulation und Kontrollgruppen untersucht (siehe Tabelle 1).

Die Versuche wurden 24 h, 3 und 6 Wochen nach Zellinokulation durchgeführt, nachdem die Versuchstiere makroskopisch erkennbare Zeichen einer Peritonealkarzinose und/ oder Aszites entwickelt hatten. ^{111}In ist aufgrund seiner Stabilität gegenüber ^{213}Bi für die Versuche besser geeignet. Die Bindung (%) des verwendeten Radioimmunkonjugats sind in Tab. 7 dargestellt. Auf eine Reinigung des Radioimmunkonjugats mit Hilfe der PD-10 Column wurde verzichtet, da sich in den Versuchen zur Antikörperbindung (3.5.1) eine Verschlechterung der PankoMab-Bindungsfähigkeit nach Aufreinigung durch PD-10 Säulen nachweisen ließ.

Gruppen	gebunden (%)
Keine Zellinokulation	80,9 (^{111}In -PankoMab)
24 h nach Zellinokulation	84,1 (^{111}In -PankoMab)
2 Wo	84,7 (^{111}In -PankoMab)
3 Wo	94,8 (^{213}Bi -BSA)
6 Wo	90 (^{111}In -PankoMab)

Tab. 7:

Bindung (%) der verwendeten Radioimmunkonjugate ^{111}In -PankoMab und ^{213}Bi -BSA in den unterschiedlichen Gruppen.

3.7.1 Biodistribution von ^{111}In -PankoMab 24h nach Inokulation von OV-MZ-6-WT Zellen

In diesem Versuch sollte die Verteilung des ^{111}In -PankoMab 24h nach Inokulation von 1×10^7 OV-MZ-6-WT Zellen ermittelt werden um festzustellen, ob eine Bindung an freie Tumorzellen nachweisbar ist. Es wurden zwei Gruppen 1 h und 3 h nach intraperitonealer Injektion des Radioimmunkonjugats untersucht. Pro Tier wurden 740 kBq verwendet.

3.7.1.1 Biodistribution des ^{111}In -PankoMab 1 h nach i.p. Injektion

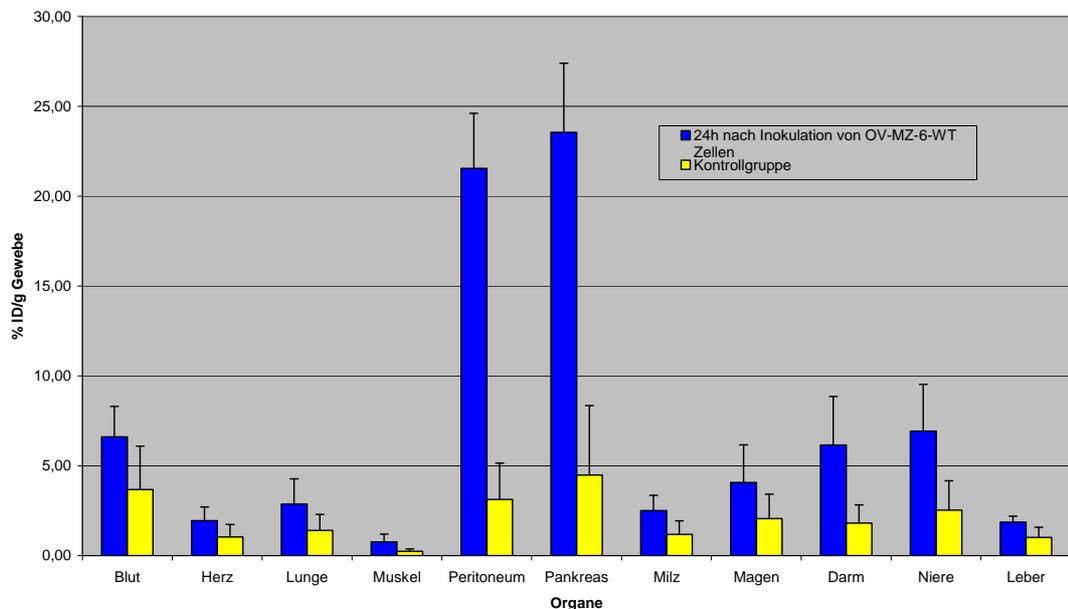


Abb.19:

Aktivitätskonzentrationen in % der injizierten Aktivität/g Gewebe der untersuchten Organe 1 h nach Injektion von ^{111}In -PankoMab 24 h nach OV-MZ-6-WT Zellinokulation (1×10^7) im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Zellinokulation.

Die Aktivitätskonzentration 1 h nach Injektion von ^{111}In -PankoMab (Abb.19) war im Pankreas ($23,6 \pm 3,9\%$ injizierte Aktivität/g) und im Peritoneum ($21,6 \pm 3,1\%$ injizierte Aktivität/g) deutlich höher als in der Gruppe ohne Zellinokulation (n= jeweils 4), verursacht durch ein Anheften der Zellen im Bereich von Pankreas und

3. Ergebnisse

Peritoneum. Dementsprechend betrug der Quotient Tumor-/Kontrollgruppe für Pankreas 5,3 für Peritoneum 6,9.

3.7.1.2 Biodistribution des ^{111}In -PankoMab 3 h nach i.p. Injektion

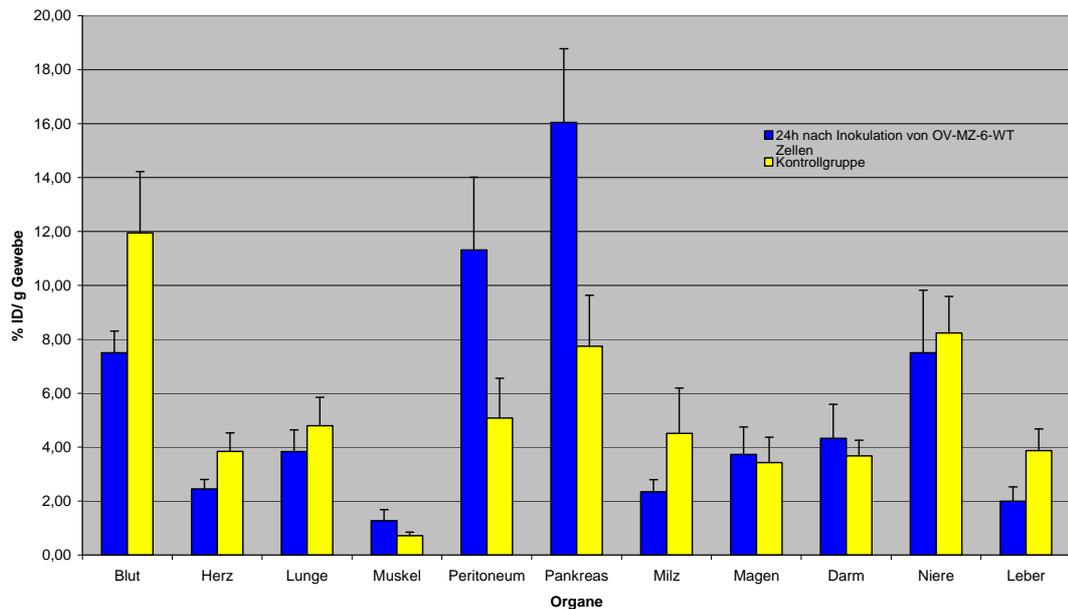


Abb. 20:

Aktivitätskonzentrationen in % der injizierten Aktivität /g Gewebe der untersuchten Organe 3 h nach Injektion von ^{111}In -PankoMab 24 h nach OV-MZ-6-WT Zellinokulation (1×10^7) im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Zellinokulation.

Bei Messung 3 h nach Injektion von ^{111}In -PankoMab (Abb. 20) verringerte sich die Aktivitätskonzentration im Pankreas auf 16 +/-2,7% injizierte Aktivität/g, im Peritoneum auf 11,3 +/-2,7% injizierte Aktivität/g. Des Weiteren stieg die Aktivitätskonzentration in der Kontrollgruppe auf 7,8 +/-1,9% injizierte Aktivität/g im Pankreas und auf 5,1 +/-1,5% injizierte Aktivität/g im Peritoneum. Der Quotient Tumor-/Kontrollgruppe verringerte sich im Vergleich zur Messung 1 h nach Injektion auf 2,1 für Pankreas und auf 2,2 für Peritoneum.

Im Vergleich zu anderen Organen wurden höhere Nierenwerte in der Tumorgruppe (6,9% injizierte Aktivität/g nach 1 h, 7,5% injizierte Aktivität/g nach 3 h) sowie in

3. Ergebnisse

der Kontrollgruppe (2,5% injizierte Aktivität/g nach 1 h, 8,2% injizierte Aktivität/g nach 3 h) gefunden.

3.7.2 Biodistribution von ^{111}In -PankoMab 24 h nach Inokulation von HSC45-M2 Zellen

3.7.2.1 Biodistribution des ^{111}In -PankoMab 1 h nach Injektion

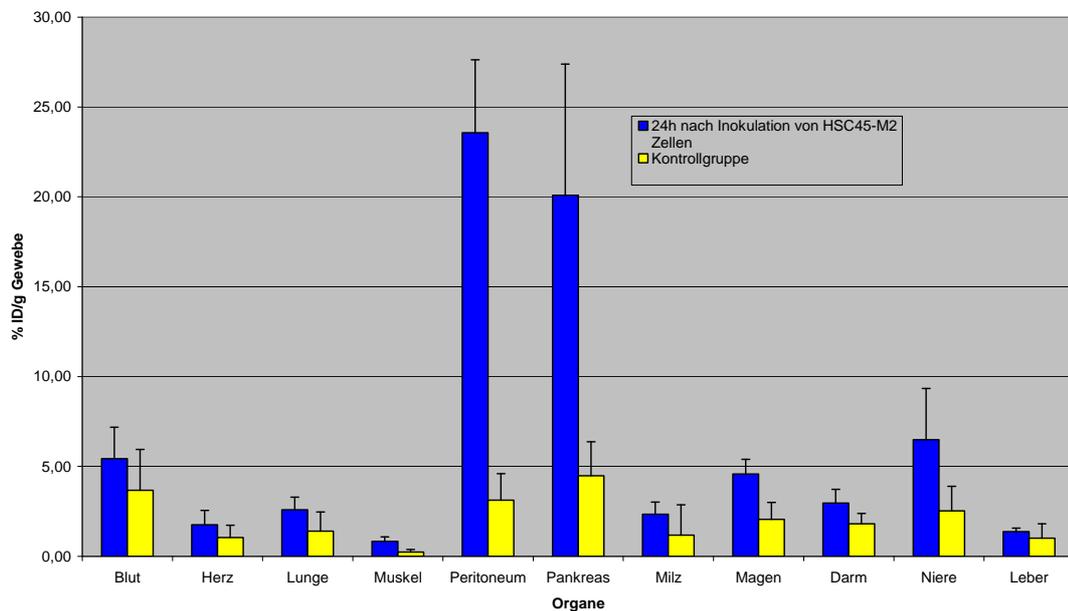


Abb. 21:

Aktivitätskonzentration in % der injizierten Aktivität /g Gewebe der untersuchten Organe 1 h nach Injektion von ^{111}In -PankoMab 24 h nach HSC45-M2 (1×10^7) Zellinokulation im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Zellinokulation.

Analog zu der Verteilung der OV-MZ-6-WT Zellen ist auch bei den HSC45-M2 Zellen eine hohe Aktivitätskonzentration von ^{111}In -PankoMab (Abb. 21) im Bereich im Pankreas (20 +/-7,3% injizierte Aktivität/g) und im Peritoneum (23,6 +/-4,0% injizierte Aktivität/g) 1 h nach Injektion zu sehen. Die Aktivitätskonzentration von ^{111}In -PankoMab für Pankreas (4,5 +/-3,9% injizierte Aktivität/g) und Peritoneum (3 +/-2,1% injizierte Aktivität/g) in der Kontrollgruppe ist geringer, wie auch der Quotient Tumor-/Kontrollgruppe für Pankreas 4,5 und Peritoneum 7,6 zeigt (n = jeweils 5).

