

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN  
Nuklearmedizinische Klinik und Poliklinik  
Klinikum rechts der Isar

**Bewertung der fraktionierten lokoregionalen Radioimmuntherapie  
des diffusen Magenkarzinoms mit tumorspezifischen  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk  
in Vitro und im Mausmodell**

Stefanie Blöchl

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. Priv.-Doz. Dr. H. A. Wieder

Die Dissertation wurde am 15.07.2009 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 23.09.2009 angenommen.

*Meinen Eltern  
in Liebe und Dankbarkeit  
gewidmet*

*Freue Dich um jeden glücklichen Tag  
und trauere nicht um verlorene Tage,  
denn sie sind noch nicht verloren.*

*Hanns Blöchl*

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Epidemiologie, Ätiologie und Prognose des Magenkarzinoms.....	2
1.2	Therapie des Magenkarzinoms.....	5
1.3	Karziñoembryonales Antigen als Tumormarker beim Magenkarzinom .....	7
1.4	Radioimmuntherapie .....	9
1.4.1	Grundlagen.....	9
1.4.2	Alpha- <sup>213</sup> Bi-Radioimmuntherapie .....	13
1.4.3	<sup>213</sup> Bi-d9MAk-Radioimmuntherapie .....	17
1.4.4	Fraktionierte Radioimmuntherapie.....	19
1.4.5	Toxizität .....	21
2	Zielsetzung .....	23
3	Material und Methoden.....	24
3.1	Chemikalien, Lösungen, Zellkulturmedien .....	24
3.2	Medikamente.....	25
3.3	Verbrauchsmaterialien .....	25
3.4	Geräte.....	27
3.5	Zellen und Zellkultur.....	28
3.5.1	Humane Siegelringzellkarzinomzellen des Magens HSC45-M2 .....	28
3.5.2	Kultivierung von HSC45-M2-Zellen .....	28
3.6	Radioimmunkonjugat.....	29
3.6.1	delta-9-E-Cadherin-Antikörper .....	29
3.6.2	Radionuklid.....	31
3.6.2.1	<sup>213</sup> Bismut.....	31
3.6.2.2	<sup>213</sup> Bi-Eluierung aus dem <sup>225</sup> Ac/ <sup>213</sup> Bi-Generator und Radionuklidkonjugation des delta-9-E-Cadherin Antikörpers.....	32
3.7	In Vitro Versuche.....	34
3.7.1	Zellproliferationstests.....	34
3.7.2	CEA-Konzentration im Medium .....	35
3.7.3	Klonogener Test.....	36
3.8	In Vivo Versuche .....	37
3.8.1	Versuchstiere.....	37
3.8.1.1	Tierart .....	37
3.8.1.2	Tierhaltung.....	38
3.8.2	Modell der Peritonealkarzinose.....	38
3.8.3	Radioimmuntherapie mit <sup>213</sup> Bi-d9MAk .....	39
3.8.4	Bestimmung der CEA-Konzentration im Serum.....	41
3.8.5	Bestimmung der CEA-Konzentration im Aszites .....	42
3.8.6	Anästhesie, Euthanasie und Obduktion.....	43
3.8.7	Auswertung der Autopsiedaten .....	43
3.8.8	Histopathologische Beurteilung von Organpräparaten.....	43
3.8.8.1	Herstellung von Kryostat-Gewebeschnitten .....	43
3.8.8.2	Färbung der Präparate mit Hämatoxylin-Eosin.....	44
3.8.9	Bestimmung des Tierkörpergewichts.....	44
3.8.10	Toxizität des <sup>213</sup> Bi-d9MAk-Konjugats .....	45
3.8.10.1	Bestimmung peripherer Blutzellen im zeitlichen Verlauf.....	45
3.8.10.2	Analyse der chromosomalen Schädigung .....	46

3.8.10.3	Histologische Beurteilung der Nieren.....	47
3.11	Statistische Auswertung.....	47
4	Ergebnisse.....	49
4.1	Qualität der <sup>213</sup> Bi-Eluierung und <sup>213</sup> Bi-Koppelung von d9MAk.....	49
4.2	In Vitro Versuche.....	50
4.2.1	Proliferation der HSC45-M2-Zellen.....	50
4.2.2	CEA-Konzentrationsverlauf im Vergleich zur Zellproliferation.....	52
4.2.3	Proliferationsverhalten im klonogenen Test.....	54
4.2.3.1	<sup>213</sup> Bi-Immunkonjugat-Inkubation bei 50 Zellen pro well.....	55
4.2.3.2	<sup>213</sup> Bi-Immunkonjugat-Inkubation bei 100 Zellen pro well.....	57
4.3	In Vivo Versuche.....	59
4.3.1	Therapeutische Effizienz der einmaligen und fraktionierten Applikation des <sup>213</sup> Bi-d9MAk-Radioimmunkonjugats.....	59
4.3.1.1	Therapiebeginn einen Tag nach Zellinokulation.....	59
4.3.1.2	Therapiebeginn acht Tage nach Zellinokulation.....	62
4.3.2	CEA als Tumormarker zur Therapiekontrolle des diffusen Magenkarzinoms.....	68
4.3.2.1	CEA-Konzentrationsverlauf im Serum.....	68
4.3.2.2	CEA-Konzentrationen im Serum post mortem.....	72
4.3.2.3	CEA-Konzentration im Aszites post mortem.....	73
4.3.3	Evaluation der Autopsiebefunde, der histopathologischen Untersuchungen und des Körpergewichts bei Exitus letalis.....	74
4.3.4	Bewertung des Körpergewichtsverlaufs.....	77
4.3.5	Toxizität des <sup>213</sup> Bi-d9MAk-Konjugats.....	79
4.3.5.1	Änderung der peripheren Blutzellen.....	79
4.3.5.2	Chromosomale Schäden der Knochenmarkszellen.....	82
4.3.5.3	Histopathologische Beurteilung der Nieren.....	83
5	Diskussion.....	84
5.1	α-Radioimmuntherapie mit <sup>213</sup> Bismut.....	85
5.2	Bewertung des <sup>213</sup> Bi-d9-E-Cadherin-Konjugats in Hinblick auf die resultierende Tumorzelltoxizität bei HSC45-M2-Zellen.....	87
5.3	Effizienz der einmaligen und fraktionierten Radioimmuntherapie mit niedrigen Aktivitäten von <sup>213</sup> Bi-d9MAk.....	89
5.3.1	Analyse der HSC45-M2 Klonogenität in Vitro.....	89
5.3.2	Bewertung der einmaligen und fraktionierten Radioimmuntherapie in Vivo.....	91
5.4	CEA-Konzentration als Tumormarker bei HSC45-M2.....	97
5.5	Bewertung der Radioimmuntherapie mittels Autopsiebefunden und Körpergewichtsverläufen.....	100
5.6	Analyse der Toxizität nach einmaliger und zweimaliger <sup>213</sup> Bi-d9MAk-Applikation.....	101
5.6.1	Veränderungen des peripheren Blutbildes.....	102
5.6.2	Chromosomale Aberrationen der Knochenmarkszellen.....	106
5.6.3	<sup>213</sup> Bi-induzierte Nierenschädigung.....	108
5.7	Schlussfolgerung.....	111
6	Zusammenfassung.....	114
7	Literaturverzeichnis.....	117

## Abkürzungsverzeichnis

<sup>90</sup> Y	<sup>90</sup> Yttrium
<sup>131</sup> I	<sup>131</sup> Jod
<sup>177</sup> Lu	<sup>177</sup> Lutetium
<sup>188</sup> Rh	<sup>188</sup> Rhenium
<sup>209</sup> Bi	<sup>209</sup> Bismut
<sup>209</sup> Pb	<sup>209</sup> Blei
<sup>213</sup> Po	<sup>209</sup> Polonium
<sup>209</sup> Tl	<sup>209</sup> Thallium
<sup>212</sup> Bi	<sup>212</sup> Bismut
<sup>213</sup> Bi	<sup>213</sup> Bismut
<sup>225</sup> Ac	<sup>225</sup> Actinium
AG	Antigen
AK	Antikörper
CA19-9	Carbohydrate-Antigen 19-9
CEA	karzinoembryonales Antigen
d	Tag
d9-E-Cad	Epithel-Cadherin Genmutation am Exon 9
d9MAk	monoklonaler Antikörper gegen delta-9-Mutation des E-Cadherin Gens
d8MAk	monoklonaler Antikörper gegen delta-8-Mutation des E-Cadherin Gens
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DOTA	1,4,7,10-tetra-azacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetra-acetic-acid
DTPA	Diethylentriamin-Pentaacetat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eV	Elektronenvolt
FKS	fetales Kälberserum
h	Stunde
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
HAMA	humane anti-Maus-Antikörper
HER-2	human epidermal growth factor receptor 2
HSC45-M2	humane Siegelringkarzinomzellen vom Typ 45-M2

---

HWZ	Halbwertszeit
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
ITLC	Instant Thin Layer Chromatography
KG	Körpergewicht
LET	linearer Energietransfer
M-FISH	Multiplex Fluoreszenz In Situ Hybridisierung
MAk	monoklonaler Antikörper
MeV	Megaelektronenvolt
min	Minute
MW	Mittelwert
MW $\pm$ SD	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphatpuffer)
p.i.	post injectionem
RBW	relative biologische Wirksamkeit
RIK	Radioimmunkonjugat
RIT	Radioimmuntherapie
s.c.	subkutan
UICC	Union internationale contre le cancer
Upm	Umdrehungen pro Minute
vs.	versus

# 1 Einleitung

## *Beginn des Endes*

*Ein Punkt nur ist es, kaum ein Schmerz,*

*Nur ein Gefühl empfunden eben;*

*Und dennoch spricht es stets darein,*

*Und dennoch stört es Dich zu leben.*

*Wenn Du es andern klagen willst,*

*So kannst Du's nicht in Worte fassen.*

*Du sagst Dir selber: „Es ist nichts!“*

*Und dennoch will es Dich nicht lassen.*

*So seltsam fremd wird Dir die Welt,*

*Und leis' verlässt Dich alles Hoffen,*

*Bis Du es endlich, endlich weißt,*

*Dass Dich des Todes Pfeil getroffen.*

Mit diesem Gedicht beschrieb einer der bedeutsamsten deutschen Novellisten, Theodor Storm, sein erlittenes Leid verursacht, durch eine Krankheit, deren Diagnose ihm selbst nie eröffnet wurde. Am 4. Juli 1888 verstarb Theodor Storm am Magenkarzinom.

Trotz abnehmender Inzidenz seit Mitte des 20. Jahrhunderts hat das Magenkarzinom große klinische Relevanz. Veränderte Lebensgewohnheiten und multimodale Therapieoptionen konnten die Inzidenz und Mortalität senken. Dennoch besteht, insbesondere bei fortgeschrittenen Tumorstadien, weiterer klinischer Handlungsbedarf zur Reduktion der Sterblichkeit und zur Verbesserung der Lebensqualität.

Aktuell sind die therapeutischen Optionen bei fortgeschrittenen Tumorstadien limitiert und die Prognose bei initialer oder nach Diagnose auftretender Peritonealkarzinose infaust. Neben der operativen Behandlung, Chemo- und Strahlentherapie wurden vermehrt Optionen einer lokalen intraperitonealen (i.p.) Applikation von Antikörpern (AK) bei der Carcinosis peritonei diskutiert (Sendler et al., 2006).

Die Radioimmuntherapie (RIT) mit Koppelung von Radionukliden an tumorzellspezifische AK erbrachte in der Behandlung von Tumorerkrankungen präklinische und klinische Erfolge.

Experimentelle Arbeiten zeigten die Option, der spezifischen RIT mit  $^{213}\text{Bi}$  Bismut ( $^{213}\text{Bi}$ ), gebunden an einen monoklonalen AK gegen die delta-9-Mutation des E-Cadherin Gens (d9MAk), zur Therapie der Peritonealkarzinose des diffusen Magenkarzinoms. Bei nachgewiesener Epithel-Cadherin Genmutation am Exon 9 (d9-E-Cad) der humanen Siegelringkarzinomzellen vom Typ 45-M2 (HSC45-M2) konnte nach Radioimmunkonjugatapplikation eine Tumorzellreduktion und eine erfolgreiche Behandlung in Vitro und in Vivo am Mausmodell beobachtet werden (Beck et al., 2007; Becker et al., 1994; Huber, 2003; Huber et al., 2003; Senekowitsch-Schmidtke et al., 2001).

Vor klinischer Anwendung des  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk-Konjugats zur Therapie der Carcinosis peritonei des diffusen Magenkarzinoms am Patienten steht eine Optimierung der Therapie mit fraktionierter RIT-Applikation aus. Auf Grund der aktuell begrenzten Verfügbarkeit von  $^{213}\text{Bi}$  wird die fraktionierte i.p. Applikation von geringen Aktivitäten überprüft. Des Weiteren sollen verbesserte Erkenntnisse über die induzierte Toxizität auf den Organismus am Tiermodell evaluiert werden.

## 1.1 Epidemiologie, Ätiologie und Prognose des Magenkarzinoms

Die jährliche Neuerkrankungsrate am Magenkarzinom in der Bundesrepublik Deutschland wurde für das Jahr 2000 auf ca. 21.000 Personen (Männer 11.000, Frauen 10.000) geschätzt. Weltweit wurden im Jahr 2002 für das Magenkarzinom 934.000 Diagnosen gestellt und nach Erkrankungshäufigkeiten nimmt das Magenkarzinom den 4. Platz nach Lungen-, Mamma-, Kolon- und Rektumkarzinomen ein. Insgesamt ist das Magenkarzinom bei Männern die sechsthäufigste und bei Frauen

die fünfthäufigste Krebstodesursache. Männer erkranken im Durchschnitt mit 68 Jahren und Frauen mit 74 Jahren am Magenkarzinom (bei Anstieg der Neuerkrankungen mit fortschreitendem Alter) (Parkin et al., 2005; Sandler et al., 2006). Nach Ergebnissen des National Cancer Institute, ermittelt anhand der Population der U.S.A., wurde die Diagnose bei ca. 0,1 % unter dem 20. Lebensjahr, 1,6 % zwischen dem 20. und 34. Lebensjahr sowie 4,6 % zwischen dem 35. und 44. Lebensjahr gestellt (mit weiter steigender Inzidenz mit zunehmendem Alter) (National Cancer Institute, 2008).

Seit 1985 ist die weltweite Anzahl neuer Erkrankungsfälle um ca. 15 % gesunken (Parkin et al., 2005). Die internationale Regression der Erkrankungszahlen lässt sich auf eine verbesserte Konservierung der Nahrungsmittel und gesündere Ernährungsgewohnheiten zurückführen. Dies spiegelt sich auch in den international unterschiedlichen Neuerkrankungsraten wieder. In Japan, China, Finnland und einigen osteuropäischen Ländern erkranken bis zu dreimal häufiger Menschen am Magenkarzinom als in der Bundesrepublik Deutschland. Weitere hohe Neuerkrankungsraten gibt es in Chile, Kolumbien und Venezuela.

Als ätiologische Faktoren bestehen neben genetischen Auslösern (Mutationen des E-Cadherin Gens, bekannte hereditäre Karzinomsyndrome und unbekannte Mutationen bei familiärer Häufung) beeinflussbare Ernährungs- und Umweltfaktoren (hoher Nitratgehalt der Nahrung, Alkohol, Tabakkonsum, anorganische Stäube) und Erkrankungen mit erhöhtem Karzinomrisiko (*Helicobacter pylori* Gastritis, chronisch atrophische Antrumgastritis, Zustand nach Magenteilresektion, adenomatöser Magenpolyp oder Morbus Ménétrier).

Auf Grund der Lokalisation wird zwischen proximalen und distalen Adenokarzinomen unterschieden. In über 80 % aller Fälle handelt es sich um distale Adenokarzinome, welche eine eindeutige Korrelation mit *Helicobacter pylori* Infektionen aufweisen.

Magenfrühkarzinome, die auf Mukosa bzw. Submukosa beschränkt bleiben, haben trotz möglicher lymphogener oder hämatogener Metastasierung eine sehr gute, 95 %ige bzw. 85 %ige, 5-Jahresüberlebensrate. Fortgeschrittene Karzinome zeichnen sich durch überschreiten der Submukosa mit Eindringen in die Lamina muscularis propria aus (Borchard, 2001; Herold et al., 2006; Sandler et al., 2006). Bei Durchbrechen der Submukosa liegt die 5-Jahresüberlebensrate bei lediglich 20 % - 30 % (Cunningham et al., 2006).

Hinsichtlich ihres Adhäsionsverhaltens werden die Magenkarzinome nach Laurén klassifiziert. Höher differenzierte Adenokarzinome, assoziiert mit einer besseren Prognose, weisen ein kohärentes, expansives Wachstumsverhalten auf und werden als intestinaler Typ bezeichnet. Im Gegensatz dazu weist der diffuse Typ als gering differenziertes Karzinom, auf Grund seines infiltrativen Wachstumsmusters, mit mangelnder Begrenzung und früher Lymphknotenmetastasierung eine schlechtere Prognose auf. Das diffuse Wachstum ist in 50 % der Fälle durch eine Mutation im Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin bedingt. Als Besonderheit des diffusen Magenkarzinoms gilt ein häufiges Vorhandensein intrazellulärer Muzintröpfchen, wodurch der Tumorzellkern randständig verdrängt wird und das Bild eines Siegelrings entsteht. Dieser Tumortyp wird als diffus-siegelringzelliges Karzinom bezeichnet (Becker et al., 2004; Borchard, 2001; Herold et al., 2006; Sandler et al., 2006).