3.7.2.2 Biodistribution des ^{111}In -PankoMab 3h nach Injektion

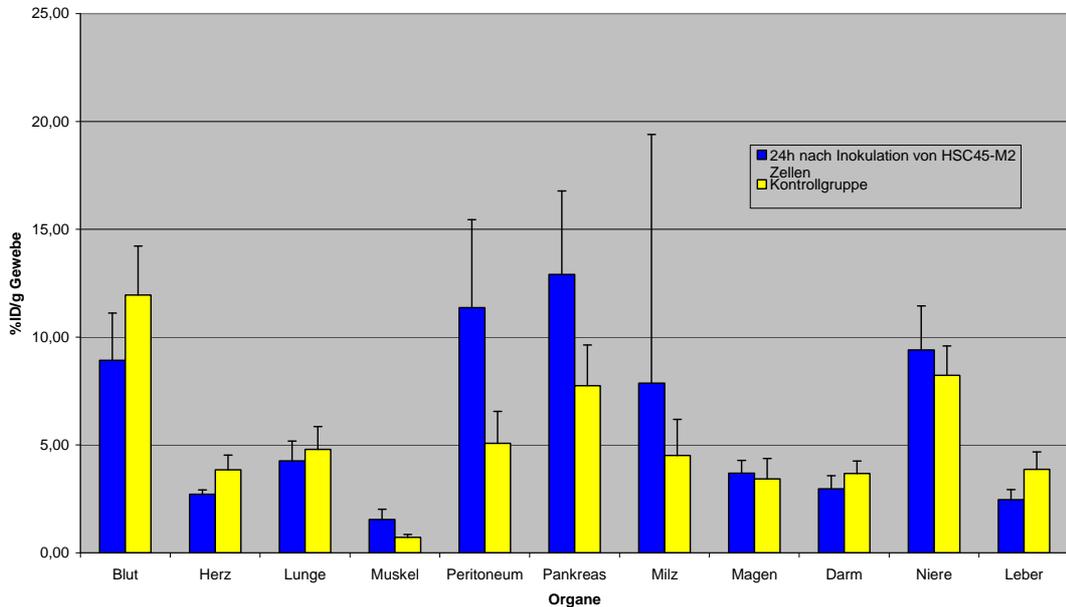


Abb. 22:

Aktivitätskonzentration in % der injizierten Aktivität /g Gewebe der untersuchten Organe 3 h nach Injektion von ^{111}In -PankoMab 24 h nach HSC45-M2 Zellinokulation (1×10^7) im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Zellinokulation.

Bei Messung 3 h nach Injektion von ^{111}In -PankoMab (Abb. 22) verringerte sich die Aktivitätskonzentration im Pankreas auf $11 \pm 4,1\%$ injizierte Aktivität/g, im Peritoneum auf $12,9 \pm 1,9\%$ injizierte Aktivität/g. Des Weiteren stieg die Aktivitätskonzentration in der Kontrollgruppe im Pankreas ($7,8 \pm 1,9\%$ injizierte Aktivität/g) und im Peritoneum ($5,1 \pm 1,5\%$ injizierte Aktivität/g). Der Quotient Tumor-/Kontrollgruppe verringerte sich im Vergleich zur Messung 1 h nach Injektion auf 1,7 für Pankreas und auf 2,2 für Peritoneum ($n=5$).

3.7.3 Biodistribution von ^{111}In -PankoMab 3 Wochen nach Inokulation von OV-MZ-6-WT Zellen

Es wurden 10 Mäusen 1×10^7 OV-MZ-6-WT inokuliert. Die Tumorguppe sollte 6 Wochen nach der Zellinokulation untersucht werden, da aber 3 Wochen nach Zellinokulation äußere Krankheitszeichen, wie Aszites, petechiale Hautblutungen und Tumorkachexie erkennbar waren, wurde der Versuch schon nach 3 Wochen durchgeführt. Es wurden solide Tumoren beobachtet. Eine Peritonealkarzinose konnte nicht nach 3 Wochen, sondern erst nach 6 Wochen beobachtet werden (siehe 3.7.4.).

3.7.3.1 Biodistribution des PankoMab 1 h nach Injektion

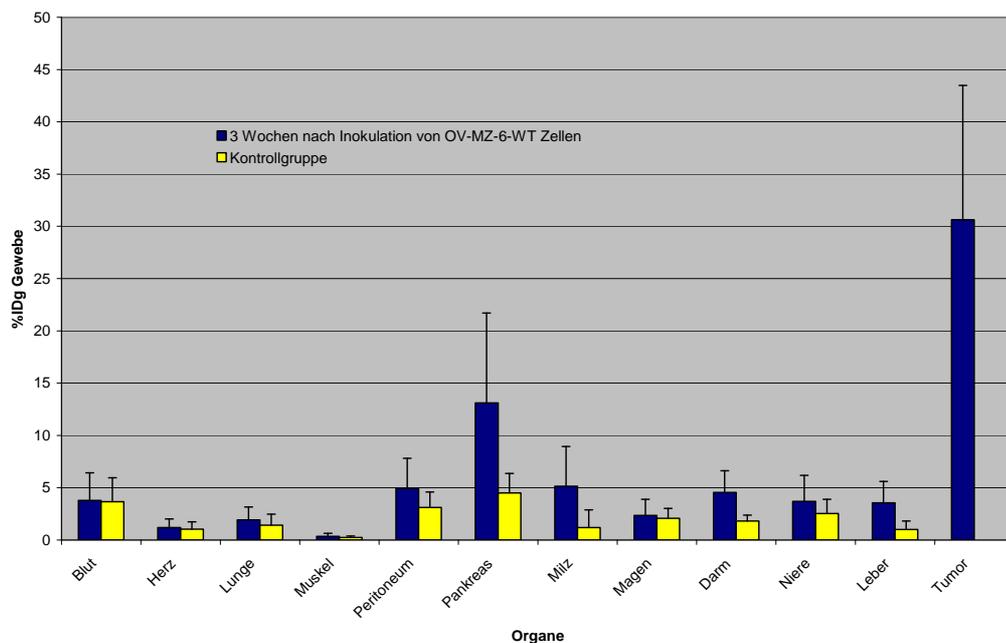


Abb. 23:
Aktivitätskonzentration in % der injizierten Aktivität /g Gewebe der untersuchten Organe 1 h nach Injektion von ^{111}In -PankoMab 3 Wochen nach OV-MZ-6-WT Zellinokulation (1×10^7) im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Zellinokulation.

3. Ergebnisse

1 h nach ^{111}In -PankoMab Injektion (Abb. 23) war eine Aktivitätskonzentration von $13,1 \pm 8,6\%$ injizierte Aktivität/g im Pankreas zu beobachten, obwohl makroskopisch keine Tumordinfiltration erkennbar war. Im Tumor konnte ein Wert von $30,6 \pm 12,9\%$ injizierte Aktivität/g ermittelt werden. Der Quotient Tumor/ Blut war 8,1.

3.7.3.2 Biodistribution des PankoMab 3 h nach Injektion

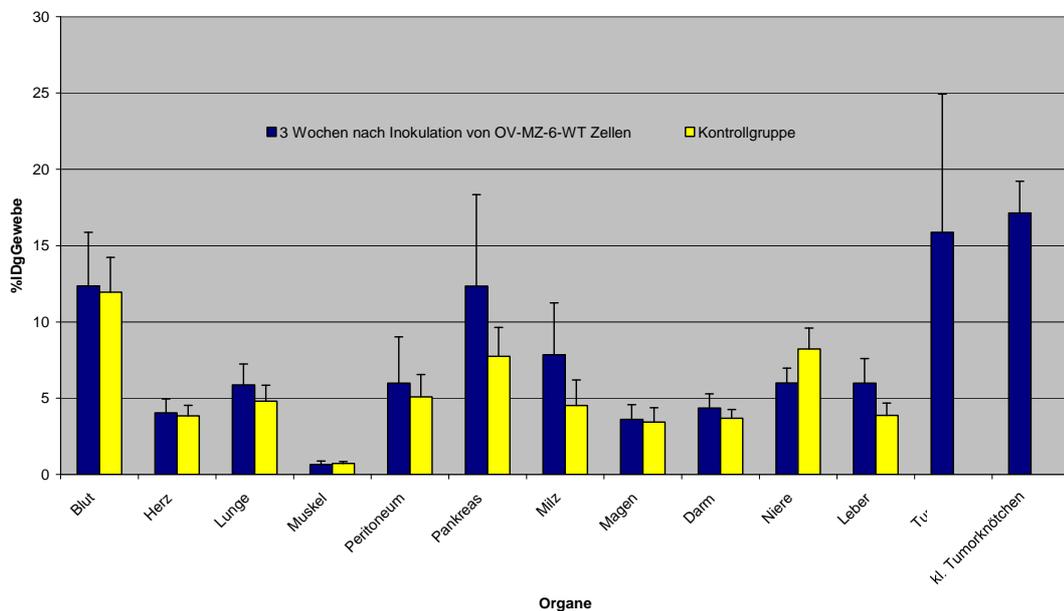


Abb. 24:

Aktivitätskonzentration in % der injizierten Aktivität /g Gewebe der untersuchten Organe 3 h nach Injektion von ^{111}In -PankoMab 3 Wochen nach OV-MZ-6-WT Zelinokulation (1×10^7) im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Zelinokulation).

3 h nach ^{111}In -PankoMab Injektion fiel die Aktivitätskonzentration im Pankreas ($12,3 \pm 6\%$ injizierte Aktivität/g) ab. Die Aktivitätskonzentration in der Niere stieg auf $6 \pm 1\%$ injizierte Aktivität/g an. Da in der 3 h Gruppe ($n=3$) neben Tumoren auch noch kleine Tumorknötchen vorzufinden waren, erfolgt eine Unterteilung. Die Aktivitätskonzentration von ^{111}In -PankoMab im Tumor ($15,9 \pm 9,1\%$ injizierte Aktivität/g) verringerte sich im Vergleich zur 1 h Gruppe. In den kleinen Tumorknötchen wurden $17,2 \pm 2,1\%$ injizierte Aktivität/g ($n=2$) gemessen.

3.7.4 Biodistribution von ¹¹¹In-PankoMab 6 Wochen nach Inokulation von OV-MZ-6-WT Zellen

In diesem Versuch sollte die Biodistribution von ¹¹¹In-PankoMab in Mäusen mit Peritonealkarzinose 1 h und 3 h nach intraperitonealer Injektion untersucht werden. Sechs Wochen nach Inokulation von OV-MZ-6-WT Zellen ergab sich makroskopisch folgendes Bild: 6 der 12 Mäuse zeigten äußere Krankheitszeichen, palpierbaren Aszites und Hauteinblutungen, 2 von ihnen waren stark ikterisch.

Maus Nr.:	Pathologische Besonderheiten:
1	Peritoneum tumorfrei, Pankreas infiltriert, kleine Tumorknötchen, Aszites
2	Peritoneum tumorfrei, Pankreas infiltriert, kleine Tumorknötchen, Aszites
3	Blutiger Aszites, Peritoneum infiltriert, subkutaner Tumor an der Einstichstelle, kleine Tumorknötchen
4	Ikterus, Tumor an der Leber, Peritoneum und Pankreas infiltriert, Aszites
5	Peritoneum tumorfrei, Pankreas wenig infiltriert, keine kleinen Tumorknötchen erkennbar, subkutaner Tumor an der Einstichstelle, kein Aszites
6	Ikterus, Pankreas und Leber infiltriert, kleine Tumorknötchen, Aszites
7	Pankreas infiltriert, Aszites, kleine Tumorknötchen, subkutaner Tumor
8	Pankreas infiltriert, Aszites, kleine Tumorknötchen, subkutaner Tumor
9	Pankreas infiltriert, Aszites, kleine Tumorknötchen, subkutaner Tumor
10	Pankreas infiltriert, Aszites, kleine Tumorknötchen, subkutaner Tumor
11	Pankreas infiltriert, Aszites, kleine Tumorknötchen, subkutaner Tumor
12	Pankreas infiltriert, Aszites, kleine Tumorknötchen, kein subkutaner Tumor zu erkennen

Tab. 8:

Tumorverteilung und pathologische Auffälligkeiten nach Abtötung und Eröffnung des Situs. Die Tiere wurden zur Untersuchung der Biodistribution von ¹¹¹In-PankoMab 6 Wochen nach Inokulation von OV-MZ-6-WT Zellen verwendet.

Mit den Mäusen Nr. 1-6 wurde die Biodistribution des ¹¹¹In-PankoMab 1 h nach Injektion, mit Maus Nr. 7-12 3 h nach Injektion bestimmt. Wie in Tabelle 8 beschrieben, hatten bis auf Maus Nr. 5 alle Tiere diffus im Bauchraum verteilt metastatische Absiedlungen entwickelt.

3.7.4.1 Biodistribution des ^{111}In -PankoMab 1 h nach Injektion

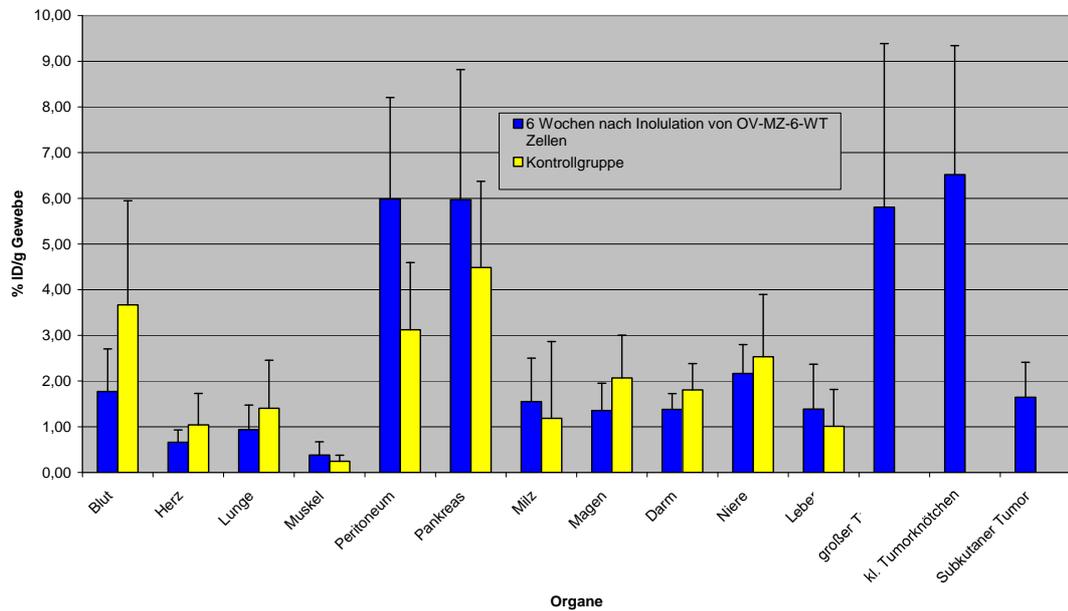


Abb. 25:

Aktivitätskonzentration in % der injizierten Aktivität /g Gewebe der untersuchten Organe 1 h nach Injektion von ^{111}In -PankoMab 6 Wochen nach OV-MZ-6-WT Zellinokulation (1×10^7) im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Zellinokulation.

Wie Abb. 25 zeigt, liegt die Aktivitätskonzentration von ^{111}In -PankoMab im Pankreas (6 +/-2,9% injizierte Aktivität/g) und Peritoneum (6 +/- 2,2% injizierte Aktivität/g) etwa im selben Bereich wie die Aktivitätskonzentration im großen soliden Tumor (5,8 +/-3,6% injizierte Aktivität/g). Wie aus der Tab. 8 zu entnehmen, war bei allen Mäusen das Pankreas tumorinfiltriert. Die hohen Werte von Pankreas und Peritoneum beruhen auf einer Tumorinfiltration dieser Organe.

Die höchste Aktivitätskonzentration von ^{111}In -PankoMab konnte in den kleinen Tumorknötchen (6,5 +/-2,8% injizierte Aktivität/g) gemessen werden. In den subkutanen Tumoren (n=3) war die Aktivitätskonzentration 1,6 +/-0,8% injizierte Aktivität/g. Dementsprechend betragen die Quotienten Tumor/ Blut für den großen Tumor 3,3, für die kleinen Tumorknötchen 3,7 und für den subkutanen Tumor 0,9.

3.7.4.2 Biodistribution des ¹¹¹In-PankoMab 3 h nach Injektion

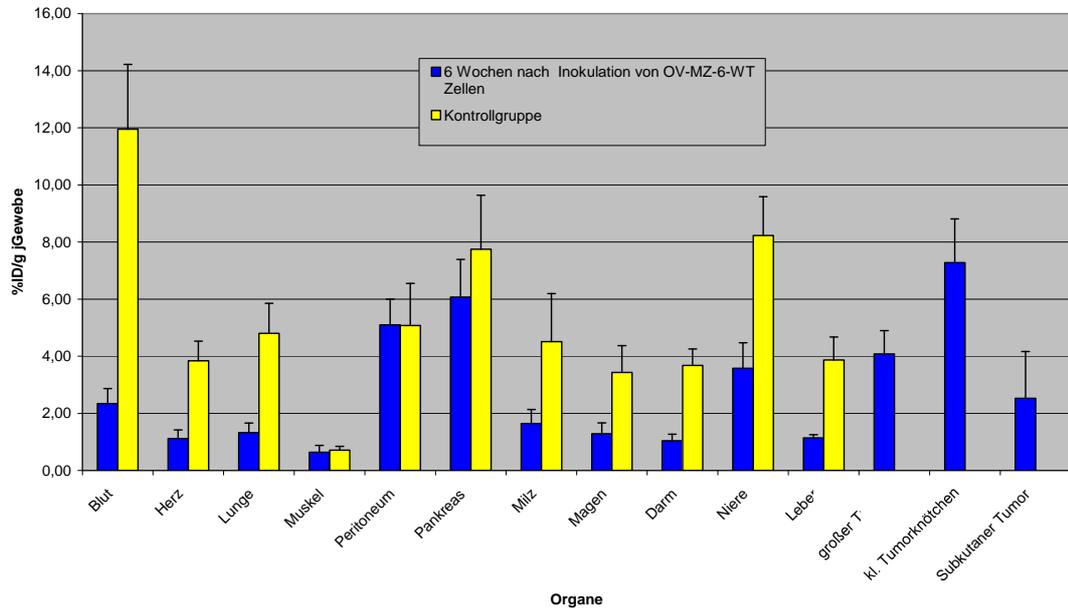


Abb. 26:

Aktivitätskonzentration in % der injizierten Aktivität /g Gewebe der untersuchten Organe 3 h nach Injektion von ¹¹¹PankoMab 6 Wochen nach OV-MZ-6-WT Zellinokulation (1×10^7) im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Zellinokulation.

Wie Abb. 26 zeigt, wurde im Peritoneum eine Aktivitätskonzentration (¹¹¹In-PankoMab) von 5,1 +/-0,9% injizierte Aktivität/g und im Pankreas eine Aktivitätskonzentration von 6,1 +/- 1,3% injizierte Aktivität gemessen. In soliden Tumoren (n=6) ergab sich 3 h nach Injektion eine Aktivitätskonzentration von ¹¹¹In-PankoMab von 4 +/-0,8% injizierte Aktivität/g, in kleinen Tumorknötchen (n=6) eine Aktivitätskonzentration von 7,3 +/-1,5% injizierte Aktivität/g und in subkutanen Tumoren (n=5) eine Aktivitätskonzentration von 2,5 +/- 1,6% injizierte Aktivität/g. Die errechneten Quotienten Tumor/ Blut betragen 1,7 für den großen Tumor, 3,1 für die kleinen Tumorknötchen und 1,1 für den subkutanen Tumor.

3.7.5 Biodistribution von ^{213}Bi -BSA 3 Wochen nach Zellinokulation von HSC45-M2 Zellen

In diesem Versuch sollte die Biodistribution von ^{213}Bi -BSA 1 h und 3 h nach intraperitonealer Injektion untersucht werden. Dazu wurden 11 Mäuse 1×10^7 HSC45-M2 Zellen i. p. inokuliert und 3 Wochen abgewartet, bis die Mäuse äußere Zeichen einer Peritonealkarzinose, wie Aszites, palpierbare Tumorknötchen und Hauteinblutungen hatten. Der Vorteil von BSA gegenüber anderen Proteinen ist, dass es keine spezifische Bindung mit den Tumorzellen eingeht.

3.7.5.1 Biodistribution von ^{213}Bi -BSA 1 h nach Injektion

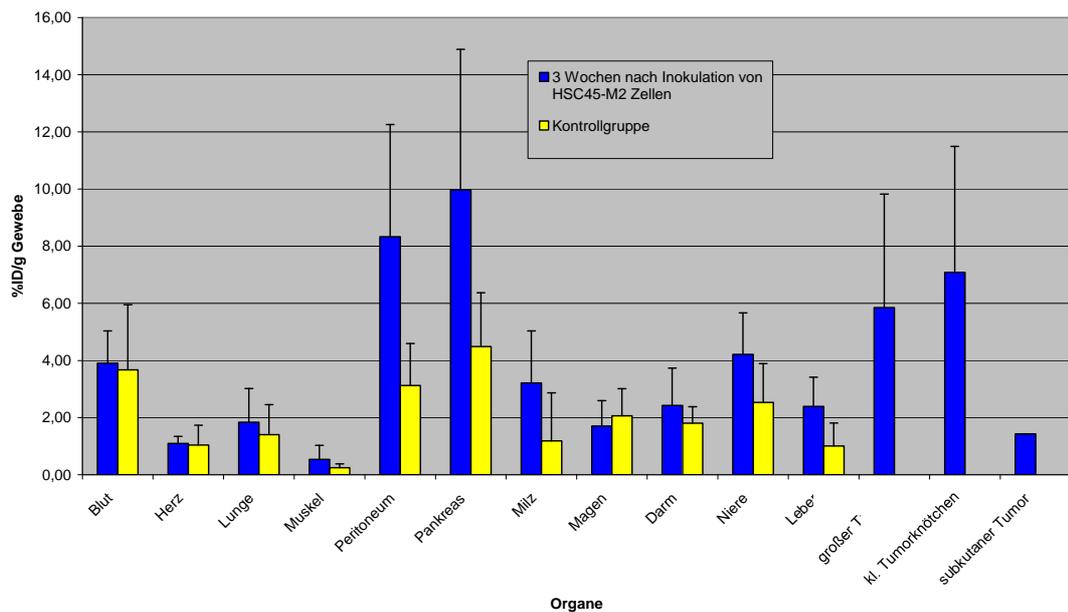


Abb. 27:

Aktivitätskonzentration in % der injizierten Aktivität /g Gewebe der untersuchten Organe 1 h nach Injektion von ^{213}Bi -BSA 3 Wochen nach HSC45-M2 Zellinokulation (1×10^7) im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Zellinokulation.

Wie Abb. 27 zeigt, betrug die Aktivitätskonzentration von ^{213}Bi -BSA im Peritoneum $8,3 \pm 3,9\%$ injizierte Aktivität/g und im Pankreas $10 \pm 4,9\%$ injizierte Aktivität/g. Die hohen Werte des Peritoneums kommen vermutlich durch den

3. Ergebnisse

kolloidosmotischen Druckgradienten in Richtung des großen Kreislaufs zustande. Die Kontrollgruppe zeigt Werte von 3 +/-2% injizierte Aktivität/g im Peritoneum und 4,5 +/-3,9% injizierte Aktivität/g im Pankreas. Gruppengröße war (n=6). Der Quotient Tumor/Kontrollgruppen war für Pankreas 2,2, für Peritoneum 2,6.