Durch kavitäre oder kontinuierliche Metastasierung tritt, insbesondere beim diffus wachsenden Karzinom, eine rasche peritoneale Tumorzellabsiedlung ein. Morphologisch zeigt sich die Peritonealkarzinose durch diffuse weißlich bis gräuliche Verdickungen oder knotige Strukturen des Peritoneums (Denk, 2001).

Für die Prognose ist insbesondere das TNM-Stadium gemäß der Union internationale contre le cancer (UICC) bei Erstdiagnose entscheidend. Durch steigende Anzahl durchgeführter Gastroskopien in den letzten 20 Jahren ist der Anteil der im Stadium I (Magenfrühkarzinom mit/ohne 1 - 6 Metastasen in regionären Lymphknoten bzw. Muscularis propria oder Subserosa infiltrierender Tumor) diagnostizierten Patienten auf etwa 30 % angestiegen (Herold et al, 2006; Sandler et al., 2006).

Entscheidend für das Langzeitüberleben ist die R0-Resektion des Tumors mit Lymphadenektomie, welche bei lokal begrenzten Stadien (Stadien IA, IB und II nach UICC) in ca. 95 % der Fälle möglich ist. Bei  $\frac{2}{3}$  aller Patienten liegt bereits bei Diagnosestellung ein lokal fortgeschrittenes Tumorstadium (Stadien IIIA, IIIB, IV nach UICC) vor und eine R0-Resektion ist nur noch in 40 % der Fälle erzielbar. Nach palliativer Resektion beträgt das mediane Überleben lediglich 6 - 8 Monate und die operative Therapie dient hierbei primär der Vermeidung lokaler Komplikationen (Sandler et al., 2006). Das mediane Überleben von Patienten mit Peritonealkarzinose beträgt sogar nur 3 - 6 Monate und ist bei Aszitesnachweis oder großen peritonealen Tumormassen noch kürzer (Sadeghi et al., 2000).

## 1.2 Therapie des Magenkarzinoms

Nach klinischer Manifestation oder präklinischer Diagnose ist die operative Resektion des Tumors die Basis einer suffizienten Therapie. Neben operativer Therapie sind neoadjuvante bzw. adjuvante Behandlungsverfahren, wie Chemo- und Radiotherapie, die wichtigsten therapeutischen Modalitäten zur Verbesserung des progressionsfreien Überlebens.

Seit Ende 1950 wurden systemische Chemotherapien in der Behandlung des Magenkarzinoms eingesetzt. Eine rein adjuvante Chemotherapie zeigte lediglich mäßige und statistisch limitierte Überlebensvorteile. Die postoperativ durchgeführte Radiotherapie wies eine verbesserte lokoregionale Tumorkontrolle auf, aber keinen Vorteil im 5-Jahresüberleben im Vergleich zu rein operativen Therapieverfahren oder zur Operation in Kombination mit Chemotherapie (Hallissey et al., 1994). Selbst nach optimaler chirurgischer Resektion des Primärtumors in Kombination mit adjuvanter Strahlen- und Chemotherapie lag die 5-Jahresüberlebensrate bei ca. 50 % (Illert et al., 2005).

In den Stadien II und III gemäß der UICC wird der Einsatz von perioperativer Chemo- und Radiotherapie kontrovers diskutiert. Insbesondere bei nicht zufriedenstellendem chirurgischen Ergebnis zeigte sich ein therapeutischer Benefit nach Durchführung einer adjuvanten Radiochemotherapie (Lordick et al., 2005; Lordick und Siewert, 2005). Im Vergleich zur reinen Operation konnten in der randomisierten Studie von Macdonald et al. (2001) eine signifikante Reduktion der Lokalrezidivrate und eine signifikante Verbesserung des medianen Überlebens nach 3-jährigem Follow-Up nach postoperativer Radiochemotherapie (fraktionierte perkutane Radiotherapie bis 45 Gy und Chemotherapie mit 5-Fluorouracil und Leukoverin) belegt werden. Die prä- und postoperative Chemotherapie, bei potentiell resektabler Tumorerkrankung, mit ECF (Epirubicin, Cisplatin, 5-Fluorouracil) in Kombination mit operativer Resektion versus (vs.) alleiniger chirurgischer Therapie zeigten einen Überlebensvorteil zugunsten der intravenösen (i.v.) Chemotherapie. Die 5-Jahresüberlebensrate lag bei 36 % bzw. 23 % (Cunningham et al., 2006).

Die gezielte und suffiziente Therapie der Peritonealkarzinose erscheint aktuell als nicht möglich und eine standardisierte Therapiemodalität ist nicht vorhanden. Patienten mit

lokal fortgeschrittenen Tumoren oder bei vorhandener peritonealer Metastasierung mit (Sub-) Ileus und Aszitesproduktion können durch weitere palliative Therapieverfahren wie endoskopische Resektion und Stentimplantation, Radio- und/oder Chemotherapie, Nd:YAG-Lasertherapie, Argonplasmakoagulation und perkutane endoskopische Gastrostomie supportiv unterstützt werden (Sendler et al., 2006). Es hat sich gezeigt, dass der Nachweis von freien Tumorzellen in der Peritoneallavage vor kurativer Resektion eine signifikante Reduktion der 5-Jahresüberlebensrate von 71,9 % auf 35 % ( $p < 0,001$ ) erbrachte (Rosenberg et al., 2006). Auch nach kurativer Resektion entwickelten 40 % - 50 % der Patienten nach 1 - 3 Jahren ein lokoregionales Rezidiv und bei 20 % - 30 % der Patienten, die für eine kurative Resektion geplant waren, zeigte sich intraoperativ eine peritoneale Metastasierung. Zur Reduktion der Lokalrezidivrate und zur Therapie der Peritonealkarzinose wurde in letzter Zeit der Einsatz der i.p. Chemotherapie z.B. mit Mitomycin C/Cisplatin/Etoposid oder Docataxel/Carboplatin in Kombination mit i.v. Methotrexat und 5-Fluorouracil Administration erprobt (Yan et al., 2006). Die Übersichtsarbeit von Yonemura et al. (2007) zeigte, dass die systemische Chemotherapie, wegen der bestehenden physiologischen Barriere zwischen Peritonealraum und Blutgefäßen, zu keinem Überlebensvorteil der Patienten führte. Aus diesem Grund ist die i.p. Applikation der Pharmaka zu favorisieren, um höhere Medikamentenkonzentrationen am Wirkungsort erzielen zu können. Ziel der frühen postoperativen i.p. Chemotherapie ist, die Adhärenz von frei flottierenden Tumorzellen zu verhindern. Studien zeigten, dass die hyperthermische i.p. Perfusionschemotherapie auf Grund der geringen Eindringtiefe (1 - 2 mm) nur für Tumorknötchen bis maximal 3 mm geeignet ist. Die Peritonektomie wurde 1995 erstmalig als therapeutische Modalität zur Therapie der Peritonealkarzinose beschrieben und wird heute in Kombination mit anderen Therapieverfahren eingesetzt. Die Durchführung einer aggressiven chirurgischen zytoreduktiven Therapie mit hyperthermischer i.p. Perfusionschemotherapie und im Anschluss systemischer Standardchemotherapie zeigte im Vergleich zur systemischen Chemotherapie mit/ohne palliativer Operation bei den Patienten mit chirurgischer zytoreduktiver Therapie, ohne makroskopischen Tumornachweis, ein signifikant besseres Überleben. Die neoadjuvante Chemotherapie oder insbesondere die neoadjuvante i.p. Chemotherapie konnte die Anzahl der kompletten Zytoreduktionen bei peritonealer Tumorzell dissemination erhöhen.

Phase II Studien mit Einsatz von Taxanen, TS-1 und Capecetabine haben erfolgsversprechende Resultate in der Behandlung von peritoneal disseminierten Magenkarzinomzellen am Patienten erbracht. Präklinische Studien am Mausmodell zeigten auch Überlebensvorteile nach oraler Gabe von Cytosin Nukleosid Analoga (4'-thio-FAC) bei ausgeprägter Tumorzell dissemination (Miura et al., 2002; Yonemura et al., 2007).

In präklinischen und klinischen Studien wurde über die therapeutische Effizienz der i.p. Applikation von AK gegen Tumorantigene berichtet. Nach i.p. Applikation des Apoptose-induzierenden IgM SC-1 beim disseminierten Magenkarzinom zeigte sich am Mausmodell ein geringerer Nachweis von Tumorzellen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Illert et al., 2005). Beim positiven Nachweis bzw. bei Überexpression der Antigene (AG) EpCAM (epithelial cell adhesion molecule) und/oder HER2-neu (human epidermal growth factor receptor 2) auf den Magenkarzinomzellen wurde den Patienten bei vorhandener peritonealer Metastasierung der entsprechende AK i.p. appliziert. Die zytotoxischen Effekte der Chemotherapie konnten durch Gabe von anti-HER2-MAk erhöht werden (Heidemann et al., 2001; Kono et al., 1998; Lordick et al., 2005; Rebischung et al., 2005).

Trotz aktuell erfolgsversprechender therapeutischer Ansätze steht eine weitere Optimierung und Verbesserung der Therapie der Peritonealkarzinose beim diffusen Magenkarzinom aus.

### **1.3 Karzinoembryonales Antigen als Tumormarker beim**

#### **Magenkarzinom**

Die Bestimmung von Tumormarkern dient dem Screening von Patienten hinsichtlich unterschiedlicher Erkrankungen, der Diagnosestellung und -sicherung mit Beurteilung der Prognose, der Verlaufskontrolle und Tumorstadieneinteilung. Tumormarker sind tumorassoziierte Substanzen (z.B. Proteine, Lipide oder Kohlenhydrate), welche jedoch nicht unbedingt tumor- oder organspezifisch sind und sich in oder auf den malignen Zellen befinden oder durch sie induziert werden (Lamerz et al., 2001).

Das Glykoprotein ‚karzinoembryonales Antigen‘ (CEA, carcinoembryonales Antigen) gehört zur Immunglobulin-Superfamilie und ist eines der bestetablierten onkofetalen Tumormarker, dessen normale Synthese im embryonalen Darmgewebe sowie in Pankreas und Leber erfolgt. Erstmals gelang der Nachweis des CEA beim humanen Adenokarzinom des Kolons im Tierversuch 1965 durch Gold und Freedman. Klinisch wichtig ist das Vorkommen des CEA bei entodermalen Tumoren, wie z.B. dem kolorektalen Adenokarzinom oder bei benignen Erkrankungen wie Hepatitis, Leberzirrhose und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Böcker et al., 2001; Gold und Freedman, 1965). Aber auch beim Magen- (mit 45 %), Bronchial- (mit 71 %) und metastasierten Mammakarzinom (mit 54 %) kommt es zu einem pathologischen Anstieg der CEA-Konzentration (Lamerz et al., 2001).

Abhängig vom Testverfahren liegt die obere Normgrenze der CEA-Konzentration bei 3 - 5 ng/ml. Benigne Erkrankungen haben einen Bereich von 10 – 15 ng/ml. Werte über 15 ng/ml sind höchst malignitätsverdächtig. Zu beachten ist, dass der Nikotinabusus die CEA-Konzentration bis 20 ng/ml ansteigen lässt und eine Chemotherapie mit 5-Fluorouracil zu erhöhten Werten führen kann.

Bei einer CEA-Halbwertszeit von 3 - 8 Tagen (d) kommt es ca. 3 Wochen nach R0-Resektion des Primärtumors oder operativer Metastasenentfernung zur Normalisierung des Antigenlevels. Die Antigenbestimmung begünstigt eine frühzeitige Feststellung von Rezidiven und führt zur signifikanten Verbesserung der Operations- und Überlebensraten. Bei Patienten mit Kolon- und Rektumkarzinomen besteht aktuell die höchste klinische Relevanz in der Verlaufsbestimmung der CEA-Konzentration. Hierbei korreliert der CEA-Wert mit Stadium und Prognose der Erkrankung. Die postoperative 2- bis 3-monatige CEA-Bestimmung ist die wichtigste nicht invasive und kostengünstige Methode zur Entdeckung von Rezidiven in den ersten 2 Jahren nach der Operation.

Messungen der CEA-Konzentration bei Patienten mit Magenkarzinom zeigten, dass es auch bei dieser Erkrankung zu einer Korrelation zwischen CEA-Wert und Tumorgröße, Stadium, Invasionstiefe, Lymphknoten-, peritonealer und Lebermetastasierung kommt (Lamerz et al., 2001).

Prognostische Faktoren hinsichtlich der Überlebenszeit beim Magenkarzinom sind neben Tumorstadium, erhöhten Carbohydrate-Antigen 19-9 (CA19-9) Werten

( $\geq 60$  U/ml) auch präoperativ erhöhte CEA-Konzentrationen ( $\geq 4$  ng/ml). Erhöhte präoperative CEA-Werte führten zu einer signifikanten Reduktion des Überlebens der Patienten (Reiter et al., 1997; Wolter und Neumeier, 2006). Folglich hat die CEA-Konzentration auch bei Patienten mit Magenkarzinomen eine wichtige prognostische Aussagekraft.

## 1.4 Radioimmuntherapie

### 1.4.1 Grundlagen

Das Prinzip der RIT in der Tumorbehandlung besteht in der Koppelung von AK mittels geeigneten Chelatoren an Radionuklide, welche als Radioimmunkonjugate (RIK) gegen tumorassoziierte AG von malignen Zellen gerichtet sind und an diese binden.

Die ersten Ansätze zur Therapie mit AK gegen Tumorzellen wurden 1895 durch Hericourt et al. publiziert. 1906 ging Paul Ehrlich auf die Option einer Immuntherapie mit zytotoxischen Substanzen ein (Stigbrand et al., 1996). Ein entscheidender Schritt für die Entwicklung der Immuntherapie war die Herstellung von monoklonalen Antikörpern (MAk) durch In-Vitro-Hybridisierung durch Georg Köhler und Cesar Milstein (Köhler und Milstein, 1975).

Anfang der 70er Jahre veröffentlichten die Gruppen Quinomones et al., Primus et al. und Goldenberg et al. tierexperimentelle Studien zur Therapie von humanen Chorion- oder Kolonkarzinomen mit radioaktiv markierten AK gegen das humane Choriongonadotropin und das CEA. Die Anzahl der eingesetzten immunologisch wirksamen Substanzen in der RIT stieg seitdem stark an. Zur spezifischen Bindung an Zellen werden heute radioaktiv markierte MAk oder deren Antikörperfragmente (Fab oder  $F(ab')_2$ ) eingesetzt.

Die Ansätze der RIT lagen in der Behandlung von malignen hämatologischen Erkrankungen, Leberkarzinomen, Ovarialkarzinomen, kolorektalen Karzinomen, Cholangiokarzinomen, Lungentumoren, Blasentumoren, malignen Melanomen, Gliomen, Mammakarzinomen, Nierenzellkarzinomen und Prostatakarzinomen. Gute klinische Erfolge wurden jedoch lediglich in der Behandlung von radiosensitiven hämatologischen Erkrankungen erzielt.  $^{90}\text{Y}$ trium ( $^{90}\text{Y}$ ) und  $^{131}\text{I}$ od ( $^{131}\text{I}$ ) wurden bereits für die RIT von Lymphomen zugelassen. Deutlich weniger erfolgreich waren die

Resultate in der Therapie von soliden Tumoren. Die Responderate nach RIT war bei soliden Tumoren relativ schlecht und von kurzer Zeitdauer (Goldenberg, 2002; Stigbrand et al., 1996).

In der Übersichtsarbeit von Aarts et al. (2008) wurde jedoch die Attraktivität der lokoregionalen RIT von soliden radiosensitiven Tumoren im frühen Tumorstadium in Kombination mit operativer Resektion oder als palliative Therapieoption belegt.

Die Effizienz der RIT von malignen Erkrankungen hängt von zahlreichen Faktoren, wie z.B. Tumorart, Tumorphysiologie, Tumorgröße, Tumorperfusion, Applikationsart (systemisch/lokoregional/intratumoral), Auswahl der Nuklide, Applikationsschema, Molekulargewicht und Pharmakokinetik des MAK ab.

Zur Verbesserung der Effektivität der RIT wurden zahlreiche Strategien entwickelt. Ein entscheidender Faktor ist eine gute Antikörperaufnahme in den Tumor, welche über eine gute Tumolvaskularisierung und ausreichende Perfusion erzielt wird. Wichtig ist die Optimierung der molaren Verhältnisse der Antikörper- zu Antigenbindungsstellen hinsichtlich der Heterogenität der Antigenexpression auf den Tumoren. Studien zeigten, dass durch Applikation von Lymphokinen ein Anstieg der Antigenexpression erzielt werden konnte. Durch Gabe von Interferon konnte die CEA-Konzentration auf den Tumorzellen um den Faktor 6,9 gesteigert werden. Ziel ist es, die Bindung des RIK am Tumor zu maximieren und eine minimale Aufnahme im Normalgewebe zu erreichen. Ein Versuch ist hierbei die Gabe von unkonjugiertem AK vor der RIK-Gabe. Nicht spezifische Fc-Rezeptoren im Normalgewebe, insbesondere in der Milz, können damit blockiert werden und stehen den radioaktiven Immunkonjugaten nicht mehr als Bindungsstellen zur Verfügung. Zur Elimination von nicht gebundenen, frei zirkulierenden RIK und damit zur Reduktion der Toxizität wurden experimentell diverse Methoden, wie z.B. Plasmapherese, xenogene anti-AK oder syngene antiidiotypische AK evaluiert.