Im großen Tumor betrug die Aktivitätskonzentration 5,9 +/-4% injizierte Aktivität/g (n=4), in kleinen Tumorknötchen 7,1 +/-4,4% injizierte Aktivität/g (n=5), im subkutanen Tumor 1,4 +/-0% injizierte Aktivität/g (n=1) des injizierten ^{213}Bi -BSA. Die Tumor-/Blutquotienten betragen 1,5/ 1,8/ 0,4.

3.7.5.2 Biodistribution von ^{213}Bi -BSA 3 h nach Injektion

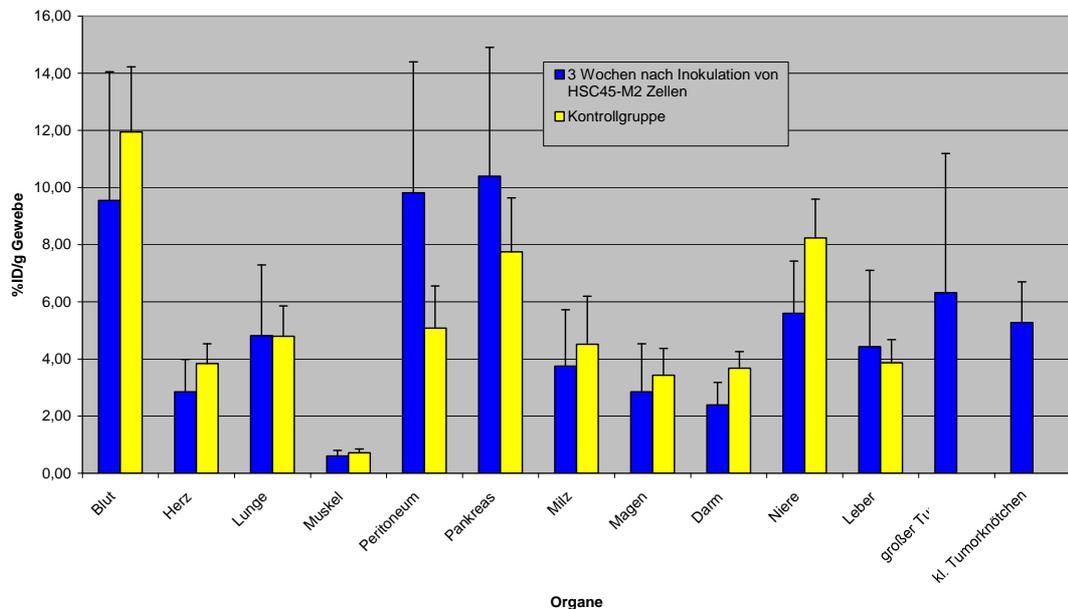


Abb. 28:

Aktivitätskonzentration in % der injizierten Aktivität /g Gewebe der untersuchten Organe 3 h nach Injektion von ^{213}Bi -BSA 3 Wochen nach HSC45-M2 Zelinokulation (1×10^7) im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Zelinokulation.

Die Messung nach 3 h zeigt einen gleich bleibend hohen Wert von ^{213}Bi -BSA für Pankreas 10,4 +/-4,5% injizierte Aktivität/g und für Peritoneum 9,8 +/-4,6% injizierte Aktivität/g (n=5). Die Aktivitätskonzentration von ^{213}Bi -BSA betrug im großen Tumor 6,3 +/-4,9% injizierte Aktivität/g (n=2), in den kleinen Tumorknötchen 6,3 +/-4,3% injizierte Aktivität/g. Die Tumor-/Blutquotienten betragen für den großen Tumor 0,7 und für die kleinen Tumorknötchen 0,6.

4. Diskussion :

Proliferationskinetik der HSC45-M2 bzw. OV-MZ-6-WT Zellen

Die Proliferation der HSC45-M2 Zellen wurde über einen Zeitraum von 7 Tagen verfolgt, nach Aussaat von 5×10^5 bzw. 1×10^6 pro Zellkulturflasche. Einen Tag nach Aussaat der Zellen wurde bei beiden Gruppen nur die Hälfte der ausgesäten Zellen registriert ($2,7 \times 10^5$ bei Aussaat von 5×10^5 ; 5×10^5 bei Aussaat von 1×10^6 Zellen; siehe 3.1, Abb.3). Nach Aussaat von 1×10^6 Zellen begann die Zellzahl ab dem 3 Tag, nach Aussaat von 5×10^5 Zellen ab dem 4 Tag anzusteigen und erreichte jeweils ihr Maximum am 7 Tag nach Aussaat ($8,1 \times 10^6$ bei Aussaat von 5×10^5 , $7,2 \times 10^6$ bei Aussaat von 1×10^6). Am Tag 8 nahmen die Zellzahlen wieder ab ($5,2 \times 10^6$ bei Aussaat von 1×10^6 , $7,3 \times 10^6$ bei Aussaat von 5×10^5).

Die jeweils auf die Hälfte reduzierte Zellzahl einen Tag nach Aussaat könnte folgende Ursachen haben:

Vorstellbar ist z.B., dass unter den ausgesäten Zellen ein gewisser Prozentsatz nicht mehr in der Lage war sich anzuheften.

Beim Ablösevorgang mittels EDTA besteht die Möglichkeit, dass nicht alle Zellen aus einer Zellkulturflasche abgelöst wurden. Die mikroskopische Kontrolle ergab bei allen Zellkulturflaschen vergleichsweise geringe Mengen an nicht abgelösten Zellen.

Die Verdopplungszeit für HSC45-M2 betrug 37 h (1×10^6 Aussaat), bzw. 30 h (5×10^5 Aussaat).

Dass die Verdopplungszeit in der Gruppe, in der nur die Hälfte der Zellen (5×10^5) ausgesät wurden, um 23% verkürzt war, kann evtl. durch ein besseres Raum- und damit auch besseres Nährstoffangebot erklärt werden. Am siebten Tag wurde bei beiden Gruppen die maximale Zellanzahl mit jeweils vollständiger Bedeckung der Bodenfläche erreicht. Damit verbunden änderte sich der pH-Wert, erkennbar am Farbumschlag des Mediums von rot nach gelb, sehr wahrscheinlich verursacht durch die Anhäufung toxischer Stoffwechselprodukte. Damit in Zusammenhang dürfte auch die erneute Abnahme der Zellzahl am 8. Tag auf $5,2 \times 10^6$ bei Aussaat von 1×10^6 und auf $7,3 \times 10^6$ bei Aussaat von 5×10^5 stehen.

Die ermittelte Anzahl der OV-MZ6-WT Zellen war 24 h nach Aussaat im Gegensatz zu den HSC45-M2 Zellen in etwa so hoch wie bei Aussaat (siehe Abb. 2). Möglicherweise sind die OV-MZ-6-WT Zellen durch EDTA besser vom Boden der

4. Diskussion

Zellkulturflasche ablösbar, daher bleiben weniger Zellen zurück. Die OV-MZ-6-WT Zellen traten am 2. Tag in die Proliferationsphase ein. Wie Abb. 4 zeigt, betrug die Verdopplungszeit bei Aussaat von 1×10^6 Zellen 20 h und bei Aussaat von 5×10^5 Zellen 26 h.

Die Verdopplungszeit der OV-MZ-6-WT Zellen ist demnach durchschnittlich um $1/3$ kürzer als diejenige der HSC45-M2 Zellen. Allerdings war im Gegensatz zu den HSC45-M2 Zellen die Verdopplungszeit bei Aussaat von 1×10^6 Zellen kürzer als bei Aussaat von 5×10^5 .

Bedingt durch den geringeren Zelldurchmesser (OV-MZ-6-WT ca. $15 \mu\text{m}$, HSC45-M2 ca. $18 \mu\text{m}$) war die maximale Anzahl der Zellen pro Zellkulturflasche deutlich höher bei OV-MZ-6-WT Zellen als bei HSC45-M2 Zellen mit $2,2 \times 10^7$ bei Aussaat von 1×10^6 bzw. $2,4 \times 10^7$ bei Aussaat von 5×10^5 . Sowohl bei HSC45-M2 als auch bei OV-MZ-6-WT Zellen wurde eine höhere Zellzahl jeweils bei Aussaat der geringeren Zellzahl (5×10^5) erreicht.

Die ermittelten Verdopplungszeiten erleichtern die Abschätzung der zu festgesetzten Zeitpunkten zu erwartenden Zellzahlen nach Aussaat einer definierten Zellzahl. Besonders bei Versuchen, die große Zellzahlen erfordern, ist die Abschätzung der Vermehrungsdauer hilfreich für die Planung und Durchführung.

AK-Bindungstests

Ein ausschlaggebender Parameter für die Effizienz einer Radioimmuntherapie ist die Affinität des verwendeten Antikörpers zum Antigen, das auf einer Tumorzelllinie exprimiert wird. Die Bindung von PankoMab an OV-MZ-6-WT und HSC45-M2 wurde mittels Antikörperbindungstests untersucht.

In einer Studie konnte Cao et al. (1997) die Expression von MUC1 an Epithelzellen und Tumorzellen des Gastrointestinaltrakts nachweisen. In dieser Studie wurde die Expression von MUC1 immunhistochemisch an normalem und neoplastischem gastrointestinalem Gewebe (Magen, Ileum, Colon), sowie an normalem und neoplastischem Mamma-Gewebe untersucht, vor und nach Behandlung mit Neuraminidase, α -Fucosidase und periodate Oxidation. Für HSC45-M2 Zellen konnten in dieser Arbeit mit Hilfe der Antikörperbindungstests Bindungsraten des PankoMab zwischen 2,4% und 7,6% ermittelt werden. Bindungsraten unter 10% sind als eher niedrig für eine Radioimmuntherapie einzustufen.

Eine mögliche Erklärung der niedrigen Bindungsraten liefert eine Studie von Cao (1998), in der 56 verschiedene Anti-MUC1 Antikörper, unter anderem PankoMab, hinsichtlich Bindung an Oberflächenepithel von Dün-, Dickdarm und Brustgewebe getestet wurden. Die verschiedenen Gewebe wurden immunhistochemisch gefärbt. Die Einteilung erfolgte in: Keine Färbung, leicht, mittel und stark angefärbt. Dabei wurden die Schnitte jeweils vor und nach PO (periodate oxidation) immunhistochemisch gefärbt. PankoMab war an den getesteten Geweben erst nach PO Behandlung positiv.

Unter PO Behandlung versteht man folgendes: Die Schnitte wurden nach der Deparaffinisierung mit verschiedenen Konzentrationen (1mM-20mM) mit Perjod Säure in Azetatpuffer für 30 min inkubiert. Durch diese Behandlung unterschieden die Autoren dieser Studie zwischen MAK, die als Antigenstruktur ein Kohlenhydratgerüst oder ein Protein haben, da das Kohlenhydratgerüst durch die PO Vorbehandlung teilweise oder ganz, je nach Konzentration, zerstört wird (Bara et al. 1992).

In einer anderen Studie konnten Bara et al. (1993) nachweisen, dass die Fucose, ein sechswertiger Zucker, die Antigenbindungsstellen der MUSE I, DF3 und SM3 MAK maskiert, da die MAK in der immunhistochemischen Färbung erst nach einer

Behandlung von α -Fucosidase positiv waren. Nach einer Behandlung mit PO war die immunhistochemische Färbung sogar noch stärker ausgeprägt.

Eine niedrige Bindungsrate des PankoMab mit Zellen wie den HSC45-M2 Zellen kann möglicherweise auf den von den Autoren beschriebenen Effekt der Maskierung durch Zucker wie Fucose zurückzuführen sein. Endgültig bewiesen wurde dies in dieser Studie aber nicht, da auf eine Vorbehandlung der HSC45-M2 sowie der OV-MZ-6-WT Zellen mit PO verzichtet wurde. Dies geschah, da die Studie den potentiellen klinischen Einsatz von PankoMab Radioimmunkonjugaten abschätzen sollte und bei Patienten eine solche Vorbehandlung selbstverständlich nicht wie bei in Vitro Versuchen möglich ist.

Im Gegensatz zu den HSC45-M2 Zellen konnten bei den OV-MZ-6-WT Zellen Bindungsraten des PankoMab zwischen 4,1% und 36,8% ermittelt werden. Auch bei den OV-MZ-6-WT Zellen wurde auf eine Vorbehandlung mit PO bzw. α -Fucosidase verzichtet. Wie Tabelle 10 verdeutlicht, sind die stark unterschiedlichen Ergebnisse der Bindungstests sehr wahrscheinlich bedingt durch die Passagezahl der OV-MZ-6-WT Zellen bzw. Reinigung des Antikörpers mittels PD-10 Säule. So konnte für die OV-MZ-6-WT Zellen gezeigt werden, dass bei höheren Passagezahlen die Bindungsrate allgemein niedriger war, als bei niedrigen Passagezahlen. Auch die Aufreinigung des Radioimmunkonjugats mit Hilfe der PD-10 Säule beeinflusste die Bindungsrate negativ.

Mit Passagezahl 1 (erste Passage nach Eingang im Labor) und ohne PD-10 Reinigung konnte eine Bindungsrate von 36,8% ermittelt werden. Im Gegensatz dazu ergab sich bei einer Passagezahl >20 mit PD-10 Reinigung eine Bindungsrate von 4,1%.

Vorstellbar ist, dass die vergleichsweise niedrigeren Bindungsraten durch zunehmende Maskierung des PankoMab Epitops bei höherer Passagezahl verursacht werden.

Wie von Cao und Karstens (2001) beschrieben, kann die Maskierung des PankoMab Epitops durch Glycane unterschiedlich stark ausgeprägt sein.

Die Verringerung der Bindungsraten nach Aufreinigung des Radioimmunkonjugats mit Hilfe einer PD-10 Säule lässt die Vermutung zu, dass dieses Reinigungsverfahren die Bindungseigenschaften des PankoMab negativ beeinflusst.

4. Diskussion

Passagezahl	1	1	1	>20	>20	10-20
PD-10 Reinigung	ja	ja	nein	ja	nein	nein
Bindung (%)	19,5	15,2	36,8	4,1	11,2	17,3

Tab. 10. :

Bindung (%) des ^{213}Bi -PankoMab an OV-MZ-6-WT Zellen (1×10^6) in Abhängigkeit von der Passagezahl und erfolgter Reinigung über die PD-10 Gelfiltrationssäule. Passagezahlnummer Nr. 1 entspricht der Passagezahl bei Eingang im Labor.

Scatchard-Assay

Die Quantifizierung der Antigenbindungsstellen von OV-MZ-6-WT sowie die Ermittlung der Affinität des PankoMab zu OV-MZ-6WT Zellen wurden mittels Scatchard Test durchgeführt. Dazu wurden jeweils 1×10^6 Zellen mit unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen inkubiert und die Antigen-Antikörperbindung nach 20 min. ermittelt. Die Anzahl der Antigenbindungsstellen pro Zelle erfolgt durch Darstellung der einzelnen Messwerte in einem Koordinatensystem. Die dargestellten Punkte sollten durch eine Gerade verbunden werden, da dies in der Praxis aber unmöglich ist, wurde mit Hilfe der Einzelpunkte eine Trendlinie bestimmt. Durch Bestimmung der Steigung der Trendlinie lässt sich der Schnittpunkt mit der X-Achse errechnen. Mit Hilfe des Wertes dieses Schnittpunktes kann die Anzahl der Antigenbindungsstellen pro Zelle errechnet werden.

4. Diskussion

Der Zusammenhang zwischen Konzentration des Antikörpers, der Anzahl der Antigene und der Affinität lässt sich in folgender Gleichung ausdrücken:

$$K_a = \frac{[Ag - Ab]_{\text{mol/l}}}{[Ag]_{\text{mol/l}} \times [Ab]_{\text{mol/l}}}$$

[Ag] Antigenkonzentration, [Ab] Antikörperkonzentration, [Ag-Ab] Konzentration Ag/Ab Komplex, K_a Affinitätskonstante

Die Affinität ist ein Maß für die Bindungsstärke zwischen den Bindungspartnern, also des Antikörpers und dem Antigen. Sie kann entweder als Assoziationskonstante K_a oder als Dissoziationskonstante K_d dargestellt werden, wobei gilt, je stärker die Bindung ist, desto höher ist K_a und desto niedriger ist K_d . Die Affinität wird bestimmt durch die Summe aller anziehenden und abstoßenden Kräfte, die zwischen Antikörper und Antigen wirken. Vereinfacht gesagt, erhöht sich die Affinität eines Antikörpers, wenn er sehr spezifisch gegen das Antigen gerichtet ist. K_a erreicht eine Größenordnung zw. 10^4 - 10^{12} , ist K_a kleiner als 10^4 , ist davon auszugehen, dass ein Antikörper für ein bestimmtes Antigen ineffektiv ist. Wenn sich K_a im Bereich von 10^{12} befindet, bindet der Antikörper sehr stark und effektiv an das Antigen. Für die OV-MZ-6-WT Zellen konnten Affinitätskonstanten zwischen 1×10^6 und 8×10^6 ermittelt werden. Danielczyk et al. (2006) ermittelte mittels Scatchard Assays an ZR-75-1, MCF-7, T-47D und NM-D4 Zellen Affinitätskonstanten zwischen $0,91 \times 10^8$ und 3×10^8 .

Für die OV-MZ-6-WT Zellen konnten zwischen 52.800 und 94.400 MUC1 Moleküle, d.h. PankoMab Bindungsstellen pro Zelle ermittelt werden. Seidenschwang (2006) ermittelte mittels Scatchard Tests an HSC45-M2 Zellen zwischen 16.000 und 120.000 E-Cadherin Moleküle pro Zellen. Miederer (2003) stellte an MDAΔ 9 Zellen zwischen 40.000 und 60.000 E-Cadherin Moleküle fest. Die Anzahl der Antigenbindungsstellen für PankoMab an OV-MZ-6-WT Zellen liegen im Vergleich zu anderen Zelllinien und anderen Antikörpern in einem ähnlichen Bereich.

Mit Hilfe der Scatchard Tests konnte auch gezeigt werden, dass die Anzahl der PankoMab Bindungsstellen mit zunehmender Zellpassagezahl abnimmt. Ließen sich bei niedrigen Passagezahlen (bis fünf Passagen nach Eingang im Labor) Antigenkörperbindungsstellen der Größenordnung 93.000 (Mittelwert) ermitteln, konnte nach weiteren Passagen erst ein Rückgang der Antigenbindungsstellen auf 52.000 bis zu einem vollständigen Verlust der Bindung beobachtet werden. Dies könnte durch die von Bara et al. (1992, 1993) beschriebene Maskierung des MUC1 Antigens durch Fucose bedingt sein, da auch bei den OV-MZ-6-WT Zellen, wie oben beschrieben, auf eine Vorbehandlung mit α -Fucosidase bzw. PO verzichtet wurde. Cao und Karstens (1998) beschreiben eine teilweise Maskierung des MUC1 Antigens, dies könnte zu den unterschiedlichen Ergebnissen in den Scatchard Tests führen. Anscheinend wird das MUC1 Antigen mit zunehmender Passagezahl maskiert und deshalb kann der PankoMab nicht mehr an alle potentiellen Antigenbindungsstellen binden.

Die mit Scatchard Tests ermittelten Daten sollten aber im Allgemeinen auch kritisch betrachtet werden, Yuryev beschreibt die häufigsten Probleme beim Scatchard, die die Exaktheit der Ergebnisse beeinflussen:

1. Probleme bei der graphischen Auswertung wie z.B durch große Abweichung der einzelnen Datenpunkte und eine damit verbundene verfälschte Trendlinie, mit der ein verfälschter Schnittpunkt mit der X-Achse berechnet wird. Da dieser den Ausgangspunkt der Berechnung der Moleküle pro Zelle darstellt, ist die daraus resultierende Berechnung natürlich fehlerhaft.
2. Die Häufung einzelner Datenpunkte nahe der Y-Achse. Diese gemessenen Werte unterliegen, da sie unter Verwendung sehr kleiner MAK-Konzentrationen im Bereich von 5ng/ml zustande gekommen sind, einer umso größeren Fehlerwahrscheinlichkeit. Des Weiteren lässt sich auch hier nur eine insuffiziente Trendlinie mit fehlerhaften Werten auf der X-Achse anlegen.
3. Auch werden bei der Messung und somit bei der Erfassung der Daten, auf die die gesamte Auswertung aufbaut, oft Hintergrundstrahlung mit erfasst, die die Ergebnisse nachhaltig beeinflusst.

Klonogener Assay

Der Tod einer Zelle kann durch Apoptose und durch Nekrose eintreten. Bei Apoptose, dem sogenannten programmierten Zelltod, zerstört sich die Zelle durch Aktivierung von Proteasen und Nukleasen selbst. Während eine Korrelation zwischen γ -Bestrahlung von Zellen und Eintritt der Apoptose nachgewiesen werden konnte (Akimoto et al., 1999), ist die Apoptoseinduktion bei Bestrahlung mit α -Partikeln, wie im Fall von ^{213}Bi widersprüchlich, Seidl et al. (2005) stellte in einer Studie, die den Zelltod von HSC45-M2 Zellen nach Inkubation mit ^{213}Bi -d9Mab untersuchte, fest, dass die Apoptoseinduktion in diesem Fall keine Rolle spielt. Bei verschiedenen anderen Zelllinien hingegen, wie den Lymphomzellen EL-4, den Prostatazellen PC 3 und isolierten Lymphozyten von Leukämiepatienten konnte eine Apoptoseinduktion nachgewiesen werden (Macklis et al., 1992, Li et al., 2002, Vandebuckle et al., 2003). Ob eine Tumorzelle nach Bestrahlung mit α -Partikeln durch Apoptose oder durch Nekrose zu Grunde geht, scheint also von der verwendeten Tumorzelllinie abzuhängen (Seidl et al., 2005, Pouget et al., 2001, Abend et al., 2003). Zu den OV-MZ-6-WT Zellen, die in dieser Studie untersucht wurden, liegen in Bezug auf Apoptoseinduktion bzw. Nekrose nach Behandlung mit ^{213}Bi -Radioimmunkonjugaten keine Daten vor.

Miederer (2003) stellte fest, dass die Nekrose der Zellen, die durch Behandlung mit ^{213}Bi -Radioimmunkonjugaten verursacht wird, seine primäre Ursache in einer passiven Schädigung der DNA im Zellkern der Tumorzelle hat. Es konnten nach Inkubation von MDA-MB 435/S Zellen mit ^{213}Bi -6H8 bei einer Aktivitätskonzentration von 740 kBq/ml in 50% der Zellen Chromosomenaberrationen festgestellt werden.

Die klonogenen Tests dienen zur Ermittlung der spezifischen Zytotoxizität der ^{213}Bi -PankoMab Radioimmunkonjugate im Vergleich zu den unspezifischen ^{213}Bi -BSA Konjugaten in Abhängigkeit von der Aktivitätskonzentration. Die Zytotoxizität wurde an HSC45-M2 Zellen sowie an OV-MZ-6-WT Zellen untersucht.

Da ^{213}Bi -PankoMab spezifisch an MUC1 exprimierende Zellen bindet, war zu erwarten, dass die durch die spezifischen Radioimmunkonjugate hervorgerufenen Schäden stärker sind als die durch ^{213}Bi -BSA hervorgerufenen.

Des Weiteren sollten OV-MZ-6-WT Zellen durch ^{213}Bi -PankoMab Radioimmunkonjugate stärker geschädigt werden, als die HSC45-M2 Zellen, da OV-MZ-6-WT

Zellen im Mittel 93.000 Antigenbindungsstellen aufweisen, wohingegen bei HSC45-M2 Zellen keine Antigenbindungsstellen ermittelt werden konnten.