Der Schutz des Normalgewebes vor der Radiotoxizität, z.B. des hämatopoetischen Systems mittels hämatopoetischen Wachstumsfaktoren oder Stammzelltransplantation sowie Nierenschutz mit kationischen Aminosäuren, Aminosukern und deren Polymeren stellen weitere wichtige Faktoren der RIT-Planung dar.

Im Gegensatz zur nuklearmedizinischen Diagnostik mit Verwendung von  $\gamma$ -emittierenden Nukliden werden für die Therapie  $\beta$ -Strahler (Reichweite 0,4 – 5 mm),

$\alpha$ -Strahler (Reichweite 40 – 100  $\mu\text{m}$ ) und Auger-Elektronen (Reichweite  $< 25$  nm) eingesetzt, um die Tumorzellen effektiv zu zerstören.

Neben der Partikelenergie und der Reichweite ist die Aussendung einer zusätzlichen  $\gamma$ -Komponente ( $< 10$  % ausreichend) zur Berechnung der Strahlendosis und zur szintigraphischen Darstellung zur Verlaufskontrolle des Tumors sinnvoll. Darüber hinaus ist die Auswahl der Radionuklide abhängig von der Größe und biologischen Eigenschaft des Tumors, wie Strahlensensibilität, aber auch von physikalischen Faktoren (Art des Zerfalls und Reichweite) sowie der relativen biologischen Wirksamkeit (RBW) und Halbwertszeit (HWZ) der Nuklide.

Die ausreichende Verfügbarkeit von  $\beta$ -Nukliden und eine suffiziente Methode zur Markierung der Carrier setzten die  $\beta$ -Strahler in der präklinischen und klinischen Anwendung durch.  $\beta$ -Nuklide sind vorteilhaft in der Therapie von größeren Tumormassen, strahlensensibler Lymphome und bei Patienten mit Option auf eine Knochenmarkstransplantation (Nikula et al., 1999).

Aktuell finden  $^{131}\text{I}$ ,  $^{177}\text{Lu}$  Lutetium ( $^{177}\text{Lu}$ ),  $^{186}\text{Re}$  Rhenium,  $^{188}\text{Re}$  Rhenium ( $^{188}\text{Re}$ ) bzw.  $^{90}\text{Y}$  die meiste Anwendung und werden in Studien zur Therapie von B-Zell Lymphomen (Davies, 2007; Maza et al., 2008), malignen Gliomen (McLendon et al., 2007), Ovarialkarzinomen (Meredith et al., 2007), Melanomen (Dadachova et al., 2008) und HER-2 exprimierenden Tumorzellen (Persson et al., 2007) eingesetzt.

$^{131}\text{I}$  fand in der Radiojodtherapie mit seiner mittleren Reichweite von 0,91 mm den Durchbruch. In der Behandlung von Tumorknoten mit einem Durchmesser von 1 cm werden 80 % der  $\beta$ -Energie von  $^{131}\text{I}$  vom Tumor absorbiert. In der Therapie von Mikrometastasen ( $\varnothing \leq 2\text{mm}$ ) werden jedoch lediglich 5 % der  $\beta$ -Strahlung vom Tumor absorbiert. Die restlichen 95 % schädigen das angrenzende Normalgewebe. Besonders gute therapeutische Wirksamkeit bei der Behandlung großer Tumore zeigt  $^{90}\text{Y}$  mit einer mittleren Reichweite von 3,9 mm. Durch den Kreuzfeuereffekt werden auch solche Tumorzellen letal geschädigt, die nicht selbst das RIK gebunden haben. Auf Grund der niedrigen  $\beta$ -Energie mit 0,496 Megaelektronenvolt (MeV) und einer maximalen Reichweite von 1,5 mm wird vermehrt  $^{177}\text{Lu}$  bei der Therapie von kleineren Tumoren eingesetzt.

Der Einsatz von  $^{90}\text{Y}$  bzw.  $^{131}\text{I}$  radiomarkiertem anti-CD20-MAk Zevalin® (Ibritumomab-Tiuxetan) bzw. Bexxar® (Tositumomab) zur Therapie des

Non-Hodgkin-Lymphoms ist von der Food and Drug Administration genehmigt (Brechtel, 2007). In einer internationalen Phase III Studie bei 414 Patienten mit fortgeschrittenen follikulären Non-Hodgkin-Lymphomen in der ersten kompletten bzw. partiellen Remission zeigte sich nach Induktionschemotherapie ohne RIT vs. einmaliger Applikation von  $^{90}\text{Y}$ -Ibritumomab Tiuxetan (Zevalin®) eine therapeutische Überlegenheit zugunsten der Zevalin® Behandlung. Das mediane progressionsfreie Überleben stieg von 13,5 Monaten auf 37 Monaten, mit einer kompletten Responderate von 87 %, an (Hagenbeek et al., 2007). Weiterführende laufende Studien vergleichen die Rituximab-CHOP-Chemotherapie mit CHOP-Chemotherapie gefolgt von einer einmaligen Zevalin® Behandlung (Held et al., 2008).

Zur Behandlung von Mikrometastasen haben sich Auger-Elektronen, z.B.  $^{125}\text{Jod}$ , als effektiv erwiesen. Hinsichtlich ihrer kurzen Reichweite (wenige Nanometer) ist es notwendig, dass Auger-Elektronen in die Zelle aufgenommen werden, an die DNA binden und im Zellkern zerfallen, um eine Schädigung der Zelle hervorzurufen.

$\alpha$ -Strahler weisen sich durch eine kurze HWZ, geringe Reichweite (40 – 100  $\mu\text{m}$ ) und hohen linearen Energietransfer (LET) ( $\sim 100 \text{ keV}/\mu\text{m}$ ) aus. Bei Tumorzellclustern mit einer Größe von ca. 100  $\mu\text{m}$  werden 60 % der Strahlung intratumoral absorbiert, bei einem Durchmesser von 1000  $\mu\text{m}$  100 %. Die Zahl der  $\alpha$ -Teilchen, die nötig sind, um eine Zelle letal zu schädigen, liegt um den Faktor 1000 niedriger als bei  $\beta$ -Teilchen. Untersuchungen von Macklis et al. (1992) mit dem  $\alpha$ -Strahler  $^{212}\text{Bismut}$  ( $^{212}\text{Bi}$ ) zeigten, dass lediglich ca. 4  $\alpha$ -Teilchen den Zellkern zur Abtötung durchqueren mussten, um diesen zu zerstören. Die geringe Anzahl der notwendigen Teilchen lässt sich auf den hohen linearen Energietransfer der  $\alpha$ -Strahler zurückführen.

Aus diesen Gründen eignen sich Nuklide die  $\alpha$ -Strahlung emittieren besonders gut zur Behandlung von Mikrometastasen und malignen Erkrankungen des hämatopoetischen Systems (Knox und Meredith, 2000; Macklis et al., 1992; Schicha und Schober<sup>(2)</sup>, 2003).

### 1.4.2 Alpha-/<sup>213</sup>Bi-Radioimmuntherapie

Bei der  $\alpha$ -Strahlung handelt es sich um eine Teilchenstrahlung aus Helium-Atomkernen, bestehend aus 2 Protonen und 2 Neutronen. Sie sind hochenergetische, zweifach geladene Ionen,  ${}^4\text{He}^{++}$  (kinetische Energie 5 – 8 MeV), mit einer mittleren Reichweite von etwa 40 - 100  $\mu\text{m}$ , welche beim Zerfall des radioaktiven Nuklids, dem  $\alpha$ -Strahler, ausgesandt werden. Bei dem resultierenden hohen LET (60 - 230 keV/ $\mu\text{m}$ ) wird die Strahlungsenergie direkt durch Stöße auf den Atomkern übertragen. Im Gegensatz zu  $\beta$ -Nukliden (kinetische Energie 0,3 - 2,3 MeV, Gewebereichweite 0,5 – 12 mm, LET 0,1 - 1 keV/ $\mu\text{m}$ ) sind  $\alpha$ -Teilchen bei einem einzigen Zerfall in der Lage einzelne Zellen selektiv letal zu schädigen, ohne das umliegende Gewebe zu belasten (Brechbiel, 2007; Jurcic et al., 2002; Seidl und Senekowitsch-Schmidtke<sup>(2)</sup>, 2008).  $\beta$ -Strahler haben eine zu große Reichweite um lediglich einzelne, disseminierte Tumorzellen zu bestrahlen, ohne dabei das umliegende Gewebe zu schädigen.

Einige Autoren vertreten die These, dass der LET der  $\alpha$ -Strahler zu groß sei, um einen therapeutischen Nutzen gegenüber den strahleninduzierten Schäden zu haben. Andere beschreiben  $\alpha$ -Nuklide als besonders geeignet zur Behandlung von Tumorzellen, da die induzierte DNA-Schädigung nur begrenzt von den Zellen repariert werden kann (Nikula et al., 1999). Die RBW für  $\alpha$ -Emitter zur Zelltodinduktion wurde zwischen 3 - 8 und für  $\beta$ -Emitter bei  $\sim 1$  angegeben (Brechbiel, 2007; Seidl und Senekowitsch-Schmidtke<sup>(2)</sup>, 2008). Couturier et al. (2005) bewerteten die durch  $\alpha$ -Strahler induzierte Zytotoxizität um bis zu 100-fach höher als die der  $\beta$ -Nuklide. Auf Grund der kurzen Reichweite sind Kreuzfeuereffekte in Vivo von minderer Bedeutung.

Auf Grund der kurzen Reichweite liegt der Einsatz von  $\alpha$ -Strahlern in der Therapie von Mikrometastasen, kleinen Tumorzellclustern und malignen Erkrankungen des hämatopoetischen Systems. Die besten Applikationsmethoden von  $\alpha$ -Nukliden bei lokoregionaler Gabe sind intratumoral, i.p. (Ovarialkarzinom, Peritonealkarzinose), intrathekal (maligne Meningitis), intrazerebral (Gliom) oder intravesikal (Blasenkarzinom).

Nach Bindung des Radionuklids an die Tumorzelle kann es zu irreparablen DNA-Doppelstrangbrüchen kommen. Darüber hinaus ist die Wirkung von  $\alpha$ -Strahlern

unabhängig vom Zellzyklusstadium und vom Oxygenierungszustand der Tumorzelle (Imam, 2001; Schicha und Schober<sup>(2)</sup>, 2003; Senekowitsch-Schmidtke et al., 2001).

Eine der frühen tierexperimentellen Studien am Mausmodell mit i.p. Applikation von  $\alpha$ -RIK wurde von Macklis et al. (1988) publiziert. Tieren wurden i.p. T-Zellen injiziert und im Anschluss Aktivitäten bis maximal 14,8 MBq  $^{212}\text{Bi}$ -konjugierten Immunglobulin M gegen murine T-Zellen/neuroektodermale Oberflächenantigen Thy 1.2 appliziert. Die Mäuse erreichten nach RIK-Applikation eine verlängerte Überlebenszeit, welche nach Injektion des kalten AK bzw. unmarkierten  $^{212}\text{Bi}$  nicht erreicht werden konnte.

Insbesondere durch die kurze HWZ von  $^{212}\text{Bi}$  (61 Minuten (min)) bzw.  $^{213}\text{Bi}$  (45,6 min) ist deren Einsatz in der Behandlung von Leukämien, Lymphomen oder Mikrometastasen zu favorisieren. Bei diesen Tumorerkrankungen, ist im Gegensatz von großen soliden Tumoren, eine schnelle Bindung an die gesamten Tumorzellen möglich (Nikula et al., 1999). Zudem wird durch die kurze HWZ von  $^{212}\text{Bi}$  und  $^{213}\text{Bi}$  die Radiotoxizität auf das Normalgewebe deutlich reduziert.

Der  $\alpha$ -Strahler  $^{213}\text{Bi}$  mit einer Reichweite von  $\sim 60 \mu\text{m}$  und einem LET  $\sim 100 \text{keV}/\mu\text{m}$  kann aus einem  $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generator gewonnen werden. Auf Grund der geringen HWZ muss der Prozess der Elution und der AK-Markierung schnell und somit räumlich nah am Patienten erfolgen.  $^{213}\text{Bi}$  emittiert zusätzlich Photonen (440keV), wodurch sich das Nuklid zur szintigraphischen Bildgebung und zur Messung der Aktivität im  $\gamma$ -Counter eignet. Zur Herstellung des  $^{213}\text{Bi}$ -Immunkonjugats wird das Radionuklid über eine weitere chemische Substanz, einen bifunktionellen Chelator, an das Immunglobulin gebunden. Um die Toxizität in Vivo auf den Organismus zu minimieren, muss das Chelat thermodynamisch sowie kinetisch stabil sein. Es zeigte sich, dass chemische Derivate von Diethylentriamin-Pentaacetat (DTPA) sich als geeignete Chelatoren erwiesen. Auch der makrozyklische Chelator DOTA (1,4,7,10-tetra-azacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetra-acetic-acid) bildete mit  $^{213}\text{Bi}$  stabile Komplexe. Es erwies sich aber eine schlechtere Kinetik mit dem zu chelatierenden kurzlebigen  $^{213}\text{Bi}$  (Garmestani et al., 2001). In präklinischen und klinischen Studien mit  $^{213}\text{Bi}$ -Immunkonjugaten wurde die Koppelung mit dem bifunktionellen Chelator

2-(4-isothiocyanatobenzyl) Diethylentriamin-Pentaacetat (SCN-CHX-A“-DTPA) durchgeführt.

Auf Grund der kurzen HWZ von  $^{213}\text{Bi}$  muss das RIK innerhalb von 1-2 Stunden (h) nach Applikation an die entsprechenden Tumorzellantigene binden. Folglich müssen die Tumorzellen für das RIK leicht erreichbar sein. Eine schnelle Bindung des RIK an die Tumorzellantigene kann zudem durch eine lokoregionale Applikation deutlich verbessert werden.

In Vivo Studien am Mausmodell zeigten, dass die lokale Applikation von  $^{213}\text{Bi}$  konjugiert an den MAK 9.2.27, gerichtet gegen ein Oberflächenantigen des malignen Melanoms, eine Tumorregression ohne Rezidiv bis zu 4 Monaten post injectionem (p.i.) verursachte (Allen et al., 2001). Menschliche Mammakarzinomzellen (MDA-MB-231) wurden Nacktmäusen in die Milchleisten implantiert. In Folge trat eine Metastasierung in die Lymphknoten ein. Die subkutane (s.c.) Injektion von  $^{213}\text{Bi}$ -API (Plasminogen Activator Inhibitor Type-2 Protein) zeigte eine partielle Response, ohne komplette Remission, des Tumors (Allen et al., 2001). Am Mausmodell der Peritonealkarzinose induziert durch die Ovarialkarzinomzelllinie (OVCAR3) wurde nach i.p. Applikation von einmalig 355 MBq/kg  $^{213}\text{Bi}$ -C595 eine Verlängerung des Überlebens von 25 d erzielt (Song et al., 2008).

Neben der Therapie von malignen Erkrankungen wurde in Vitro und in Vivo der Einsatz von  $^{213}\text{Bi}$ -Immunkonjugaten zur Therapie von Infektionen mit *Streptococcus pneumoniae* bzw. *Cryptococcus neoformans* untersucht (Dadachova, 2004; Dadachova und Casadevall, 2006).

Durch Entwicklung von  $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generatorsystemen mit Gewinnung von hohen Aktivitäten (925 – 2405 MBq) bestand die Möglichkeit der  $^{213}\text{Bi}$ -Immunkonjugattherapie am Menschen (McDevitt<sup>(1)</sup> et al., 1999). Die erste Therapiestudie am Menschen wurde 1996 mit  $^{213}\text{Bi}$ -HuM195 Konjugaten durchgeführt.  $^{213}\text{Bi}$ -konjugierter HuM195, ein MAK gegen CD33 exprimierende Leukämiezellen, findet bereits therapeutische Anwendung am Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (New York) in der Behandlung der akuten myeloischen und chronischen myelomonozytären Leukämie. Die Applikation von  $^{131}\text{I}$  oder  $^{90}\text{Y}$  konjugiertem HuM195 konnte Leukämiezellen töten, führte aber als Nebenwirkung zu einer extremen Myelosuppression mit erforderlicher Stammzelltransplantation. 18 Patienten mit einem über 25 %igen CD33-exprimierenden Blastenanteil im Knochenmark wurden 10,36 - 37,0 MBq/kg  $^{213}\text{Bi}$ -HuM195 i.v. appliziert. Nach Therapie war keine

signifikante extramedulläre Toxizität bei den Patienten nachweisbar. Bei allen Patienten war eine Myelosuppression mit einer medianen Erholungszeit von 22 d bestimmbar.  $^{213}\text{Bi}$ -HuM195 reicherte sich 5 – 10 min nach Applikation in den Leukämiezellen an, ohne dass eine signifikante Aufnahme des RIK in andere Organe beobachtet werden konnte. Bei 93 % der evaluierten Patienten zeigte sich eine Verringerung von zirkulierenden Blasten und bei 78 % eine Reduktion der Blasten im Knochenmark nach  $^{213}\text{Bi}$ -HuM195 Applikation. Jedoch konnte keine komplette Remission erzielt werden (Jurcic et al., 2002).

In Vitro zeigten  $^{213}\text{Bi}$ -anti-CD20 und  $^{213}\text{Bi}$ -anti-CD19 ein gutes Bindungsverhalten an Non-Hodgkin-Lymphom-Zellen. Phase I Studien erbrachten zudem Erfolge in der Therapie mit 555 - 1665 MBq  $^{213}\text{Bi}$ -anti-CD20 bei Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen, ohne dosislimitierende Toxizität (Heeger et al., 2004).

Kneifel et al. (2006) publizierten Daten zur intrathekalen  $^{90}\text{Y}$ -,  $^{177}\text{Lu}$ - bzw.  $^{213}\text{Bi}$ -Radiorezeptorthherapie mit Substanz P zur Behandlung von malignen Gliomen mit Neurokinin Typ 1 Rezeptorüberexpression. Bei zwei Patienten wurde zur Protektion des benachbarten Gewebes und zum Erreichen von einem hohen Tumortakeup des Radiorezeptorkonjugats  $^{213}\text{Bi}$ -Substanz P lokal appliziert. Eine Patientin mit einem Glioblastoma multiforme mit Z.n. chirurgischer Resektion, externer Strahlentherapie und Chemotherapie überlebte nach 375 MBq  $\alpha$ -RIT 7 Monate und ein Patient mit chirurgischer Resektion vor und nach 825 MBq  $\alpha$ -RIT lebte mehr als 66 Monate und war zum Studienendpunkt ohne Rezidivanzeichen am Leben. Die histopathologische Untersuchung des operativ gewonnenen Materials 33 Monate nach RIT zeigte lediglich eine strahlenbedingte Nekrose des Gewebes ohne Nachweis von vitalen Tumorzellen.

Das RIK  $^{213}\text{Bi}$ -9.2.27 wurde in Studien zur Therapie des metastasierten Melanoms intraläsionär (1,85 - 16,6 MBq) oder i.v. (55 - 947 MBq) appliziert. Die intraläsionäre Applikation erzielte eine gute Tumorzellabtötung. Nach i.v. Applikation bei insgesamt 22 Patienten zeigten 7 Patienten eine Progression der Erkrankung, 11 Patienten einen stabilen Zustand, 3 Patienten eine partielle und 1 Patient eine nahezu komplette Remission. Es konnte keine strahleninduzierte Toxizität nachgewiesen werden. (Allen et al., 2005; Raja et al., 2007).

Die positiven Ergebnisse der Therapie mit  $\alpha$ -RIK, insbesondere mit  $^{213}\text{Bi}$ , sollten deren Einsatz in der Behandlung von malignen Erkrankungen in Zukunft favorisieren.

### 1.4.3 $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk-Radioimmuntherapie

Die  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk-RIT wurde zur Reduktion der Tumorzell dissemination von malignen Zellen im Peritonealraum beim diffusen Magenkarzinom bei E-Cadherin Adhäsionsmolekülmutation am Exon 9 entwickelt.

Mutationen am Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin der Magenkarzinomzellen mit resultierendem invasiven und diffusen Tumorwachstum treten neben dem in dieser Studie behandeltem diffusen Magenkarzinom vom Siegelringzelltyp auch beim invasiven lobulären Mammakarzinom, einer diffus sklerosierenden Variante des papillären Schilddrüsenkarzinoms, endometrialen und ovariellen Karzinomen auf. Studien zeigten, dass in 50 % der diffusen Magenkarzinome eine Zelladhäsionsmolekülmutation anzutreffen ist. In 13 % der E-Cadherin exprimierenden diffusen Magenkarzinomen bindet der monoklonale Antikörper d9MAk spezifisch an die Tumorzellen. Dieser AK ist gerichtet gegen die Epithel-Cadherin Genmutation am Exon 9 (d9-E-Cad) des Adhäsionsmoleküls der Magenkarzinomzellen (Becker et al., 1999). Die Mutation des Adhäsionsmoleküls d9-E-Cad ist tumorzellspezifisch und wird nie im gesunden Organismus angetroffen.

Der d9MAk bindet ebenfalls spezifisch an das mutierte Oberflächenantigen der humanen Siegelringkarzinomzellen vom Typ 45-M2. Durch Koppelung des tumorzellspezifischen d9MAk an den  $\alpha$ -Strahler  $^{213}\text{Bi}$  wurde eine neue Therapieoption, insbesondere bei peritonealer Metastasierung des Siegelringzellkarzinoms, geschaffen. In Vitro Studien zeigten einen nekrotischen Zelluntergang der HSC45-M2-Zellen nach Administration von  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk. Nach Inkubation der Zellen mit dem Apoptoseinhibitor z-VAD-fmk konnte der Zelluntergang nicht verhindert werden. Auch der Pro-Caspase 3 Level, welcher durch Enzyminduktion bei der Apoptose abfällt, blieb nach HSC45-M2-Inkubation mit  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk nahezu konstant (Seidl et al., 2005). Weiterführende Studien zeigten, dass die  $^{213}\text{Bi}$ -Applikation einen Zellzyklusstop in der G2-Phase (prämitotische Phase) initiierte und  $^{213}\text{Bi}$  in den HSC45-M2-Zellen eine Expression von Genen (Tumornekrosefaktor, SPHK1, STAT5A, p21, MYT1, SSTR3) induzierte, die einer Apoptoseinduktion entgegenwirkten (Seidl et al., 2007).

Biodistributionsstudien an Swiss nu/nu Mäusen ergaben nach i.p. bzw. i.v.  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk-Applikation eine deutlich geringere Anreicherung des RIK nach i.p.

Injektion im Blut und Gewebe als nach i.v. Gabe. Neben hohen  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk-Konzentrationen im Blut wurde auch eine relativ hohe Anreicherung des RIK in den Nieren nach i.v. Applikation beobachtet.

In Therapiestudien wurden Swiss nu/nu Mäusen  $1 \times 10^7$  HSC45-M2-Tumorzellen i.p. inokuliert. Nach einem 24-stündigen Intervall erhielten die Tiere eine i.p. Applikation mit 0,37 MBq bis 22,2 MBq  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk oder unspezifischen  $^{213}\text{Bi}$ -Immunkonjugaten. Das unspezifische  $\alpha$ -RIK bestand aus einem an  $^{213}\text{Bi}$  gekoppelten monoklonalen Antikörper gerichtet gegen eine delta-8-Mutation des E-Cadherin Gens (d8MAk). Tiere, die das spezifische RIK  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk appliziert bekamen überlebten nicht signifikant länger als Tiere mit  $^{213}\text{Bi}$ -d8MAk bei Aktivitäten über 1,85 MBq. Bei Therapiebeginn 8 d nach Tumorzellinokulation konnte ein signifikanter Unterschied im Überleben zugunsten des spezifischen RIK evaluiert werden. In Abhängigkeit von der applizierten Aktivität hat sich die einmalige  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk-RIT bei Therapiebeginn 1 d nach Tumorzellinjektion als sehr effektiv erwiesen. Die besten therapeutischen Resultate wurden nach einmaliger Applikation mit 1,85 MBq  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk erzielt. 87 % der Tiere überlebten 300 d nach Tumorzellinokulation ohne Anzeichen einer Erkrankung (Beck et al., 2007).

Auf Grund der spezifischen Bindung des Radiopharmakons an die E-Cadherin-Mutation konnte die Gesamtkörpertoxizität limitiert und Kreuzfeurereffekte minimiert werden (Huber et al., 2003; Senekowitsch-Schmidtke et al., 2001).

Weiterführende Studien von Buchhorn et al. (2007) beschäftigen sich mit der nicht-invasiven Darstellung der Tumorentwicklung mittels Bildgebung nach  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk-RIT. Mit dem Biolumineszenz Imaging wurde nach Transfektion der HSC45-M2-Zellen mit Luciferase, die abgegebene Lichtintensität mittels einer hochauflösenden CCD-Kamera mit Bildverstärker dargestellt. Mit dieser Methode konnten selbst sehr kleine Tumorcluster (0,5 – 1 mm) sichtbar gemacht werden, deren Darstellung durch die Auflösungsmöglichkeit von Ultraschall, Magnetresonanz- oder Positronenemissionstomographie limitiert war. Neben der Progression der Tumorknoten konnte die peritoneale Lokalisation bestimmt werden. Eine 2,7 MBq  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk-Applikation 8 d nach HSC45-M2-Inokulation zeigte eine Reduktion des Biolumineszenzsignals nach Luciferasetransfektion der Tumorzellen bis zum 12. Tag

nach Therapie mit anschließender Zunahme der Signalintensität bei erneutem Tumorwachstum.

#### 1.4.4 Fraktionierte Radioimmuntherapie

Eine Option der Optimierung der therapeutischen Effizienz und Limitierung der Radiotoxizität ist die fraktionierte Applikation von Radiopharmaka.

Die Vor- und Nachteile einer fraktionierten RIT wurden von DeNardo et al. (2002) ausführlich diskutiert.

Durch eine fraktionierte RIT kann eine homogenere Verteilung des RIK und damit der Tumorbestrahlung im Vergleich zur einmaligen RIK-Applikation erzielt werden. Auf Grund der Kenntnisse der heterogenen Verteilung von Makromolekülen im Tumorgewebe ist eine fraktionierte RIK-Administration zu befürworten, um bei folgenden RIK-Gaben noch nicht erreichte Tumoranteile zu bestrahlen (DeNardo et al., 2002). Darüber hinaus kann die RIK-Heterogenität am Tumor mit Einsatz von Radionukliden mit größerer Reichweite (z.B.  $^{90}\text{Y}$  oder  $^{188}\text{Re}$ ) ausgeglichen werden.

Ursachen für eine mäßige Tumorpassage von größeren Molekülen, wie z.B. von AK, sind die heterogene Blutverteilung im Tumorgewebe, der hohe interstitielle Druck, der eine Einwärtsdiffusion in den Tumor verhindert und große Transportdistanzen im Tumorgewebe. Die Diffusionsrate der frei zirkulierenden AK in das Tumorgewebe wird bei zunehmender Bindung von AK an Tumorantigene verringert, da weniger freie AK zur Verfügung stehen (Jain, 1990). Studien von Griffith et al. (1988) und Roberson und Buchsbaum (1995) bestätigten die heterogene RIK-Verteilung mittels autoradiographischer Bildgebungsanalyse im lymphatischen Tumorgewebe oder in Kolonkarzinomknötchen nach Applikation von  $^{131}\text{I}$ -Lym-1 MAk bzw.  $^{131}\text{I}$  17-1A MAk. Bei fraktionierter RIT können Aktivitäten angepasst an den Patienten appliziert, die Toxizität kontrolliert und reduziert, aber auch die maximal tolerierbare Aktivität im Vergleich zur einmaligen RIK-Applikation erhöht werden. Die Effektivität der RIT kann gesteigert werden, was sich in einer längeren Tumorregression, auf Grund der Möglichkeit einer zeitlich längeren Therapiedauer, auswirkt. Präklinische Studien konnten zeigen, dass Toxizität und Mortalität durch fraktionierte Applikation reduziert

werden konnten und eine bessere Aktivitätsverteilung im Tumor mit guter Tumorkontrolle vorlag, als im Vergleich zur einmaligen RIT.

Ein Problem der wiederholten Gabe von radioaktiv markierten murinen AK am Menschen ist die Produktion von humanen anti-Maus Antikörpern (HAMA). Bereits nach einmaliger Applikation von murinen oder anderen tierischen AK entwickeln mehr als 80 % der behandelten Patienten eine Immunantwort gegen den injizierten AK. Die Anwendung der fraktionierten RIT bei vorhandener Immunsystemkompetenz des Patienten ist nur mit Gabe von humanisierten bzw. chimären AK oder zeitgleicher Gabe von Immunsuppression möglich, um einer Entwicklung von HAMA entgegenzuwirken. Auch die Gabe von unmarkierten AK zum Abfangen der HAMA vor der eigentlichen RIT-Administration oder die extrakorporale Immunadsorption der AK nach Therapie mittels Hämofiltration konnten die Effizienz der fraktionierten RIT mit murinen AK erhöhen (Knox und Meredith, 2000). Andererseits zeigte DeNardo et al. (1998), dass eine fraktionierte Applikation von  $^{131}\text{I}$  markierten murinen AK Lym-1 lediglich bei 10 % der Patienten zum Abbruch der Therapie auf Grund einer Produktion von HAMA zwang (DeNardo et al., 2002). In einer Studie von Meredith et al. (1992) entwickelten 9 von 12 Patienten trotz eines therapiefreien Intervalls von 1 Woche AK gegen den eingesetzten chimären B72.3 AK. Das Fraktionierungsintervall bei Applikation von RIT sollte nicht länger sein als die Zeit, die der Körper benötigt, um eine Immunantwort gegenüber dem AK auszubilden (~10 d). Hierdurch soll eine Interferenz zwischen HAMA und Immunkonjugat verhindert werden (Vriesendorp et al., 1993). Zur Reduktion der HAMA-Produktion sollten die murinen AK durch modifizierte, chimäre Immunglobuline oder AK-Fragmente mit geringerer Immunogenität am Patienten ersetzt werden.

Ziel ist es, die fraktionierte RIT über die Auswahl des geeigneten Nuklids in Hinblick auf Aktivität, physikalische Eigenschaften, HWZ und Dosierungsintervalle zu optimieren, um eine Tumorremission und somit eine Verlängerung des Überlebens zu erreichen (DeNardo et al., 2002).

### 1.4.5 Toxizität

Akute, meist transiente Symptome, die nach Gabe des RIK auftreten, sind Exantheme, Fieber, Frösteln, Myalgie, Sudor, Pruritus, Nausea, Emesis, Diarrhoe, nasale Schleimproduktion und Hypotension. Es können aber auch stärkere Symptome wie z.B. Rigor, Bronchospasmus und Larynxödem auftreten. Diese sind induziert durch die körpereigene Immunantwort auf die applizierten AK. Nach zentralnervöser Applikation des RIK können transiente neurologische Symptome in Erscheinung treten (Knox und Meredith, 2000).

Nach i.p. RIK Applikation zeigt  $\frac{1}{3}$  der Patienten die Serumkrankheit (Immunkomplexkrankheit), welche nach i.v. Applikation seltener nachweisbar war. Zwei Wochen nach RIT treten die Symptome primär auf und bestehen für ca. 1 Woche (Knox und Meredith, 2000).

Die Toxizität der RIT äußert sich primär unter anderem in der dosislimitierenden Knochenmarkssuppression, abhängig von Knochenmarksreserven, Tumorgroße, Milzgröße und Stabilität des RIK. Auf Grund der Option von Knochenmarksstammzelltransplantationen, peripheren Stammzelltransplantationen und Gabe von Wachstumsfaktoren (z.B. Granulocyte-Colony-Stimulating Faktor) besteht die Möglichkeit, dem Patienten toxische Aktivitäten bis zum 3-fachen über der hämatopoetischen Toleranzgrenze zu applizieren. Die Toxizität auf das hämatopoetische System kann durch fraktionierte Applikation des Radiopharmakons reduziert werden. Publikationen zeigten, dass die Gabe von Interleukin-1 und Granulocyte Macrophage-Colony-Stimulating Faktor radioprotektiv wirken. Auch die Gabe eines sekundären AK ermöglicht das Abfangen des im Blut zirkulierenden radioaktiven AK mit resultierender Reduktion der Toxizität des nicht tumorgebundenen Radiopharmakons.

Sekundäre dosislimitierende Organe sind u.a. Niere, Lunge und Leber.

Durch i.p. Applikation von RIK kann die i.p. Tumordosis erhöht und gleichzeitig die Myelotoxizität reduziert werden, da die Clearancerate aus dem Peritonealraum verzögert in die systemische Zirkulation stattfindet verglichen mit der i.v. Administration (Elgqvist<sup>(1)</sup> et al., 2006).

Studien zeigten, dass die fraktionierte RIT die Radiotoxizität bei gleicher oder höherer Gesamtaktivität im Vergleich zur einmaligen Applikation reduzierte (Buchsbaum et al., 1995; Elgqvist<sup>(1)</sup> et al., 2006; Meredith et al., 1992; Schlom et al., 1990; Schlom et al., 1991; Vriesendorp et al., 1993). Begünstigt wird auch eine Verringerung der Radiotoxizität durch Verwendung von Nukliden mit geringer Reichweite und kurzer HWZ, wie z.B. mit <sup>213</sup>Bi. Bei lokoregionaler Applikation erfolgt der Zerfall bereits größtenteils am Administrationsort. Biodistributionsstudien am Mausmodell ergaben, dass nach i.p. Applikation von <sup>213</sup>Bi-d9MAk die Aktivitäten im Blut und Gewebe 45 min und 3 h nach Applikation signifikant geringer waren im Vergleich zur i.v. Applikation (Huber et al., 2003).