Für die entsprechenden klonogenen Tests wurden nur OV-MZ-6-WT Zellen einer niedrigen Passagezahl mit nachgewiesener Antikörper-Antigenbindung verwendet.

Es konnte sowohl für die OV-MZ-6-WT Zellen als auch für die HSC45-M2 Zellen eine zytotoxische Wirkung der ^{213}Bi - PankoMab Radioimmunkonjugate bei Aktivitäten zw. 18,5 kBq/ml - 1850 kBq/ml nachgewiesen werden.

Die Auswertung der klonogenen Tests erfolgte standardisiert durch mikroskopische Auszählung der Zellklone, die sich nach einer Inkubationszeit von 10 d gebildet hatten. Ein direkter Vergleich des Überlebens der Zellen nach Beimpfung mit ^{213}Bi -PankoMab mit anderen Studien ist leider nicht möglich, da im Moment noch keine anderen wissenschaftlichen Arbeiten existieren, die sich mit der Zytotoxizität von ^{213}Bi -PankoMab Radioimmunkonjugaten beschäftigen. Indirekt kann man die in dieser Studie gewonnenen Daten, den Daten, die bezüglich der Zytotoxizität von ^{213}Bi -Radioimmunkonjugaten an anderen Tumorzelllinien und unter Verwendung anderer Antikörper ermittelt wurden, gegenüberstellen. Seidenschwang (2006) untersuchte das zelluläre Überleben unter anderem an den Zelllinien MDA WT/ Δ 9, L929 WT/ Δ 9 sowie HSC45-M2. Als Antikörper wurden spezifische anti-d9-E-Cadherin Antikörper sowie anti-d8-E-Cadherin Antikörper verwendet. Das Radionuklid war wie in dieser Studie ^{213}Bi . Abbas Rizvi et al. (2002) untersuchte die Zytotoxizität von ^{213}Bi -anti-CD33-Konjugaten an CD33 positiven HL 60 Zellen. Ranson et al. (2002) ermittelt die Zytotoxizität von ^{213}Bi -markierten Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 2 an den Mammakarzinomzelllinien MDA MB-231 und MCF-7. Neben der Verwendung von anderen Antikörpern und Zelllinien ergibt sich das Problem, dass in den Studien die Aktivitäten nicht pro ml, sondern nur in kBq angegeben werden, was einen Vergleich der Ergebnisse komplett unmöglich macht. In dieser Studie wurde die Aktivität immer in 1ml verabreicht und wird deshalb auch immer in kBq/ml angegeben. Desweiteren wird in anderen Studien oftmals das zelluläre Überleben mit Hilfe von XTT-Assays und ^3H -Thimidininkorporierung quantifiziert.

Zytotoxischer Effekt von ^{213}Bi -PankoMab und ^{213}Bi -BSA

Die unspezifische Wirkung von ^{213}Bi -Radioimmunkonjugaten konnte anhand der mit ^{213}Bi -BSA inkubierten klonogenen Assays gezeigt werden. Mit Erhöhung der Aktivitätskonzentration konnten mehr Zellen geschädigt werden, es liegt also eine indirekte Beziehung zw. der eingesetzten Aktivität und dem klonogenem Überleben vor. Da BSA nicht an Tumorzellen bindet, ist die Reduktion des klonogenen Überlebens nahezu ausschließlich auf den Crossfireeffekt zurückzuführen (Seidl et al. 2005) In dieser Versuchsreihe konnte eine Reduktion des klonogenen Überlebens schon mit 18,5 kBq/ml auf 85,5% (OV-MZ-6-WT) bzw. auf 94,4% (HSC45-M2) ermittelt werden. Die Reduktion des klonogenen Überlebens stellt sich als indirekt proportional zur verwendeten Aktivität dar und nimmt mit steigender Aktivität zu.

Im Vergleich hierzu sollte nun die spezifische zytotoxische Wirkung des ^{213}Bi -PankoMab gezeigt werden. Nach Inkubation mit ^{213}Bi -PankoMab der Aktivität 18,5 kBq/ml zeigte sich eine Reduktion des klonogenen Überlebens auf 57,2% (OV-MZ-6-WT) und auf 88% (HSC45-M2). Diese Reduktion lässt eine spezifische zytotoxische Wirkung des ^{213}Bi -PankoMab an den OV-MZ-6-WT Zellen vermuten. Besonders deutlich wird die Reduktion des klonogenen Überlebens bei höheren Aktivitäten, das klonogene Überleben der OV-MZ-6-WT Zellen wurde mit 148kBq/ml ^{213}Bi -PankoMab auf 9,4% bei ^{213}Bi -BSA dagegen nur auf 43,1% reduziert. Das klonogene Überleben der HSC45-M2 Zellen wurde bei Inkubation mit 148kBq/ml ^{213}Bi -PankoMab auf 50% bei ^{213}Bi -BSA dagegen nur auf 67,5% reduziert.

Die stärkere Reduktion des klonogenen Überlebens durch ^{213}Bi -PankoMab im Vergleich zu ^{213}Bi -BSA, sowie die stärkere Reduktion des klonogenen Überlebens der OV-MZ-6-WT Zellen gegenüber den HSC45-M2 Zellen konnte bei allen verwendeten Aktivitäten gezeigt werden: Bei Inkubation von 74 kBq/ml, 277 kBq/ml, 740 kBq/ml ^{213}Bi -PankoMab reduzierte sich das klonogene Überleben der OV-MZ-6-WT Zellen auf 49,9%, 0%, 0% und das der HSC45-M2 Zellen auf 65%, 25%, 0%. Bei Inkubation von ^{213}Bi -BSA derselben Aktivitäten auf 59,6%, 17,1%, 0,5% (OV-MZ-6-WT) und 72,4%, 37,3%, 0% (HSC45-M2).

Für alle Zellen, die mit ^{213}Bi -PankoMab inkubiert wurden, wurden die spezifische Aktivität, das Antikörper/ Antigenverhältnis (nur bei OV-MZ-6-WT) und das Verhältnis zw. ^{213}Bi -Molekülen und eingesetztem MAK berechnet:

Bei Inkubation mit 740 kBq/ml ^{213}Bi -PankoMab konnte eine spezifische Aktivität von 933 MBq/mg MAK errechnet werden, d.h. 1 MAK von 1103 war mit ^{213}Bi markiert. Das MAK/AG-Verhältnis betrug $6,9 \times 10^5$. Bei Inkubation mit 278 kBq/ml ^{213}Bi -PankoMab konnte eine spezifische Aktivität von 250 MBq/mg MAK errechnet werden, d.h. 1 MAK von 4000 war mit ^{213}Bi markiert. Das MAK/AG-Verhältnis betrug $9,5 \times 10^5$. Bei Inkubation mit 148 kBq/ml konnte eine spezifische Aktivität 341 MBq/mg MAK errechnet werden, d.h. 1 MAK von 2700 war mit ^{213}Bi markiert. Das MAK/AG-Verhältnis betrug $3,4 \times 10^5$. Bei Inkubation mit 74 kBq/ml ^{213}Bi -PankoMab konnte eine spezifische Aktivität von 220 MBq/mg MAK errechnet werden, d.h. 1 MAK von 4137 war mit ^{213}Bi markiert. Das MAK/AG-Verhältnis betrug $2,5 \times 10^5$. Bei Inkubation von 18,5 kBq/ml ^{213}Bi -PankoMab wurde eine spezifische Aktivität von 219 MBq/mg MAK berechnet, d.h. 1 MAK von 4324 war mit ^{213}Bi markiert. Das MAK/AG-Verhältnis war $6,9 \times 10^4$.

Eine spezifische zytotoxische Wirkung von ^{213}Bi -PankoMab konnte im Vergleich zu ^{213}Bi -BSA an OV-MZ-6-WT Zellen nachgewiesen werden. Das klonogene Überleben von OV-MZ-6-WT Zellen wird im Vergleich zum klonogenem Überleben von HSC45-M2 durch ^{213}Bi -PankoMab stärker reduziert. Dies kann durch die in den Antikörperbindungstests nachgewiesenen höheren Bindungsraten von ^{213}Bi -PankoMab an OV-MZ-6-WT Zellen zustande kommen.

Ob die beiden verwendeten Zelllinien Unterschiede in der Strahlensensibilität aufweisen, ist nicht bekannt. Des Weiteren konnte im direkten Vergleich von klonogenem Überleben von HSC45-M2 Zellen unter Verwendung von ^{213}Bi -anti-d9-E-Cadherin bzw. ^{213}Bi -anti-d8-E-Cadherin gezeigt werden, dass HSC45-M2 Zellen auch bei Verwendung eines nicht spezifischen Antikörpers eine Reduktion im klonogenen Überleben aufwiesen (Seidenschwang, 2006). In gewissem Sinne konnte dies in dieser Studie auch gezeigt werden, da die mit ^{213}Bi -PankoMab inkubierten Zellen eine stärkere Reduktion des klonogenen Überlebens aufwiesen, als die mit ^{213}Bi -BSA inkubierten HSC45-M2 Zellen, obwohl in den Scatchard Tests keine Antigenbindung ermittelt werden konnte und die Bindungsraten in einem im Vergleich zu den OV-MZ-6-WT Zellen sehr geringen Bereich lagen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich aus den in dieser Studie durchgeführten Zytotoxizitätstests die Vermutung einer spezifischen Wirkung des ^{213}Bi -PankoMab Konjugats äußern lässt, diese aber nicht eindeutig zu beweisen ist.

Biodistribution von ^{111}In -PankoMab

Für einen potentiellen klinischen Einsatz des ^{213}Bi -PankoMab ist neben der zytotoxischen Wirkung auch die Kinetik des ^{213}Bi -Radioimmunkonjugats im Organismus entscheidend. Die Biodistribution gibt die Anreicherung des Radioimmunkonjugats in den verschiedenen Geweben und im Tumor eines Versuchstieres wieder.

Huber (2003) untersuchte die Biodistribution von ^{213}Bi -d9MAk nach i.p Injektion in Nacktmäusen, die eine Peritonealkarzinose mit HSC45-M2 Zellen entwickelt haben, unterteilt in Mäuse mit/ ohne Aszites. In der Studie konnte gezeigt werden, dass bei spezifischen RIK der Tumor/ Blut-Quotient über 1 und bei unspezifischen unter 1 lag.

Auch wenn in dieser Studie OV-MZ-6-WT Zellen und ^{213}Bi -PankoMab verwendet wurden, repräsentiert der Tumor/Blut-Quotient die Gegenüberstellung von zu erwartender therapeutischer Effizienz und Toxizität. Eine weitere entscheidende Größe zur Beurteilung der Verteilung der Aktivität ist der prozentuale Anteil des injizierten Radioimmunkonjugats pro Gramm Gewebe.

Der höchste Tumor/Blut-Quotient konnte 6 Wochen nach Inokulation von OV-MZ-6-WT Zellen und 1 h nach Injektion von ^{111}In -PankoMab ermittelt werden. Dieser betrug 3,7 und errechnete sich aus den Mittelwerten der Messwerte der kleinen Tumorknötchen (kleine Tumorknötchen 6,5 +/- 2,8% injizierte Aktivität/g/ Blut 1,8 +/- 0,1% injizierte Aktivität/g). 3 h nach Injektion des ^{111}In -PankoMab wurde wider Erwarten ein Abfall des Tumor/Blut-Quotienten auf 3,1 ermittelt (kleine Tumorknötchen 7,3 +/- 1,5% injizierte Aktivität/g/ Blut 2,3 +/- 0,54% injizierte Aktivität/g). Dies deutet höchstwahrscheinlich auf eine Abspaltung des ^{213}Bi vom PankoMab hin. Diese Beobachtung spielt aber für den Einsatz von ^{213}Bi -PankoMab eine eher untergeordnete Rolle, da ^{213}Bi mit 46 min eine relativ kurze HWZ aufweist und die zytotoxische Wirkung deshalb vor allem innerhalb der ersten Stunde zu erwarten ist. Nach 3 h also ca. 4 Halbwertszeiten sind nur noch 6% der injizierten Aktivitäten vorhanden.