Huber et al. (2003) zeigte bei der <sup>213</sup>Bi-d9MAk-Therapie am Mausmodell eine Abnahme der peripheren Leukozyten in Abhängigkeit zur i.p. applizierten Aktivität in den ersten 10 d nach Injektion mit folgender Rekonvaleszenz. Darüber hinaus konnten Chromosomenaberrationen von Knochenmarksstammzellen 1 d nach RIK-Applikation von Nacktmäusen mit fehlendem Nachweis der Chromosomenaberrationen nach 3 d, 5 d und 28 d beobachtet werden.

Huber (2003) zeigte, dass es nach i.p. Applikation von 22,2 MBq <sup>213</sup>Bi-d9MAk zu makroskopischen und histopathologischen Veränderungen der Nieren der Tiere kam. Bei 3 von insgesamt 5 Tieren traten 3 – 5 Monate nach RIK-Injektion eine Hyalinisierung der Glomerula mit folgender Sklerose sowie Schwellung mit teilweiser Atrophie des renalen Gewebes auf. Die Nieren stellten in der <sup>213</sup>Bi-Immuntherapie das dosislimitierende Organ dar. Als Ursache werden einerseits die zelluläre Aufnahme von freiem <sup>213</sup>Bi, andererseits die Absorption niedermolekularer Proteine und deren Fragmente, diskutiert.

Huber et al. (2003) konnte nach i.p. Applikation von 1,85 MBq keine Langzeittoxizität nachweisen. Auf Grund der aktuell noch geringen Verfügbarkeit von <sup>213</sup>Bi Aktivitäten soll in dieser vorliegenden Studie evaluiert werden, inwieweit geringe Aktivitäten nach einmaliger bzw. zweimaliger Applikation von <sup>213</sup>Bi-d9MAk eine strahleninduzierte Toxizität auf den murinen Organismus haben.

## 2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Optimierung der tumorzellspezifischen lokoregionalen  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk-RIT der Peritonealkarzinose des diffusen Magenkarzinoms mit Einsatz von geringen Aktivitäten auf Grund der schlechten Verfügbarkeit von  $^{213}\text{Bi}$ .

Es erfolgte die Durchführung von Untersuchungen in Vitro und in Vivo am Mausmodell hinsichtlich der therapeutischen Effizienz, des Therapiemonitorings mittels CEA-Konzentration und Körpergewichtverlaufs insbesondere in Hinblick auf eine fraktionierte (zweimalige) i.p. Applikation des Radiopharmakons.

Als Grundlage für die tierexperimentellen Versuche wurde in Vitro die Zellproliferation in Abhängigkeit zur Ausgangszellzahl, die Klonogenität der HSC45-M2-Tumorzellen nach ein- oder zweimaliger Inkubation mit dem tumorzellspezifischen  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk-Konjugat und die CEA-Konzentration im Kulturmedium in Abhängigkeit zur Zellzahl ermittelt.

In Vivo wurde die therapeutische Effizienz der ein- vs. zweimaligen i.p. Injektion des  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk-Konjugats am frühen (Situation nach R0-Resektion) und am fortgeschrittenen Tumormodell der Peritonealkarzinose mit HSC45-M2-Tumorzellen mittels Kaplan- Meier-Überlebenskurven untersucht.

Die Beurteilung des Therapieerfolgs/-versagens wurde mit regelmäßigen Messungen der CEA-Konzentration im Serum evaluiert.

Über Körpergewichtsbestimmungen und Auswertung von Autopsiedaten erfolgte eine Beurteilung der unterschiedlichen Therapiemodalitäten.

Die Radiotoxizität des  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk-Radiopharmakons auf den murinen Organismus wurde in Abhängigkeit zur applizierten Aktivität und ein- vs. zweimaligen Gabe untersucht. Die Toxizität wurde anhand der Veränderungen des hämatopoetischen Systems (Leukozyten, Erythrozyten, Thrombozyten), der Schädigung der Nieren und der Chromosomenaberrationen der Knochenmarkszellen evaluiert.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Chemikalien, Lösungen, Zellkulturmedien

Ammoniumacetat (Sigma, Steinheim, Deutschland)

L-Ascorbinsäure (Sigma, Steinheim, Deutschland)

Cellpack PK-30L (Sysmex, Norderstedt, Deutschland)

Chelating Resin, Iminodiacetic Acid, Chelex 100 (Sigma, Steinheim, Deutschland)

Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM)  $\text{NaHCO}_3$  (3,7 g/l), Glucose (4,5 g/l), Stable Glutamin (1,028 g/l), w/o Na-Pyruvat (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

Dulbecco's Phosphate Buffered Salin (PBS), Phosphatpuffer, NaCl (8 g/l), KCl (0,2 g/l),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,2 g/l),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$  (2,85 g/l), (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

EDTA 1 % in PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  (c.c. pro GmbH, Neustadt, Deutschland)

Eosinlösung wässrig 1 % (Apotheke, Klinikum Rechts der Isar, München, Deutschland)

Ethanol 70 % (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Fetal Calf Serum (Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Deutschland)

Formalin 4 %, Stammlösung 37 % (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Hanks blanced salt solution ohne  $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{Ca}^{2+}$  (Amimed, Allschwill, Schweiz)

Hämalaun (sauer) nach Mayer (Apotheke, Klinikum Rechts der Isar, München, Deutschland)

Hämatoxylin (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Kältespray, Tetrafluorethan (neoLab Migge, Heidelberg, Deutschland)

Kaliumchlorid (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Kaliumhydrogenphosphat (Merck, Darmstadt, Deutschland)

NaCl-Lösung 0,9 % (Delta-Pharma, Pfullingen, Deutschland)

Natrium-Jodid ACS Reagent (Sigma, Steinheim, Deutschland)

Penicillin/Streptomycin, 10.000 U/10.000 µg/ml (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

Shedreagenz Cellpack (Sysmex, Norderstedt, Deutschland)

Suprapur® 30 %ige HCl (Merck Darmstadt, Deutschland)

Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Tissue-Tek® O.C.T. Compound (Sakura Finotek, Niederlande, Deutschland)

Trypsin-EDTA (Biochrom, Berlin, Deutschland)

### **3.2 Medikamente**

Concanavalin A (ICN, Eschwege, Deutschland)

Demecolzin (ICN, Eschwege, Deutschland)

Diethylether (Chinosol, Seelze, Deutschland)

Heparin (Hoffmann La Roche, Grenzach-Whylen, Deutschland)

Vidisic® Augensalbe (Dr. Mann Pharma, Berlin, Deutschland)

### **3.3 Verbrauchsmaterialien**

BD Micro-Fine™+ 1ml; 0,33mm x 12,7 mm Insulinspritzen (Becton Dickison AG, Heidelberg, Deutschland)

BD Microlance™ 3, 27 G x ¾ “- Nr.20 (Becton Dickison AG, Heidelberg, Deutschland)

Centrifuge Tubes 50 ml, Plug Seal Cap/Bulk (Corning®, New York, USA)

Centrifuge Tubes 50 ml, Self-Standing, Plug Seal Cap/Bulk, (Corning®, New York, USA)

Combitip Pipetten, 5 ml/10 ml (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Deckgläschen 24 mm x 60 mm (Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland)

Film, Kodak Farbwelt 200/100 (Kodak GmbH, Stuttgart, Deutschland)

Glaswolle

Godan Medical ApS, Einmalspritzen, (Godan, Rødby, Dänemark)

ITLC SG, Instant thin-layer chromatography paper (Gelman Science, Michigan, USA)

Kaisers Glyceringelantine (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

Menzel-super Frost<sup>®</sup> Plus Gläser, Objektträger, (Menzel GmbH&CoKG, Braunschweig, Deutschland)

Nunc Kryoröhrchen (Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland)

Omnitip Pipetten, 10 µl/200 µl/300 µl/1000 µl (Abimed, Jena, Deutschland)

PD-10 Desaltin columns, Sephadex<sup>™</sup> G 25M (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden)

pH-Indikatorstäbchen, pH 4.0-7.0 (Merck, Darmstadt, Deutschland)

PP-Tube steril 15 ml, 17 mm/120 mm (Greiner bio one GmbH, Frickenhausen, Deutschland)

Probenröhrchen für  $\gamma$ -Counter

PS-Rundbodenröhrchen, 5ml (Greiner, Frickenhausen, Deutschland)

Safe-Lock Tubes 0,5 ml (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

Tissue culture plates, 24 wells, Cellstar<sup>®</sup> (Greiner bio one GmbH, Frickenhausen, Deutschland)

Zellkulturflaschen 50 ml, 28 cm<sup>2</sup>, Cellstar<sup>®</sup>, (Greiner bio one GmbH, Frickenhausen, Deutschland)

Zellkulturflaschen 250 ml, 75 cm<sup>2</sup>, Cellstar<sup>®</sup>, (Greiner bio one GmbH, Frickenhausen, Deutschland)

Zellkulturflaschen 550 ml, 175 cm<sup>2</sup>, Cellstar<sup>®</sup>, (Greiner bio one GmbH, Frickenhausen, Deutschland)

Zentrifugen-Röhrchen mit Spitzboden, 15 ml (Greiner bio one GmbH, Frickenhausen, Deutschland)

### 3.4 Geräte

$^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$  Generatoren (Institut für Transurane der Europäischen Kommission, Karlsruhe, Deutschland)

Analysewaage Satorius, Typ LA 230S-OCE (Sartorius, Göttingen, Deutschland)

Auflichtmikroskop Axiovert 10 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland)

Automated Chemiluminescence System ACS:180<sup>®</sup> (Bayer, Leverkusen, Deutschland)

Biofuge 13 (Heraeus Instruments, Osterode, Deutschland)

Blutanalysegerät SE 9000 (Sysmex, Norderstedt, Deutschland)

Brutschrank Heraeus 6000 (Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland)

Casy<sup>®</sup>-1 Cell Counter (Schärfe System, Reutlingen, Deutschland)

Chemiewaage, ISO 9001 (Sartorius, Göttingen, Deutschland)

Chemiewaage, BL 1500S (Sartorius, Göttingen, Deutschland)

Kleinbild-Spiegelreflexkamera X 300 S (Minolta, Unterföhring, Deutschland)

Kryostat Microm, Typ HM 500 (Microm, Walldorf, Deutschland)

Lamin Air<sup>®</sup> HB 2472 Flow Bank (Heraeus Instruments, Osterode, Deutschland)

Mäusewaage, Laboratory LC 1200S (Sartorius, Göttingen, Deutschland)

Megafuge 1,0 (Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland)

Milli-Q UF-Plus Membrapure (Millipore, Billerica, Mass., USA)

Trockenschrank (Heraeus Instruments, Osterode, Deutschland)

Wasserbad (Köttermann, Uetze-Hänigsen, Deutschland)

1480 Wizard<sup>™</sup>3“  $\gamma$ -counter (Wallac, Oy, Turku, Finnland)

### 3.5 Zellen und Zellkultur

#### 3.5.1 Humane Siegelringzellkarzinomzellen des Magens HSC45-M2

Die Magenkarzinomzelllinie des diffusen Siegelringzellkarzinoms HSC45-M2 (Abb. 1) wurde von der Hiroshima University (Hiroshima, Japan) zur Verfügung gestellt. Die humanen Siegelringzellen wurden 1993 aus dem Aszites einer 28-jährigen Patientin, die am diffus invasiven Magenkarzinom erkrankt war, gewonnen (Yanagihara et al., 1993). HSC45-M2 zeichnen sich durch die in-frame Mutation im Exon 9 des E-Cadherin Moleküls (s. 3.6.1) mit konsekutivem Verlust der Zelladhäsionsfunktion aus (Fukudome et al., 2000).

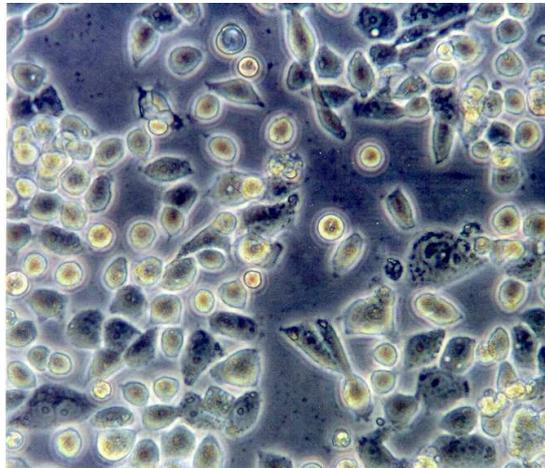


Abb. 1: mikroskopische Darstellung von HSC45-M2

#### 3.5.2 Kultivierung von HSC45-M2-Zellen

HSC45-M2 wurden in einem Kulturmedium mit der Grundsubstanz Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) in bioone Cellstar<sup>®</sup> Zellkulturflaschen kultiviert. Abhängig von der erwünschten Zellzahl wurden Flaschen der Größen 50 ml/28 cm<sup>2</sup>, 250 ml/75 cm<sup>2</sup>, 350 ml/175 cm<sup>2</sup> verwendet. Dem Medium D-MEM wurden 10 % fetales Kälberserum (FKS), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugesetzt und die Zellen mit Nährlösung im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Der pH-abhängige Indikator Phenolrot in der Zellkulturlösung zeigte die Ansäuerung des Mediums auf Grund von anfallenden Stoffwechselprodukten an. Mit Hilfe dieses

pH-Indikators und mikroskopischer Kontrolle der HSC45-M2 wurden die Zellen passagiert.

Das Lösen der Zellen vom Flaschenboden und die Subkultivierung wurden unter sterilen Bedingungen an einer Laminar-Flow-Arbeitsbank durchgeführt.

Zum Splitten der Zellen wurde mit einer abgeglühten Pasteurpipette das Medium abgesaugt. Anschließend wurden die Flaschen mit 10 ml Dulbecco's Phosphate Buffered Salin (PBS, Phosphat gepufferte Salzlösung) gespült, um Zelldetritus und verbleibendes Medium zu lösen. Nach Absaugen der Flüssigkeit wurden 7 ml einer 1mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Lösung (Grundlösung PBS) in die Flaschen gegeben. Zehn Minuten wurden die Flaschen im Wärmeschrank zur Beschleunigung der Reaktion des  $\text{Ca}^{2+}$ -Komplexbildners inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen durch Beklopfen der Flaschen vom Boden gelöst und in ein steriles Zentrifugenröhrchen pipettiert, welches bei 1500 Umdrehungen pro Minute (Upm) für 3 min zentrifugiert wurde. Der Überstand an EDTA und PBS wurde abgesaugt und das Zellpellet im Nährmedium resuspendiert. Zur Rekultivierung wurde FKS mit Penicillin/Streptomycin und D-MEM verwendet. Bei den in Vivo Versuchen wurden HCS45-M2 in D-MEM zur Tumorzellinokulation resuspendiert.

## **3.6 Radioimmunkonjugat**

### **3.6.1 delta-9-E-Cadherin-Antikörper**

Der d9MAk, ein monoklonaler AK gerichtet gegen die delta-9-Mutation des E-Cadherin Gens, wurde am Institut für Pathologie der Technischen Universität München von K.-F. Becker in Zusammenarbeit mit E. Kremmer vom Institut für Pathologie des Helmholtz Zentrum Münchens (ehemals GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit) entwickelt und in freundlicher Zusammenarbeit für diese experimentellen Studien zur Verfügung gestellt.

Der d9MAk, ein Ratten-AK, bindet spezifisch an ein Protein des mutierten Zelladhäsionsmoleküls E-Cadherin der HSC45-M2 Zelllinie des diffusen Magenkarzinoms vom Siegelringzelltyp.

Die in-frame Deletion des Exons 9 der E-Cadherin messenger-RNA der HSC45-M2-Zellen führt zu einer Fusionierung von Exon 8 und 10 mit konsekutiver Produktion eines veränderten Genprodukts.

Durch Hybridomatechnik wurde ein spezifischer AK gegen das delta-9-E-Cadherin-Zelladhäsionsmolekül produziert.

Zur Herstellung eines spezifischen AK wurde ein aus 13 Aminosäuren (Pro-Ile-Phe-Asn-Pro-Thr-Thr-Gly-Leu-Asp-Phe-Glu-Ala) bestehendes Peptid hergestellt und an Keyhole limpet hemocyanin (KLH) gebunden. Das AG, gelöst in PBS und emulsiert in „Freund's complete adjuvant“, wurde i.p. und s.c. Lou/C Ratten injiziert. Nach 4-wöchiger Immunisierung fand ein abschließende Boosterung i.p. und s.c. ohne Adjuvans statt. Drei Tage nach der letzten Stimulation wurden die gewonnenen aktivierten Plasmazellen der weißen Pulpa der Milz der Ratten mit der Myelomzelllinie P3X63-Ag8.653 fusioniert. Mittels Enzyme Linked Immuno-Sorbent-Assays (ELISA) wurde der spezifische Klon, der gegen das Fusionsprotein gerichtet war, aus den entstandenen Hybridomzellen isoliert. Dieser der Immunglobulinklasse IgG2a zugehörige d9MAk bindet spezifisch an die oben beschriebene Mutation (Becker et al., 1999).

Zur Koppelung des d9MAk an das metallische Nuklid  $^{213}\text{Bi}$  wurde ein geeignetes Chelat benötigt. Die Chelatierung wurde durch das Institut für Transurane der Europäischen Kommission in Karlsruhe durchgeführt.

Zur Chelatierung von d9MAk wurde das Molekül SCN-CHX-A“-DTPA (2-(4-isothiocyanatobenzyl)-trans-cyclohexyldiethylenetriamin-Pentaacetat) verwendet. SCN-CHX-A“-DTPA zeichnet sich durch seine Bifunktionalität aus, die nötig ist, um das Radionuklid  $^{213}\text{Bi}$  an den AK zu binden. Zudem ist das Chelat thermodynamisch und kinetisch höchst stabil. Jeweils werden 3 - 5 DTPA Moleküle pro AK gebunden. Das Chelat reagiert mit dem AK unter einer Schwefelbrückenbildung zwischen der freien Thioharnstoffgruppe des Chelats und einer freien  $\text{NH}_2$ -Gruppe von Lysinketten des d9MAk (Garmestani et al., 2001; Senekowitsch-Schmidtke et al., 2001).

### 3.6.2 Radionuklid

#### 3.6.2.1 $^{213}\text{Bi}$ Bismut

Das Generatorkern  $^{213}\text{Bi}$  entsteht durch den Zerfall von  $^{225}\text{Ac}$  Actinium ( $^{225}\text{Ac}$ ). Es zerfällt weiter in  $^{213}\text{Po}$  Polonium ( $^{213}\text{Po}$ ) (97,8 %) und  $^{209}\text{Tl}$  Thallium ( $^{209}\text{Tl}$ ) (2,2 %). Aus den beiden entstandenen Nukliden entsteht  $^{209}\text{Pb}$  Blei ( $^{209}\text{Pb}$ ). Nach 3,25 h erfolgt der Zerfall in das stabile  $^{209}\text{Bi}$  Bismut ( $^{209}\text{Bi}$ ) (Ballangrud et al., 2001) (Abb. 2). Beim Zerfall von  $^{213}\text{Po}$  zu  $^{209}\text{Pb}$  werden  $\alpha$ -Teilchen (Heliumkerne) mit einer Energie von 8,5 MeV emittiert. Dies stellt die eigentliche  $\alpha$ -Emission im Zerfall von  $^{213}\text{Bi}$  dar. Neben der therapeutisch relevanten  $\alpha$ -Strahlung entsteht beim  $^{213}\text{Bi}$ -Zerfall  $\gamma$ -Strahlung mit einem Energiemaximum bei 440 keV. Diese wurde zur Bestimmung der  $^{213}\text{Bi}$ -Aktivität am  $\gamma$ -Counter nach Eluierung aus dem  $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$  Generator genutzt (s. 3.6.2.2).

$^{213}\text{Bi}$  eignet sich durch seine geringe HWZ (45,6 min), der kurzen Reichweite ( $\sim 60 \mu\text{m}$ ), dem hohem LET ( $\sim 100 \text{ keV}/\mu\text{m}$ ) und der daraus resultierenden starken Zytotoxizität für die RIT von disseminierten Tumorerkrankungen (Nikula et al., 1999). Im Vergleich zu den in der Klinik häufig verwendeten  $\beta$ -Nukliden ist der LET bei  $^{213}\text{Bi}$  bis zu 1500-mal höher. 15 Minuten nach Injektion von  $^{213}\text{Bi}$  sind 80 % der Aktivität vorhanden und 3 h nach Radionuklidinjektion bestehen lediglich nur noch 6 % der anfänglichen Aktivität (Ma et al., 2001; McDevitt et al., 1998).

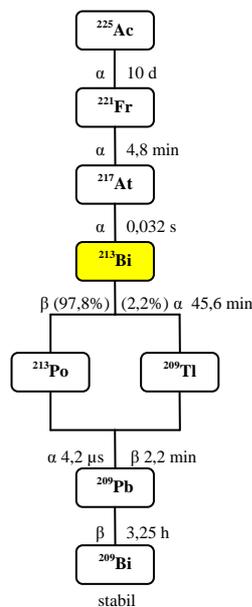


Abb. 2:  $^{225}\text{Ac}$  Actinium Zerfallsschema:  $^{225}\text{Ac}$ -Zerfall über  $^{213}\text{Bi}$  in das stabile  $^{209}\text{Bi}$

### 3.6.2.2 $^{213}\text{Bi}$ -Eluierung aus dem $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generator und Radionuklidkonjugation des delta-9-E-Cadherin-Antikörpers

Die  $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generatoren wurden vom Institut für Transurane der Europäischen Kommission in Karlsruhe für diese Forschungsarbeit zur Verfügung gestellt. Neben dem Institut für Transurane kann das Generatorsystem vom Oak Ridge National Laboratory (Oak Ridge, TN, USA) bezogen werden.

Zur Herstellung der Generatoren wurden 740 – 2590 MBq  $^{225}\text{Ac}$  an etwa 220 mg trockenem AGMP-50 Kationen-Austauscherharz (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) adsorbiert. Anschließend wurde die Verbindung in das Generatorsystem, bestehend aus einem Fluorpolymerschlauch (5,5 cm,  $r=3,2$  mm), überführt. Am Anfang und Ende des  $^{225}\text{Ac}$ /Kationenaustauscherharz-Gemisches waren Verschlussstöpsel angebracht. Eine weitere Kationenaustauscherharzsäule war am Ende des Systems, um als externe Sicherung zu dienen. Im letzten Herstellungsschritt wurde der Schlauch mit einer 0,01 M HCl Lösung befüllt, welche im System verblieb (Abb. 3).

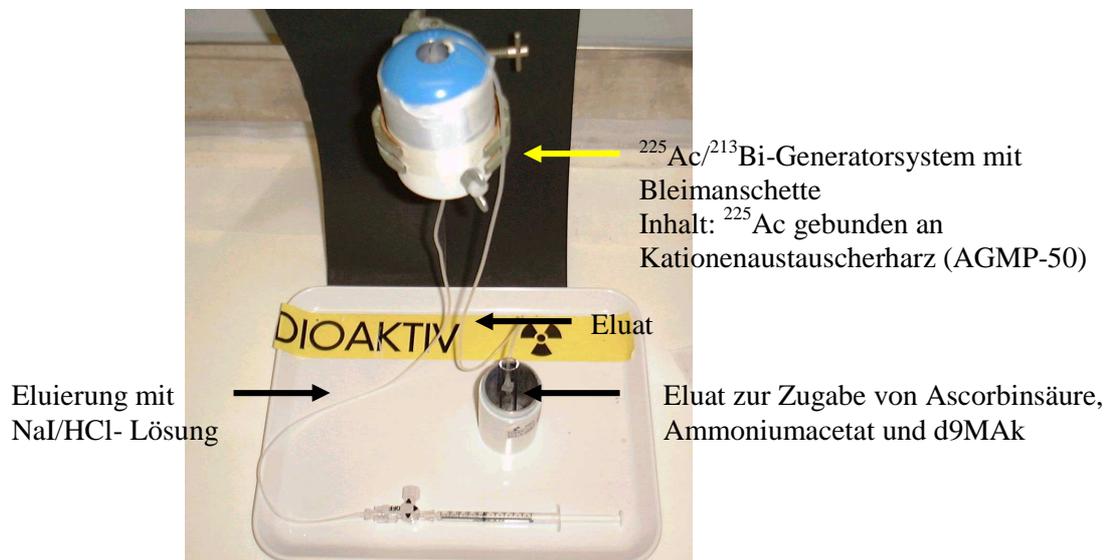


Abb. 3:  $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generatorsystem

Mit den verwendeten  $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generatoren konnte in vorangegangenen Studien in 5-stündigen Intervallen eine maximale Ausbeute von Aktivitäten zwischen 18,5 MBq bis 370 MBq über einen Zeitraum von mehreren Wochen gewonnen werden.

Um eine fehlerhafte Bindungsreaktionen zu verhindern, wurden in allen Prozessen metallfreie Chemikalien und Gefäße verwendet. Falls eine Metallfreiheit nicht auszuschließen war, wären die Reagenzien primär mit Chelex 100 gereinigt worden (McDevitt<sup>(2)</sup> et al., 1999).

Das Schlauchsystem des Generators war während den Eluationspausen mit 2 ml 0,01 M HCl Lösung befüllt. Im ersten Schritt wurde HCl mit Raumluft aus dem Schlauchsystem verdrängt, um anschließend 600  $\mu\text{l}$  NaI/HCl-Lösung (300  $\mu\text{l}$  0,2 M NaI und 300  $\mu\text{l}$  0,2 M HCl) in das Generatorsystem zu pressen. Nach 2-minütiger Inkubation (während dieser Phase musste NaI/HCl kontinuierlich in Bewegung bleiben) entstanden nach Verdrängung der Flüssigkeit ( $\text{BiI}_5$ )<sup>2-</sup> Anionen und 0,1 M HI. Dieser 600  $\mu\text{l}$   $^{213}\text{Bi}$ -Lösung wurde ca. 100  $\mu\text{l}$  3 M Ammoniumacetat ( $\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$ ) zugesetzt, um einen Ziel-pH-Wert von 5,3 zu erreichen. Bei insuffizienter pH-Einstellung konnte dieser Wert durch Zugabe von 2 M HCl optimiert werden. Weitere 100  $\mu\text{l}$  4 %iger Ascorbinsäure wurden als Radikalfänger dem Eluat zugeführt. Abschließend wurden ca. 100  $\mu\text{g}$  SCN-CHX-A''-DTPA-chelatierter d9MAk zugefügt, die Lösung gut gemischt und bei Raumtemperatur 5 – 10 min inkubiert. Die Markierungsausbeute, d.h. der Anteil des an d9MAk gebundenen  $^{213}\text{Bi}$ , wurde mit Hilfe einer Papierchromatographie mit ITLC SG Papier (Instant Thin Layer Chromatography) im  $\gamma$ -Counter bestimmt. Zur Gewinnung des reinen Produkts  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk musste dieses vom ungebundenem  $^{213}\text{Bi}$  getrennt werden. Hierfür wurde das Eluat ( $^{213}\text{Bi}$ ,  $\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$ , evtl. HCl, Ascorbinsäure, d9MAk) in die PD 10 Gelfiltrationssäule pipettiert und mit 2 ml PBS aufgefüllt. Im Anschluss wurde das  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk-Produkt mit 2 ml PBS aus der Säule gewaschen.

Der gebundene Anteil nach Abtrennung wurde erneut mit ITLC SG Papier mit Hilfe des  $\gamma$ -Counters bestimmt. Es erfolgte die Berechnung der spezifischen Aktivität (Bq/mg AK) für jede Eluierung und die Berechnung der Konzentrationverhältnisse von d9MAk-Molekülen und eingesetzten  $^{213}\text{Bi}$ -Atomen. Die Berechnung der Anzahl der Antikörpermoleküle erfolgte nach Gleichung 1. Die Berechnung der Anzahl der  $^{213}\text{Bi}$ -Atome erfolgte nach Gleichung 2.

$$N_{AK} = (X \cdot N_A) / M_m$$

$N_{AK}$ :	Anzahl der Antikörpermoleküle	
$X$ [g]:	Menge des Antikörpers nach Gelfiltration	
$N_A$ [mol <sup>-1</sup> ]:	$6 \cdot 10^{23}$	Avogadro Konstante
$M_m$ [g/mol]:	150.000	Molekulargewicht eines IgG Antikörper

**Gleichung 1: Berechnung der Anzahl der Antikörpermoleküle ( $N_{AK}$ )**

$$N_{Bi} = (A_{Bi} \cdot t^{1/2}) / \ln 2$$

$N_{Bi}$ :	Anzahl der <sup>213</sup> Bi-Atome	
$A_{Bi}$ [Bq]:	<sup>213</sup> Bi-Aktivität	
$t^{1/2}$ [s]:	2760	

**Gleichung 2: Berechnung der Anzahl der <sup>213</sup>Bi-Atome**

## 3.7 In Vitro Versuche

### 3.7.1 Zellproliferationstests

Das Zellwachstum der humanen Siegelringzellen HSC45-M2 wurde über einen maximal 15-tägigen Zeitraum (360 h) evaluiert, um das Proliferationsverhalten der Tumorzellen zu bestimmen.

Pro 28 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche wurden  $1 \times 10^3$  HSC45-M2 in 7 ml Nährmedium und pro 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche  $1 \times 10^5$  bzw.  $1 \times 10^6$  HSC45-M2 in 15 ml Medium als Ausgangszellzahl kultiviert. Zum Versuchsstart wurden je 30 Flaschen à  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^5$  oder  $1 \times 10^6$  Zellen vorbereitet. Während des Versuchsverlaufs wurde das Nährmedium in den Kulturflaschen nicht erneuert. In 24-stündigen Intervallen nach Zellaussaat wurde pro Messzeitpunkt von je zwei Kulturflaschen der jeweiligen Ausgangszellzahl die aktuelle Zellzahl pro Flasche bestimmt.

Die HSC45-M2-Zellen wurden nach zweimaligem Ablösen mit 1 mM EDTA-Lösung aus den Zellkulturflaschen mit D-MEM in Centrifuge Tubes resuspendiert. Anschließend wurden die Zellzahlen im Casy<sup>®</sup>-1 Cell Counter bestimmt, gemittelt und graphisch dargestellt.

Analog zu Seidenschwang (2006) wurde zur Berechnung der Verdoppelungszeit die mathematische Funktion der Exponentialgleichung verwendet, welche die Zellproliferation beschreibt.

Hierzu wurde die gemessene Zellzahl gegen den Messzeitpunkt graphisch aufgetragen und mit Hilfe der Computersoftware Excel eine dazugehörige Trendlinie als Exponentialfunktion erstellt. Zusätzlich wurden der Korrelationskoeffizient ( $r^2$ ) zur Trendlinie und die entsprechende Exponentialgleichung berechnet und dargestellt. Die Berechnung der Verdoppelungszeit ( $x_2 - x_1$ ) erfolgte aus den Größen  $b$  (Zellzahl),  $c$  (Exponent) und  $e=2,718\dots$  (Eulersche Zahl) (Gleichung 3 und 4).

$$y = b \cdot a^{c \cdot x} \qquad y = b \cdot e^{c \cdot x}$$

**Gleichung 3: allgemeine und spezielle Exponentialfunktion**

$$\begin{aligned} 2 \cdot y_1 &= y_2 \\ 2 \cdot b \cdot e^{c \cdot x_1} &= b \cdot e^{c \cdot x_2} \\ \frac{1}{2} &= b \cdot e^{c \cdot x_1} / b \cdot e^{c \cdot x_2} = e^{c \cdot (x_1 - x_2)} \\ \ln \frac{1}{2} &= c \cdot (x_1 - x_2) \\ x_2 - x_1 &= -(\ln \frac{1}{2} / c) \end{aligned}$$

**Gleichung 4: Berechnung der Verdoppelungszeit ( $x_2 - x_1$ )**

### 3.7.2 CEA-Konzentration im Medium

Neben der Zellzahlbestimmung der HSC45-M2 (s. 3.7.1) wurde der CEA-Level im Nährmedium der einzelnen Zellkulturflaschen bestimmt. Anschließend konnte der CEA-Konzentrationsverlauf in Korrelation zur spezifischen Zellzahl pro Kulturflasche dargestellt werden. Die in Vitro CEA-Bestimmungen dienten als Vortest für die in Vivo Versuche, welche zur Evaluierung des Therapieerfolgs nach HSC45-M2-Inokulation und  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$ -Therapie, die Bestimmung der CEA-Konzentration im Serum und Aszites beinhaltete (s. 3.8.4 und 3.8.5).

Vor Ablösung der Tumorzellen aus den Kulturflaschen wurde das Nährmedium abpipettiert und in PP-Tubes überführt. Um zu verhindern dass Zellen oder Zellreste im entnommenen Medium gelöst waren, wurde das Nährmedium bei 1500 Upm für 3 min

zentrifugiert. Anschließend wurde je Probenröhrchen 1 ml Flüssigkeit entnommen, steril in Nunc Kryoröhrchen gefüllt und anschließend bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Die CEA-Konzentration wurde unter Verwendung des Automatischen Chemilumineszenz-Systems ACS:180<sup>®</sup> der Firma Bayer bestimmt. Mit Hilfe des nach der Sandwichmethode ansetzenden Immunoassays können Konzentrationen von 0,5 ng/ml bis 100 ng/ml bestimmt werden. Bei höheren Konzentrationen erfolgte eine Verdünnung des zu untersuchenden Mediums mit erneuter Testung und anschließender Berechnung der Konzentration des Ausgangsmediums. Alle Arbeitsschritte wurden analog zur Gebrauchsanweisung mit freundlicher Unterstützung des RIA-Labors, der Nuklearmedizinischen Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München durchgeführt (Bayer Cooperation, Automated Chemiluminescence System ACS: 180<sup>®</sup>, 2000; Bloechl et al., 2005).

### 3.7.3 Klonogener Test

Die klonogenen Tests wurden durchgeführt, um Veränderungen der Tumorzellproliferation nach ein- oder zweimaliger  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk-Inkubation in Abhängigkeit zur eingesetzten Aktivität in Vitro zu evaluieren.