Der errechnete Tumor/Blut-Quotient für die großen Tumoren betrug 1 h nach Injektion von ^{213}Bi -PankoMab 3,3 (großer Tumor 5,8 +/- 3,6% injizierte Aktivität/g) und fiel 3 h nach Injektion auf 1,7 (großer Tumor 2,5 +/- 1,63% injizierte Aktivität/g) ab. In Prozent ausgedrückt ließ sich also ein Abfall des Tumor/Blut-Quotienten für

die kleinen Tumorknötchen um ca. 16% und für die großen Tumorknötchen um ca. 49% ermitteln. Auch die Tumor/Blut-Quotienten der tumorinfiltrierten Organe, wie Peritoneum und Pankreas, lagen über 1. Die Aktivitätskonzentration des ^{213}Bi -PankoMab in tumorinfiltrierten Gewebe bzw. im Tumor selbst konnte somit nachgewiesen werden.

Eine Retention des Radioimmunkonjugats nach i.p. Injektion bei bestehendem Aszites, wie durch Huber (2003) im Mausmodell gezeigt werden konnte und durch Hnatowich et al. (1988) in einer Phase I Studie nach i.p. Injektion von ^{90}Y markiertem Antikörper gegen Ovarialkarzinom gezeigt werden konnte, konnte auch für ^{111}In -PankoMab nachgewiesen werden. Die Blutwerte der Versuchstiere mit Aszites und Peritonealkarzinose sind mit 1,8 +/- 0,9% injizierte Aktivität/g nach 1 h und 2,3 +/- 0,5% injizierte Aktivität/g nach 3 h deutlich niedriger als die der Kontrollgruppe (3,7 +/- 2,3% injizierte Aktivität/g nach 1 h und 12 +/- 2,28% injizierte Aktivität/g nach 3 h).

In einer anderen Versuchreihe, die die Frühphase der peritonealen Streuung beim Menschen nachstellen sollte, wurden 24 h nach Injektion von jeweils 1×10^7 HSC45-M2 und OV-MZ-6-WT Zellen ^{213}Bi -PankoMab injiziert und die Verteilung nach 1 h und nach 3 h ermittelt.

Besonders auffällig waren die hohen Aktivitätskonzentrationen von Peritoneum (21,5% injizierte Aktivität/g) 1 h und 3 h (11,3% injizierte Aktivität/g) nach Injektion von ^{111}In -PankoMab bei Inokulation von OV-MZ-6-WT Zellen. Analog dazu verhielten sich die gemessenen Aktivitätskonzentrationen von Peritoneum bei HSC45-M2 Zellinokulation, 1 h (23,6% injizierte Aktivität/g) und 3 h (12,9% injizierte Aktivität/g) nach ^{111}In -PankoMab Injektion.

Des Weiteren wurden hohe Aktivitätskonzentrationen im Pankreas 1 h (23,6% injizierte Aktivität/g) und 3 h (16% injizierte Aktivität/g) nach ^{111}In -PankoMab Injektion bei OV-MZ-6-WT Zellinokulation gemessen. Auch nach HSC45-M2 Zellinokulation konnten im Pankreas hohe Aktivitätskonzentration 1 h (20% injizierte Aktivität/g) und 3 h (11% injizierte Aktivität/g) nach ^{111}In -PankoMab Injektion gemessen werden.

Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass sich die Tumorzellen schon in der Frühphase im Bereich des Peritoneums und des Pankreas anlagern. Dies entspricht einer Studie von Senekowitsch-Schmidtke et al. (2001), in der die Entwicklung einer

4. Diskussion

Peritonealkarzinose nach i.p. Inokulation von 1×10^7 MDA-MB-435S Zellen beschrieben wurde.

5. Zusammenfassung

Mucine gehören zu einer Gruppe von Glykoproteine, die in hohem Maß glykosiliert sind und sich in sekretorische und membrangebundene Typen einteilen lassen. MUC1 gehört zu den membrangebundenen Typen und wird vor allem auf glandulären Epithelzellen exprimiert. Wenn eine Zelle, die MUC1 an der Oberfläche trägt, maligne entartet, erhöht sich die Expression von MUC1 dramatisch. Der extrazelluläre Anteil von MUC1 setzt sich aus einer variablen Anzahl von Tandemwiederholungen zusammen, wobei jede Tandemwiederholung aus 20 Aminosäuren besteht, deren Glykosilierung variabel ausgeprägt ist. MUC1 kann an der Oberfläche von verschiedensten Tumoren wie z.B. Ovarialkarzinomen, Mammakarzinomen und Karzinomen des Gastrointestinaltrakts nachgewiesen werden.

Ziel dieser Studie war die Evaluierung des möglichen Einsatzes des PankoMab im Rahmen einer α -Radioimmuntherapie mit ^{213}Bi . Dazu wurde die Zytotoxizität des ^{213}Bi -PankoMab Radioimmunkonjugats in vitro an HSC45-M2 Magen- und OV-MZ-6-WT Ovarialkarzinomzellen sowie die Biodistribution des ^{213}Bi -PankoMab in Nacktmäusen mit und ohne intraperitonealem Tumor untersucht.

Die Bindung von PankoMab wurde mittels Antikörperbindungstests an Magen-(HSC45-M2) und Ovarialkarzinomzellen (OV-MZ-6-WT) untersucht. Dazu wurden jeweils 3×10^6 Zellen mit ^{213}Bi -PankoMab für 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Auftrennung in Pellet und Überstand erfolgte die Aktivitätsbestimmung. Die Bindung des PankoMab wurde auch mittels Immunfluoreszenz untersucht. Die Quantifizierung der PankoMab-Antigenbindungsstellen wurde für die HSC45-M2 und die OV-MZ-6-WT Zellen mittels Scatchardtests durchgeführt. Die Zytotoxizität von ^{213}Bi -PankoMab wurde mittels klonogener Tests untersucht, dazu wurden 50 bis 100 HSC45-M2 Zellen bzw. OV-MZ-6-WT Zellen in 24 Well Platten ausgesät und nach 24 h mit ^{213}Bi -PankoMab verschiedener Aktivitäten (0-1850 kBq) behandelt. Um die Biodistribution des Radioimmunkonjugats zu untersuchen, wurde Nacktmäusen von Typ Swiss nu/ nu 1×10^7 HSC45-M2 bzw. OV-MZ-6WT Zellen inokuliert, diesen nach 24 h, 3 Wochen und 6 Wochen ^{213}Bi - bzw. ^{111}In -PankoMab i.p. injiziert und die Aktivitätskonzentrationen in verschiedenen Organen nach 1 h und 3 h bestimmt.

Die Bindung des PankoMab an HSC45-M2 und OV-MZ-6-WT Zellen wurde durch Immunfluoreszenz, Scatchard- und Antikörperbindungstests nachgewiesen und quantifiziert. Für die OV-MZ-6-WT Zellen konnte eine Bindung zwischen 4,1% und 36,8% ermittelt werden. HSC45-M2 Zellen zeigten Bindungen zwischen 2,4% und 7,6%. In der Immunfluoreszenz stellten sich HSC45-M2 Zellen sowie OV-MZ-6-WT Zellen positiv dar. Durch die Scatchard Tests konnte für die OV-MZ-6-WT Zellen zwischen 52.800 und 94.400 MUC1 Moleküle, d.h. PankoMab Bindungsstellen pro Zelle, ermittelt werden.

Die Ergebnisse der Antikörperbindungstests und der Scatchard Tests lassen den Rückschluss zu, dass die Anzahl der vom PankoMab erkannten Antigene auf der Zelloberfläche mit steigender Passagezahl abnimmt.

In den Zytotoxizitätstests konnte gezeigt werden, dass ^{213}Bi -PankoMab das klonogene Überleben von OV-MZ-6-WT Zellen im Vergleich zu ^{213}Bi -BSA stärker reduziert. Die Reduktion nahm mit steigenden Konzentrationen (18,5-1850KBq) zu.

Sechs Wochen nach Tumorzellinokulation (OV-MZ-6-WT) konnte eine erhöhte Aktivitätskonzentration von ^{111}In -PankoMab 1 h nach i. p. Injektion in Tumorgewebe sowie tumorinfiltriertem Gewebe nachgewiesen werden. Nach 3 h konnte im Tumor bzw. tumorinfiltriertem Gewebe ein Rückgang der Aktivitätskonzentration nachgewiesen werden, was auf eine Dissoziation von PankoMab und ^{213}Bi hindeutet.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass in dieser Studie eine spezifische in vitro Toxizität von ^{213}Bi -PankoMab an OV-MZ-6-WT Zellen gezeigt werden konnte und eine tumorspezifische Verteilung des PankoMab Radioimmunkonjugats im Organismus vorliegt. Aus diesen Gründen könnte die ^{213}Bi -PankoMab Radioimmuntherapie eine viel versprechende Option zur Behandlung des Ovarialkarzinoms sein.

6. Literaturverzeichnis

- Abbas Rizvi S.M., Henniker A.J., Goozee G., und Allen B. J.; In vitro testing of the leukaemia monoclonal antibody WM-53 labeled with alpha and beta emitting radioisotopes: Leuk Res; 26: 37-43; 2002
- Abend M, Reasons to reconsider the significance of apoptosis for cancer therapy: Int J Radiat Biol; 79:927-41; 2003
- Akimoto T, Seong N, Hunter R, Buchmiller L, Mason K and Milas L; Association of increased radiocurability of murine carcinomas with low constitutive of p21 (WAF1/CIP1) protein: Int J Radiat Oncol Biol Phys 44(2): 413-9; 1999
- Apostolidis C, Carlos-Marquez R, Janssens W, Molinet R, Nukula T, Quandi A. ; Cancer treatment using Bi-213 and Ac-225 in radioimmunotherapy: Nuclear News; 29-33; 2001
- Baldus SE., Engelmann K., Hanisch FG ; MUC1 and the MUCs: a family of human mucins with impact in cancer biology. Crit Rev Clin Lab Sci; 41:189-231; 2004
- Bara J, C. Decaens, Loridon-Rosa B, Oriol R.; Immunohistological characterization of Mucin epitops by pre-treatment of gastro-intestinal sections with periodic acid: J Immunol Meth 149:105-113; 1992
- Bara J, Imberty A, Perez S, Imai K, Yachi A, Oriol R.; A Fucose residue can mask the MUC-1 epitopes in normal and cancerous gastric mucosae: Int J Cancer 54-3:607-613 ;1993

- Becker KF, Kremmer E, Eulitz M, Schulz S, Mages J, Handschuh G, Wheelock MJ, Cleton-Jansen AM, Hoefler H, Becker I. ;Functional allelic loss detected at the protein level in archival human tumours using allele-specific E-cadherin monoclonal antibodies.; *Pathol.*;197:567-74; 2002
- Bennet JJ, Gonen M, D'Angelica M., Jaques DP, Brennan MF, Coit DG; Is detection of asymptomatic recurrence after curative resection associated with improved survival in patients with gastric cancer, *J Am Coll Surg.*;201(4):503-10; 2005
- Böcker W, Denk H, Heitz Ph U. „Pathologie“ Urban und Fischer München-Jena 2.Auflage; 648-50; 2000
- Boll RA, Mirzadeh S, Kennel SJ, DePaoli DW, Wbb OF.; Bi213 for alpha-particle mediated radioimmunotherapy; *J Labelled Compds Radiopharm.*; 40:341; 1997
- Cao Y, Karstens U, Hilgers J.; Immunohistochemical Characterisation of a Panel of 56 Antibodies with normal Human Small Intestine, Colon and Breast Tissue; *Tumor Biol* ;19(1):88-99; 1998
- Cao Y, Karstens U.Binding Patterns of 51 monoclonal antibodies to peptide and carbohydrate epitopes of the epithelial Mucin (MUC1) on tissue sections of adenolymphomas of the parotid: role of epitope masking by glycans; *Histochem Cell Biol* ;115:349-356; 2001
- Cao Y., Blohm D, Ghadimi M, Stosiek P., Pei-Xiang X, Karstens U, Mucins (MUC1 and MUC3) of Gastrointestinal and Breast Epithelia Reveal Different and Heterogeneous Tumor-associated Aberrations in Glycosylation; *J Histochem Cytochem*; 45(11):1547-1557; 1997