Nach Ablösung der HSC45-M2 aus den Zellkulturflaschen (s. 3.5.2) und Bestimmung der Zellzahl wurden die Tumorzellen mit je 1 ml Nährmedium in die einzelnen Plattenvertiefungen der 24-well Platten überführt.

Für die  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk-Applikationsschemata wurden je 7 Platten mit 50 Zellen/ml/well und weitere 7 Platten mit 100 Zellen/ml/well beimpft.

Alternativ wurden die sieben Platten mit 1 x 0,185 MBq, 2 x 0,185 MBq, 1 x 0,37 MBq, 2 x 0,37 MBq, 1 x 0,74 MBq oder 2 x 0,74 MBq  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk-RIK pro well inkubiert. Zur Kontrolle diente je eine Platte mit 50 und 100 Zellen pro well ohne  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk-Applikation.

Die erste bzw. einmalige Applikation des RIK wurde 24 h nach Zellaussaat durchgeführt, die zweite Gabe 7 d später. Die Auswertung wurde 15 d nach Subkultivierung der Zellen vorgenommen. Die entstandenen Klone der HSC45-M2-Zellen pro well wurden unter dem Mikroskop (Axiovert 10) ausgezählt. 15 Tage nach Subkultivierung zeigte die Indikatorsubstanz des Nährmediums keinen

Umschlag in den sauren Bereich, somit ließ sich ein eventuell reduziertes Zellwachstum auf Grund limitierender Nährstoffe ausschließen.

Als Klon wurde ein Zellhaufen von mindestens 20 HSC45-M2-Zellen definiert. Aus der Klonanzahl pro well einer 24 well-Platte wurde der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (MW  $\pm$  SD) berechnet und mittels graphischer Darstellung (Säulen-, Boxplott-Diagrammen und Häufigkeitsverteilungen) die statistische Auswertung vorgenommen (s. 3.11).

## **3.8 In Vivo Versuche**

### **3.8.1 Versuchstiere**

#### **3.8.1.1 Tierart**

Für die in Vivo Experimente wurden weibliche Swiss nu/nu Mäuse und weibliche Balb/c Mäuse als Versuchstiere verwendet. Die Tiere wurden im Alter von 5 - 7 Wochen aus pathogenfreier Zucht der Firma Charles River Laboratories (Frankreich) erworben.

Swiss nu/nu Mäuse zeichnen sich durch ein inkompetentes Immunsystem auf Grund einer mangelhaften Entwicklung des Thymusgewebes mit Thymushypoplasie aus. Die folgende Reduktion der T-Zellen verursacht eine starke Supprimierung des zellulären Immunsystems und partielle Defekte in der B-Zell-Produktion führen zu einem geschwächten knochenmarksgebundenen humoralen Immunsystem. Swiss nu/nu Mäuse eignen sich in der Tumorforschung zur Xenotransplantation von humanen Tumoren, dermatologischen, endokrinologischen und immunologischen bzw. inflammatorischen Forschung von Erkrankungen (Charles River Laboratories International, Inc.<sup>(1)</sup>, Stand: 03.01.2009). Weibliche Swiss nu/nu Mäuse wurden für das Xenotransplantatmodell mit HSC45-M2 für die RIT mit  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$  (s. 3.8.3), die CEA-Bestimmung im Serum und Aszites (s. 3.8.4 und 3.8.5), Evaluation des Tiergewichts mit/ohne Therapie (s. 3.8.9) und Studien zur Toxizität von  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$  (s. 3.8.10.1 und 3.8.10.3) verwendet.

Balb/c Mäuse weisen sich durch ein funktionierendes Immunsystem aus und können für verschiedenste Tierstudien eingesetzt werden, insbesondere aber auch zur Produktion von Hybridomzellen und AK oder Studien von Infektionskrankheiten (Charles River Laboratories International, Inc.<sup>(2)</sup>, Stand: 03.01.2009). Für Chromosomenanalysen nach <sup>213</sup>Bi-d9MAk-Applikation (s. 3.8.10.2) wurden Balb/c Mäuse mit funktionstüchtigem Immunsystem eingesetzt.

### **3.8.1.2 Tierhaltung**

Maximal fünf Mäuse wurden pro Käfig tierartfreundlich bei einer Raumtemperatur von 26°C, 50 - 60 % Luftfeuchtigkeit auf Holzspanstreu mit Versteckmöglichkeiten (Tücher und Papierrollen) eingestallt. Zur Versorgung wurde Mäusestandarddiätfutter Atromin 1314 und Leitungswasser aus Standardtrinkflaschen ad libitum zur Verfügung gestellt. Zur Reduktion der Gefahr einer Übertragung von mäusepathogenen Keimen durch den Menschen erfolgte das Einhalten von Hygienebestimmungen (Haarnetz, Mundschutz, Kittel, Handschuhe, Füßlinge) und Reinigung der Arbeitsflächen mit 70 %igem Alkohol.

Nach 14-tägiger Adaption der Tiere im Tierstall wurde mit den Versuchen begonnen.

Die in Vivo Experimente wurden mit Genehmigung der Regierung von Oberbayern, Aktenzeichen 209.1/211-2531-81/02 2002 durchgeführt.

### **3.8.2 Modell der Peritonealkarzinose**

Durch i.p. HSC45-M2-Tumorzellinokulation bei Swiss nu/nu Mäusen wurde die peritoneale Tumorausbreitung des diffusen Magenkarzinoms imitiert und die Effizienz der einmaligen vs. zweimaligen Applikation des tumorspezifischen <sup>213</sup>Bi-d9MAk-RIK evaluiert. Zudem wurden die CEA-Konzentration und das Tiergewicht im Zeitverlauf nach i.p. Tumorzellinjektion mit bzw. ohne Therapie bestimmt.

Huber (2003) zeigte, dass bereits 2 d nach i.p. Inokulation von  $1 \times 10^7$  HSC45-M2-Zellen die Tiere bei Autopsie eine beginnende peritoneale parapankreale Metastasierung aufwiesen. Acht Tage nach Inokulation zeigte sich eine ausgedehnte

peritoneale Karzinose mit diaphragmalen, parapankrealen und mesenterialen Metastasen.

Analog zu diesen Erkenntnissen wurde die  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk-Therapie am Modell der frühen Peritonealkarzinose (d.h. Situation nach R0-Resektion) mit Therapiebeginn 24 h nach Tumorzellinokulation und am Modell der fortgeschrittenen Peritonealkarzinose mit metastatischer Organinvasion mit Therapiebeginn 8 d nach HSC45-M2-Injektion evaluiert.

Nach Kultivierung von HSC45-M2 wurden die Zellen aus den 175 cm<sup>2</sup>-Flaschen abgelöst (s. 3.5.2). Um die Konzentration von extrazellulärem Schleim und aggressiven Zellsubstanzen zu reduzieren, wurden die Siegelringzellen zusätzlich dreimal mit D-MEM gespült und jeweils bei 1500 Upm für 3 min zentrifugiert. Die Zellzahl wurde mit dem Casy<sup>®</sup>-1 Cell Counter bestimmt. Pro Maus wurden  $1 \times 10^7$  Zellen gelöst in 500 µl D-MEM i.p. injiziert, wodurch eine gleichmäßige Verteilung der malignen Zellen im Peritonealraum gesichert werden sollte. Zur i.p. Injektion wurden Kanülen von BD Microlance<sup>TM</sup> 3, 27 G  $\frac{3}{4}$  “-Nr.20 und Einmalspritzen Godan Medical ApS verwendet. Zum Schutz der abdominalen Organe vor Verletzungen wurde der Injektionspunkt auf der Linea alba, kaudal des Nabels gewählt und die Applikation im 20 - 30° Winkel nach rechts-kranial durchgeführt.

### 3.8.3 Radioimmuntherapie mit $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk

Auf Grund der geringen Verfügbarkeit von  $^{213}\text{Bi}$  wurden in dieser Studie, die im Vergleich zu Huber (2003) und Huber et al. (2003) eingesetzten i.p. applizierten Aktivitätsmengen in Vivo reduziert. Über fraktionierte Gabe der reduzierten Aktivitäten des  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk-Konjugats sollte das Therapieergebnis optimiert werden.

Im Anschluss an die  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk-Konjugation und Bestimmung der Aktivität (s. 3.6.2.2) wurde das RIK zur in Vivo Applikation vorbereitet. Das RIK wurde mit der errechneten Menge PBS verdünnt, die zum Erhalt der erwünschten Aktivität nötig war. Anschließend wurde den Mäusen das  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk-Konjugat in einem Volumen von 500 µl PBS i.p. appliziert, um eine gleichmäßige abdominale Verteilung zu gewährleisten. Die Durchführung der Punktion und die verwendeten Instrumentarien waren vergleichbar mit denen bei der Tumorzellinokulation (s. 3.8.2).

Die Therapiestudien dienten zur Evaluation der Effizienz der einmaligen vs. zweimaligen fraktionierten Applikation des  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk-Konjugats in Abhängigkeit vom Tag der Zellinokulation.

Die fraktionierte RIT entsprach einer zweimaligen Applikation der gleichen Aktivität des RIK im Abstand von 7 d.

Im Intervall von 1 d oder 8 d nach i.p. Tumorzellinokulation erhielten die Versuchstiere eine bzw. erste i.p. Injektion des RIK. Versuchsgruppen des fraktionierten Therapiemodells wurden nach weiteren 7 d erneut das RIK i.p. appliziert.

Bei Therapiebeginn 1 d nach Tumorzellinokulation wurden die Tiere mit einmalig 0,37 MBq oder 0,74 MBq bzw. zweimalig im Intervall von 7 d mit 0,37 MBq oder 0,74 MBq behandelt.

Bei Therapiebeginn 8 d nach Zellinjektion wurden bei einmaliger Applikation 0,37 MBq, 0,74 MBq oder 1,48 MBq des RIK appliziert und bei fraktionierter Applikation zweimalig 0,37 MBq oder 0,74 MBq im Zeitintervall von 7 d (8 d und 15 d nach Tumorzellinokulation). Zur Kontrolle dienten untherapierte tumorzellinokulierte Mäuse.

Die Tiere wurden über einen maximalen Zeitraum von 250 d nach Tumorzellinokulation beobachtet. Besondere Aufmerksamkeit lag auf der Reduktion des Allgemein- und Ernährungszustandes, krankhaften körperlichen Veränderungen (z.B. Petechien, anämisches Hautkolorit, sichtbare intraabdomineller Raumforderung, Aszitesbildung) und Verhaltensabweichungen der Tiere (z.B. Apathie), welche für eine Tumorprogression sprachen. Als Abbruchkriterien hinsichtlich der Überlebenszeit dienten eine Abdomenumfangszunahme als Zeichen des i.p. Tumorwachstums, Tumorkachexie und palpabler Aszites verbunden mit einem reduzierten Allgemeinzustand der Tiere.

Zur Verifizierung der Todesursache wurden die Versuchstiere obduziert. Tiere mit einem Überleben von mehr als 250 d wurden nach Studienabschluss obduziert, um eine eventuell okkulte Peritonealkarzinose verifizieren zu können.

### 3.8.4 Bestimmung der CEA-Konzentration im Serum

Die CEA-Konzentration wurde im Therapieverlauf als auch post mortem im Serum der Swiss nu/nu Mäuse bestimmt. Das Ziel war die Evaluierung des CEA-Konzentrationsverlaufs als Parameter zur Kontrolle des Erfolgs der  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk-Therapie bzw. Tumorprogression nach i.p. Inokulation von humanen Siegelringzellen des diffusen Magenkarzinoms.

Die Bestimmung der CEA-Konzentration wurde, dank freundlicher Unterstützung des RIA-Labors der Nuklearmedizinischen Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München, mit dem Automated Chemiluminescence System ACS:180<sup>®</sup> der Firma Bayer durchgeführt (s. 3.7.2).

Zur Erfolgskontrolle der RIT nach i.p. Zellinokulation wurde die CEA-Konzentration im Serum der Versuchstiere im wöchentlichen Intervall bestimmt. Zur Verifizierung eines nicht erhöhten CEA-Ausgangswertes wurde die erste Blutabnahme vor der Tumorzellinjektion durchgeführt.

Die Swiss nu/nu Mäuse erhielten nach Inokulation mit HSC45-M2 im Intervall von 8 d entweder einmalig 0,37 MBq (n = 1) oder 0,74 MBq (n = 1) i.p. appliziert bzw. bei fraktionierter Applikation am 8. und 15. Tag nach Zellinjektion entweder 0,37 MBq (n = 1) oder 0,74 MBq (n = 2). Eine weitere Gruppe erhielt keine Therapie (n = 2) nach HSC45-M2-Inokulation.

Um eine Erhöhung des CEA-Wertes durch eine Immunreaktion, z.B. im Rahmen einer strahleninduzierten Kolitis, auszuschließen, wurde bei Swiss nu/nu Mäusen, denen lediglich das RIK ohne Tumorzellinokulation in variablen Aktivitäten (1 x 0,37 MBq, 2 x 0,37 MBq, 1 x 0,74 MBq, 2 x 0,74 MBq, 1 x 7,4 MBq, 1 x 14,8 MBq, 1 x 22,2 MBq mit je n = 2) appliziert wurde, die CEA-Konzentration im Serum einmalig bestimmt.

Bei jeder Entnahme wurden ~100 µl Blut unter Äther Kurznarkose (s. 3.8.6) aus der Vena jugularis entnommen und in ein Eppendorfgefäß gefüllt. Nach Gerinnung wurde das Blut in der Biofuge 13 bei 1600 Upm für 6 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Serum entnommen und in einem Nunc Kryoröhrchen bei -20°C eingefroren, um am Versuchsendpunkt alle entnommenen Proben mit dem Automated Chemiluminescence System ACS:180<sup>®</sup> der Firma Bayer auswerten zu können.

Post mortem wurde die CEA-Konzentration im Serum der Tiere und von einem Teil der im Studienzeitraum autopsierten Tieren aus den Therapiestudien (s. 3.8.3) bestimmt. Nach Tötung in CO<sub>2</sub>-Gas (s. 3.8.6) wurden die Tiere dorsal gelagert und der Thorax durch eine Sternotomie eröffnet. Die Aorta ascendens wurde mit einer Schere durchtrennt und das ausströmende Blut mit einer Insulinspritze aufgenommen und in ein Eppendorfgefäß überbracht. Im Anschluss wurde das geronnene Blut zentrifugiert, das Serum in Nunc Kryoröhrchen eingefroren und die CEA-Konzentration im Verlauf ausgewertet.

Insgesamt konnte das Serum-CEA von 35 tumorzellinokulierten Tieren nach Euthanasie bestimmt werden.

### **3.8.5 Bestimmung der CEA-Konzentration im Aszites**

Nach dem Abbruchkriterium der progredienten malignen Aszitesentstehung auf Grund der fortschreitenden abdominellen Metastasierung wurden Mäuse mit Aszites in CO<sub>2</sub>-Gas euthanasiert (s. 3.8.6). Für die Antigenspiegel-evaluation im Aszites wurden Mäuse (n = 5) aus den Therapiestudien (s. 3.8.3) verwendet.

Um eine reine Aszitesgewinnung ohne Verfälschung des CEA-Wertes durch Vermischung des malignen Exsudats mit Blutbestandteilen durch eine diaphragmale Leckage sicherzustellen, wurde auf die primär thorakale Eröffnung mit Durchtrennung der Aorta zum Ausbluten verzichtet.

Zur Bestimmung der CEA-Konzentrationen im Aszites wurden die Versuchstiere dorsal gelagert, das Abdomen im Sagittalschnitt eröffnet, der Aszites in eine Spritze aufgenommen und in ein Eppendorfgefäß überführt. Zur Separierung des malignen Exsudats von zellulären Bestandteilen wurden die Probengefäße bei 1600 U<sub>pm</sub> 3 min zentrifugiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit abpipettiert, in einem Nunc Kryoröhrchen bei -20°C eingefroren und die CEA-Bestimmung im Verlauf mit dem ACS:180<sup>®</sup> der Firma Bayer durchgeführt (s. 3.7.2).

### **3.8.6 Anästhesie, Euthanasie und Obduktion**

Zur i.p. Applikation von HSC45-M2-Zellen,  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$ , Concanavalin A (s. 3.8.10.2), Demecolzin (s. 3.8.10.2) und zur i.v. Blutentnahme erhielten die Tiere eine Äther-Kurzarkose. Die Swiss nu/nu und Balb/c Mäuse wurden hierfür einzeln in ein geschlossenes Glasgefäß gesetzt, indem sich ein äthergetränktes Tuch befand. Nach Sedierung und Muskeler schlaffung wurde das Tier aus dem Gefäß entnommen und für die weiteren Arbeitsschritte auf ein OP-Tuch gebettet.

Die Euthanasie der Tiere wurde mit  $\text{CO}_2$ -Gas in einem geschlossenen System durchgeführt. Nach Sicherstellung eines Atem- und Kreislaufstillstandes wurde zur Entblutung der Organe der Thorax durch eine mediane Sternotomie eröffnet, die Aorta am Arcus aortae durchtrennt und im Anschluss eine Obduktion mit makroskopischer Beurteilung der Organsysteme durchgeführt.