- Couturier O, Supiot S, Degraef-Mougin M, Faivre-Chauvet A, Carlier T, Chatal JF, Davodeau F, Cherel M; Cancer radioimmunotherapy with alpha-emitting nuclides; *Eur J Nucl Med Mol Imaging*; 32(5):601-14; 2005
- D'Angelica M MD, Mithat gonen PhD, Brennan M, Turnbull A., Bains M, Karpeh M., Patterns of Initial Recurrence in completely Resected Gastric Adenocarcinoma, *Ann Surg*; 240(5):808-16; 2004
- Devine PL, McKenzie IFC Mucins: structure, function and association with malignancy; *BioEssays*; 14: 619-625; 1992
- Fischer K.; Experimentelle Studien zur lokoregionalen Radioimmuntherapie disseminierter Tumorausbreitung am Beispiel des diffusen Magenkarzinoms mit einem tumorspezifischen, an den alpha-emitter Bi-213 gekoppelten Antikörper; Diss. Tierärztliche Fakultät LMU-München.2001
- Girling A, BartkovaJ, Burchell J, Gendler S, Gillett C, Taylor-Papadimitriou J; A core protein epitope of the polymorphic epithelial Mucin detected by the monoclonal antibody SM -3 is selectively exposed in a range of primary carcinomas; *Int J Cancer* 43:1072-1076; 1989
- Heiss MM, Strohle MA, Jager M, Kimming R, Burges A, Schoberth A, Jauch KW, Schildberg FW, Lindhofer H, Immunotherapy of malignant ascites with trifunctional antibodies; *Int J Cancer*, 10;117(3):435-43; 2005
- Hnatowich DJ, chinol M,Siebecker DA, GionetM, Griffin T, Daherty PW,Hunter R, Kase KR; Patients biodistribution of intraperitoneally administered ⁹⁰Y labled antibody; *J Nucl Med*; 29:1428-35; 1988
- Ho SB, Niehans GA, Lyfttugt C, Yan PS, Cherwitz DL, Gum ET, Dahiya R, Kim YS; Heterogenieity of Mucin gene expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res*; 53:641-651; 1993

- Huber R, Seidl C, Schmid E, Seidenschwang S, Becker K-F, Schumacher C; Locoregional α -radioimmunotherapy of intraperitoneal tumor cell dissemination using a tumor specific monoclonal antibody; Clin Cancer Res; 9:3922-28; 2003
- Huber R.; Bewertung der lokoregionalen Radioimmuntherapie disseminierter Tumorzellen des diffusen Magenkarzinoms mit einem ^{213}Bi gekoppelten tumorspezifischen Antikörper im Mausmodell, Dissertation der Tierärztlichen Fakultät der LMU München; 2003
- Huneke RB, Pippin CG, Squire RA, Brechbiel MW, Gansow OA, Strand M. Effektive alpha-particle-mediated radioimmunotherapy of murine leukaemia; Cancer Res; 52:5818-20; 1992
- International Agency for Research on Cancer Monographs on Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; Hormonal Contraception and Postmenopausal Hormonal Therapy; Volume 72; Lyon, France, 1999
- Jass JR, Robertson AM; Colorectal Mucin histochemistry in health and disease: a critical review; Path Int; 44:487-504; 1994
- Jurcic J. G., Larson S.M., Sgouros G., McDevitt M.R., Finn R.D., Divgi C.R., Ballangrud A.M., Hamacher K.A., Ma D., Humm J.L., Brechbiel M.W., Molinet R., und Scheinberg D.A.; Targeted alpha particle immunotherapy for myeloid leukemia; Blood; 100:1233-1239; 2002
- Kaufmann G, Moser E, und Sauer R.; "Radiologie, Grundlagen der Radiodiagnostik, Radiotherapie und Nuklearmedizin"; Urban und Schwarzenberg; München-Wien-Baltimore; 1. Auflage; 1996
- Koudsi S., Problemkarzinom Behandlung von Frauen mit Ovarialkarzinom an der Frauenklinik im Klinikum zu Krefeld, Berlin 2003

- Li Y, Rizivi SMA, Ranson M, Allen BJ. ^{213}Bi -PAI conjugate selectively induces apoptosis in PC3 metastatic prostate cancer cell line and shows anti-cancer activity in a xenograft animal model. *Br J Cancer*; 86:1197-203; 2002
- Lordick F., Siewert JR; Recent advances in multimodal treatment for gastric cancer: a review, *Gastric Cancer.*;8(2):78-85; 2005
- Macdonald JS, Smalley SR, Benedetti J, Hundahl SA, Estes NC, Stemmermann GN, Haller DG, Ajani JA, Gunderson LL, Jessup JM, Martenson JA, Chemotherapy after surgery compared with surgery alone for adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction, *N Engl J Med.*;345(10):725-30; 2001
- Macklis RM, Lin JY, Beresford B, Atcher RW, Hines JJ, Humm JL. Cellular kinetics, dosimetry, and radiobiology of α -particle radioimmunotherapy: induction of apoptosis. *Radiat Res*; 130:220-6; 1992
- McDevitt MR, Finn RD, Sgouros G, Ma D, Scheinberg DA. An $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ generator system for therapeutic clinical applications: construction and operation. *Appl Radiat Isot.*;50:895-904; 1999
- Miederer M, In vitro Untersuchungen des zytotoxischen Effekts der alphaemittierenden Nuklide, Dissertation der Medizinischen Fakultät der TUM München, 2003
- Nikula Tk, McDevitt MR, Finn RD, Wu C, Kozak RW, Germestani K, Brechbiel MW, Curcio MJ, Pippin CG, Tiffany-Jones L, Geerlings MW Sr, Apostilidis C, Molinet R, Geerlings MW Jr, Gansow OA, Scheinberg DA.; Alpha-emitting bismuth cyclohexylbenzyl DTPA constructs of recombinant humanized anti-CD33 antibodies: pharmacokinetics, bioactivity, toxicity and chemistry. *J Nucl Med*; 40:166-76; 1999

- Patton S, Gendler SJ, Spicer AP; The epithelial Mucin MUC1, of milk, mammary gland and other tissues. *biochim Biophys Acta* 1241:407-424; 1995
- Pouget J-P, Mather SJ.; General aspects of the cellular response to low- and high-LET radiation. *Eur J Nucl Med*; 28:541-61; 2001
- Ranson M., Tian Z., Andronicos N.M., Rizvi S., und Allen B.J.; In vitro cytotoxicity of bismuth-213 (²¹³Bi)-labeled-plasminogen activator inhibitor type 2 (alpha PAI-2) on human breast cancer cells; *Breast Cancer Res. Treat.*;(71);149-159; 2002
- Robert-Koch-Institut, Berlin, Krebs in Deutschland, 5. Auflage, 2006
- Rosenberg R, Nekarda H, Bauer P, Schenck U, Hoefler H, Siewert JR; Free peritoneal tumor cells are an independent prognostic factor in curatively resected stage IB gastric carcinoma, *Br J Surg.*;93(3):325-31; 2006
- Sadehi B, Arvieux C, Glehen O, Beaujard AC, Rivoire M, Baulieux J, Fontaumard E, Faum JL, Percheron J, Peix JL, Françoise Y, Vignal J, Gilly FN; Peritoneal corcinomatosis from non-gynecologic malignancies: results of the EVOCAPE 1 multicentric prospective study; *Cancer*; 88(2):358-63; 2000
- Schering, Schering Konzern, Pressemitteilung vom 22.01.2004 : Schering erhält Zulassung für Radioimmuntherapeutikum Zevalin in Europa
- Seidenschwang S., Untersuchungen zur In-Vitro-Zytotoxizität von ²¹³Bi-Immunkonjugaten, Dissertation der Medizinischen Fakultät der TUM München, 2006

- Seidl C, Schröck H, Seidenschwang S, Beck R, Schmid E, Abend M, Cell death triggered by alpha-emitting ^{213}Bi -immunoconjugates in HSC gastric cancer cells is different from apoptotic cell death. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*; 32:274-85; 2005
- Senekowitsch-Schmidtke R, Schumacher C, Becker K-F, Nikula TK, Seidl C, Becker I, et al. Highly specific tumor binding of a ^{213}Bi -labeled monoclonal antibody against mutant E-cadherin suggests its usefulness for locoregional α - radioimmunotherapy of diffuse-type gastric cancer. *Cancer Res*; 61:2804-08; 2001
- Siewert JR, Lordick F., Ott K., Brucher BL, Rosenberg R. Curative vs palliative strategies in locoregional recurrence of gastrointestinal malignancies, *Chirurg*;77(3):227-235; 2006
- Strous GJ, Dekker J; Mucin-type glycoproteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol*; 27:57-92; 1992
- Taylor-Papadimitriou J., Burchell J., Miles D., Dalziel M.; MUC1 and Cancer; *Biochemica et Biophysica Acta* 1455:301-313, 1999
- Ursus-Nikolaus Riede, Taschenatlas der allgemeinen Pathologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart, S. 320, 1998
- Van Geel JNC, Fuger JJ, Koch L, inventors. Method for producing actinium-225 and bismuth-213.US-patent 5,335,394.1994
- Vandebuckle K, De Vos F, Offner F, Philippe J, Apostolidis C, Molinet R, et al. In vitro evaluation of ^{213}Bi -rituximab versus external gamma irradiation for the treatment of B-CLL patients: relative biological efficacy with respect to apoptosis induction and the chromosomal damage. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*;30:1357-64; 2003

- Wu M, Shen K, Lang JH, Huang HF, Pan Ly, Clinical analysis of prognostic factors for stage III ovarian epithelial carcinoma, Department of Obstetrics & Gynecology, Peking Union Medical College Hospital, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, 2005
- Yanagihara K, Ito A, Toge T, Numoto M. Antiproliferative effects of isoflavones on human cancer cell lines established from the gastrointestinal tract. *Cancer Res.* 1992; 52:3402-8
- Yuryev D. Absurd trival errors in Scatchard plot analysis, <http://www.orc.ru/~yur77/absurd.htm>, 2007-05-07, 16:15 Uhr
- Zotter S, Hageman PC, Lossnitzer A, Mooi WJ, Hilgers J Tissue and tumor distribution of human polymorphic epithelial Mucin. *Cancer Rev*; 11-12:55-101; 1998

7. Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Dr. R. Senekowitsch-Schmidtke für die Bereitstellung meines Themas und die liebevolle Unterstützung in allen Bereichen meiner Arbeit.

Herrn Dr. Christoph Seidl danke ich herzlichst für die Betreuung meiner Arbeit, die Einarbeitung im Umgang mit Zellkulturen und radioaktiven Stoffen, die konstruktive Kritik und vor allem für die geduldige Hilfestellung bei allen Problemen.

Frau Roswitha Beck möchte ich für die Hilfestellung bei den Tierexperimenten und der Einarbeitung im Umgang mit Zellkulturen danken.

Meinem Freund und Kollegen Matthias Buchhorn danke ich herzlichst für die Unterstützung und Hilfestellung bei meinen Versuchen.

Den Mitarbeitern der Forschergruppe Nuklearmedizin von Prof. Dr. Dr. R. Senekowitsch-Schmidtke, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, bin ich dankbar für ein freundschaftliches und jederzeit hilfsbereites Umfeld.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Stahn von der Firma Nemo in Berlin für die Überlassung des PankoMab für Forschungszweck und die prompte Hilfe.

Des Weiteren bedanke ich mich bei PD Dr. V. Magdolen von der klinischen Forschergruppe der Frauenklinik und Poliklinik des Klinikums Rechts der Isar der TUM für die Bereitstellung der OV-MZ-6-WT Zellen und bei den Mitarbeitern des Instituts für Pathologie für die Benützung des Fluoreszenzmikroskops.