### **3.8.7 Auswertung der Autopsiedaten**

Nach den Abbruchkriterien (s. 3.8.3) mussten die Tiere aus den Versuchsgruppen während des Studienverlaufs euthanasiert werden. Es erfolgte die Bestimmung des Körpergewichts (KG). Im Anschluss wurde eine ausführliche Autopsie mit Erstellung eines Protokolls durchgeführt. Dieses erfasste Faktoren zur Allgemeinkonstitution (apathisch, kachektisch, behaart), Aszites (Menge, Farbe, Konsistenz), Tumorlokalisation, Caput medusae und weitere pathologische Befunde. Die Bewertung erfolgte mit Schulnoten (1-6) und Mengen-/Größenangaben zur bestmöglichen retrospektiven Auswertung (s. 4.3.2 und 4.3.3).

### **3.8.8 Histopathologische Beurteilung von Organpräparaten**

#### **3.8.8.1 Herstellung von Kryostat-Gewebeschnitten**

Bei primärer unklarer Todesursache, d.h. der Tod des Tieres konnte nicht durch infiltrativ verdrängendes Wachstum der Peritonealkarzinose begründet werden, wurden bei diesen Tieren Schnitte ausgewählter Organe angefertigt. Zudem wurden auch Schnitte von Tumoren nach i.p. HSC45-M2-Inokulation erstellt. Nach dem Tod der

Tiere wurden entsprechende Organe oder Tumore entnommen und in kühlem PBS gereinigt und abgetupft. Anschließend wurden die Gewebestücke auf einen Objektträger des Kryostaten überführt, mit O.C.T. Compound (Tissue Tek) fixiert und gefroren. Bei  $-18^{\circ}\text{C}$  wurden  $6\ \mu\text{m}$  dicke Schnitte angefertigt und auf gereinigten und silanisierten Objektträgern fixiert und gefärbt.

### 3.8.8.2 Färbung der Präparate mit Hämatoxylin-Eosin

Die Gefrierschnitte wurden mit dem Hämatoxylin-Eosin (H.E.) Protokoll gefärbt und histopathologisch begutachtet.

<i>Wirkstoff/Arbeitsablauf</i>	<i>Zeit</i>
Hämalaun (nach Mayer)	5 min
Leitungswasser	10 min
Aqua dest.-Spülung	30 sek
Eosin wässrig	30 sek - 1 min
Aqua dest.-Spülung	30 sek
Trocknen bei $47^{\circ}\text{C}$ im Wärmeschrank	
Eindeckung der Schnitte mit Kaisers Glyceringelatine und Deckglas	

### 3.8.9 Bestimmung des Tierkörpergewichts

Der Gewichtsverlust, als Zeichen einer organischen Schädigung nach radioaktiver Bestrahlung, repräsentiert kumulative Effekte verschiedener Organsysteme.

Das KG der Versuchstiere wurde vor und nach Tumorzellinokulation und i.p. Applikation des  $^{213}\text{Bi}$ -Immunkonjugats kontrolliert. Darüber hinaus sollte der Versuch unternommen werden, eine mögliche Therapieresponse anhand des Körpergewichtsverlaufs in Abhängigkeit zu den unterschiedlichen Therapiemodalitäten zu evaluieren bzw. eine KG-Zunahme durch Tumorbildung und Aszitesproduktion als Therapieversagen zu bewerten.

Das KG wurde über  $\sim 3$  Monate in einwöchigen Intervallen auf der Laboratory LC 1200S Waage kontrolliert und als Mittelwert (MW) der einzelnen Gruppen graphisch

dargestellt. Zur Verlaufsbestimmung des KG wurden Swiss nu/nu Mäuse aus den Therapiestudien (s. 3.8.3) herangezogen, denen entweder einmalig 0,37 MBq oder 0,74 MBq 8 d nach Tumorzellinokulation oder zweimalig 0,37 MBq bzw. 0,74 MBq nach 8 d und 15 d nach Zellinokulation appliziert wurde. Als Kontrolle dienten Tiere, denen Tumorzellen inokuliert wurden, die aber keine RIT erhielten. Die einzelnen Therapiegruppen bestanden aus je 12 Tieren und die Kontrollgruppe aus 6 Tieren.

### **3.8.10 Toxizität des $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk-Konjugats**

#### **3.8.10.1 Bestimmung peripherer Blutzellen im zeitlichen Verlauf**

Diese Studie beinhaltet die Beurteilung und den Vergleich der induzierten Knochenmarkstoxizität in Hinblick auf die periphere Blutzellzahl bei einmaliger vs. zweimalig fraktionierter i.p. Applikation des  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk-Konjugats.

Die Swiss nu/nu Mäuse erhielten entweder einmalig 0,37 MBq, 0,74 MBq oder 1,48 MBq bzw. zweimalig im Intervall von 7 d 0,37 MBq oder 0,74 MBq appliziert. Den Kontrollmäusen (n = 3) wurde je 500 µl reines PBS i.p. appliziert.

Das erste Blutbild wurde nach zweiwöchiger Adaptation in den Tierstallungen angefertigt. Vier Tage später wurde den Tieren das RIK i.p. appliziert. Versuchsgruppen mit fraktionierter RIT wurde nach weiteren 7 d das zweite RIK injiziert.

Nach 1. RIT wurden die Erythrozyten-, Leukozyten- und Thrombozytenwerte über 52 d in 7-tägigen Intervallen, mit beginnender Blutentnahme 3 d nach RIK-Applikation, kontrolliert.

Pro Blutabnahme wurde den Versuchstieren 50 µl Blut mittels heparinisierten Insulinspritzen aus der Vena jugularis unter Ätherkurznarkose entnommen (s. 3.8.6) und mit 100 µl Shedreagenz Cellpack gemischt. Im Anschluss wurde das Differentialblutbild nach Gebrauchsanleitung mit dem Blutanalysegerät Sysmex SE 9000 im Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München erstellt.

### 3.8.10.2 Analyse der chromosomalen Schädigung

Huber (2003) erfasste chromosomale Aberrationen muriner Knochenmarkszellen mittels Giemsa-Färbung 4 h, 8 h und 24 h nach Injektion des  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk-Konjugats.

8 Stunden nach i.p. 1,85 MBq Injektion zeigten sich mäßige Chromosomenaberrationen. Es lagen jedoch hinsichtlich der therapeutisch besten Aktivität von 1,85 MBq  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk keine Ergebnisse zum Zeitpunkt der maximalen Schädigung 24 h nach RIT vor (Huber, 2003).

In dieser Studie wurde Balb/c Mäusen das  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk-Konjugat ein- bzw. zweimalig i.p. fraktioniert appliziert. Den Versuchstieren wurden einmalig 0,74 MBq, 1,48 MBq, 7,4 MBq oder 14,8 MBq i.p. injiziert. Bei fraktionierter RIT erhielten die Tiere i.p. zweimalig 0,74 MBq oder 1,48 MBq im Intervall von 7 d. Die Knochenmarkspunktion erfolgte 24 h nach RIT bzw. bei fraktionierter Applikation 24 h nach der zweiten RIK-Injektion.

Zeitgleich mit dem RIK wurde den Tieren 200 µg Concanavalin A i.p. appliziert, welches die Zellteilung im Knochenmark aktivierte. Bei fraktionierter Gabe wurde Concanavalin A lediglich bei der zweiten RIT appliziert. Drei Stunden vor Euthanasie wurde den Tieren 20 µg Demecolzin i.p. injiziert, welches als Mitosespindelgift die Zellen in der Metaphase arretierte. Nach Euthanasie der Mäuse in  $\text{CO}_2$ -Gas wurden die Organe ausgeblutet (s. 3.8.6) und anschließend die beiden Oberschenkelknochen in toto entnommen. Nach Entfernung des Knorpels, der Gelenkflächen des Caput femoris, Condylus lateralis und medialis wurde eine 21 G Kanüle in die Cavitas medullaris eingeführt, um die Knochenmarkszellen mit der Hanks blanced salt solution (HBSS) in ein Reagenzglas zu überführen.

Die weitere Bearbeitung der Knochenmarkszellen und Analyse der Chromosomenaberrationen wurde in freundlicher Kooperation von Herrn S. Nathrath, in Zusammenarbeit mit dem Institut für Humangenetik des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München, durchgeführt und mittels Multiplex Fluoreszenz In Situ Hybridisierung (M-FISH) ausgewertet. Mittels M-FISH-Analyse konnten qualitative und quantitative strukturelle Chromosomenaberrationen erfasst werden.

### 3.8.10.3 Histologische Beurteilung der Nieren

Die toxische Wirkung von  $^{213}\text{Bi}$  und der schädigende Einfluss des Immunkonjugats auf das renale Gewebe wurden durch histopathologische Untersuchungen der Nieren von Swiss nu/nu Mäusen nach  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk-Applikation untersucht. Insbesondere wurde auf Schädigung des Tubulusepithels, Gefäßendothels und einer Fibroblastenproliferation geachtet.

Die Tiere erhielten entweder einmalig oder zweimalig im Intervall von 7 d das  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk-Konjugat. Die einmalige i.p. Applikation erfolgte mit Aktivitäten von 0,37 MBq bzw. 0,74 MBq und die fraktionierter Gabe mit zweimalig 0,37 MBq bzw. 0,74 MBq im Intervall von 7 d (Gruppen  $n = 2$ ).

100 Tage nach RIT wurden beide Nieren, nach Euthanasie und Ausblutung der Tiere (s. 3.8.6), entnommen. Hierfür wurde das Abdomen in einem Längsschnitt eröffnet und die Nieren freipräpariert. Nach Durchtrennung der Harnleiter, Arteriae und Venae renalis wurden die Nieren entnommen, in PBS gereinigt und in Formalin fixiert.

Die histopathologische Bearbeitung und Beurteilung des Nierengewebes erfolgte am Institut der Pathologie des des Helmholtz Zentrum Münchens (ehemals GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit) unter Leitung von Frau Dr. Leticia Quintanilla-Fend.

## 3.11 Statistische Auswertung

Die statistischen und graphischen Auswertungen wurden mit den Softwareprogrammen Microsoft Office Excel 2003 und SPSS® 14.0 für Windows® durchgeführt.

Die statistische Analyse des klonogenen Tests (s. 3.7.3) erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test bzw. Mann-Whitney U-Test. Die statistische Auswertung der unterschiedlichen Verläufe der peripheren Blutzellen in Abhängigkeit zur applizierten Aktivität (s. 3.8.10.1) wurden mit dem Mann-Whitney U-Test und Wilcoxon-Test durchgeführt. Die Versuchsgruppen wurden auf ein Signifikanzniveau mit  $p < 0,05$  bzw. der entsprechenden adjustierten Signifikanz überprüft.

Die Auswertung der Therapiestudien (s. 3.8.3) erfolgte unter Verwendung der Methode nach Kaplan-Meier über einen Beobachtungszeitraum von 250 d nach

---

Tumorzellinokulation. Die statistische Signifikanzprüfung erfolgte mittels Log Rank Test, bei dem die untersuchten Gruppen paarweise verglichen wurden. Werte  $p < 0,01$  wurden als hochsignifikant, Werte  $p < 0,05$  als signifikant definiert.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Qualität der $^{213}\text{Bi}$ -Eluierung und $^{213}\text{Bi}$ -Koppelung von d9MAk

Im Rahmen der Studien wurden 53  $^{213}\text{Bi}$ -Eluierungen am  $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generator durchgeführt. Die  $^{213}\text{Bi}$ -Aktivitäten lagen, in Abhängigkeit von der unterschiedlichen  $^{225}\text{Ac}$ -Beladungen und Alter der Generatoren, vor Abtrennung des freien  $^{213}\text{Bi}$  an der PD 10 Gelfiltrationssäule bei  $95 \text{ MBq} \pm 63 \text{ MBq}$  (MW  $\pm$  SD).

Der Anteil des AK-gebundenen  $^{213}\text{Bi}$  im Verhältnis zum freien  $^{213}\text{Bi}$  wurde vor ( $E_a$ ) und nach Gelfiltration ( $P_a$ ) bestimmt. Bei einem Gesamteinsatz von ca.  $100 \mu\text{g}$  AK lag die Markierungsausbeute ( $E_a$ ) bei  $81 \% \pm 6 \%$  (MW  $\pm$  SD) und nach Abtrennung des ungebundenen  $^{213}\text{Bi}$  bei ( $P_a$ )  $95 \% \pm 3 \%$  (MW  $\pm$  SD). Neben der Abfiltration des freien  $^{213}\text{Bi}$  entstand ein Verlust von  $34 \% \pm 15 \%$  (MW  $\pm$  SD)  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk durch Verbleiben eines RIK-Anteils in der PD 10 Gelfiltrationssäule.

Im Tierversuch wurden den Tieren  $1 \times 10^7$  Tumorzellen injiziert. Mit  $3 \times 10^5$  mutierten E-Cadherin-Antigenen pro Zelle lagen insgesamt rechnerisch  $3 \times 10^{12}$  AK-Bindungsstellen bei Applikation vor (Seidenschwang, 2006). Die eingesetzten Aktivitäten in den Therapiestudien lagen zwischen  $0,37 \text{ MBq}$  und  $1,48 \text{ MBq}$   $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk pro Maus. Pro RIK-Applikation wurde den Versuchstieren  $1,3 \times 10^{13} \pm 1,6 \times 10^{13}$  (MW  $\pm$  SD) Moleküle d9MAk injiziert um eine möglichst vollständige Besetzung der AG-Bindungsstellen des mutierten E-Cadherin Adhäsionsmoleküls zu ermöglichen. Die spezifische Aktivität pro mg d9MAk betrug  $467 \text{ MBq} \pm 383 \text{ MBq}$  (MW  $\pm$  SD). Bei dieser mittleren spezifischen Aktivität war jedes 2150ste Molekül d9MAk mit einem  $^{213}\text{Bi}$ -Atom gekoppelt, bei der geringsten spezifischen Aktivität von  $37 \text{ MBq}$  jedes 27150ste Molekül d9MAk und bei der maximal erreichten spezifischen Aktivität von  $1423 \text{ MBq}$  jedes 706ste Molekül d9MAk mit einem  $^{213}\text{Bi}$ -Atom gekoppelt.

## 4.2 In Vitro Versuche

### 4.2.1 Proliferation der HSC45-M2-Zellen

Nach Kultivierung von  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^5$  oder  $1 \times 10^6$  HSC45-M2-Zellen wurde die Proliferation der Zellen in 24-stündigen Intervallen bis maximal 15 d (360 h) nach Versuchsbeginn mittels Zellzahlmessungen bestimmt. Je Messzeitpunkt standen für jede Gruppe der unterschiedlichen Ausgangszellzahlen 2 Proben zur Verfügung, deren quantitativen Ergebnisse gemittelt wurden.

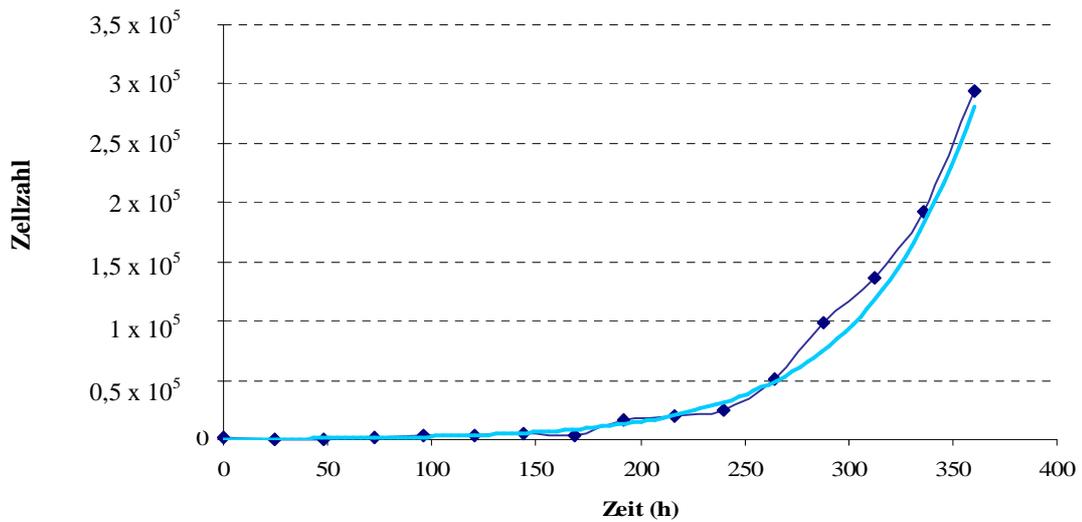
Mittels exponentieller Trendlinie und ermitteltem Korrelationskoeffizient mit  $r^2 > 0,9$  konnte der Zellzahlverlauf bei  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^5$  und  $1 \times 10^6$  Ausgangszellen als spezielle Exponentialfunktion beschrieben und die Zellzahl-Verdoppelungszeit berechnet werden (s. 3.7.1 Gleichung 3 und 4).

Die Subkultivierung von  $1 \times 10^3$  Zellen pro Kulturflasche führte nach 24 h zu einem Abfall auf  $3,9 \times 10^2$  Zellen. Nach langsamer Proliferationsphase über 168 h wurde ein Anstieg auf  $3,78 \times 10^3$  und nach exponentieller Vermehrung nach 360 h auf  $2,95 \times 10^5$  Zellen gemessen mit einer ermittelten Zellverdoppelungszeit von 38 h (Abb. 4).

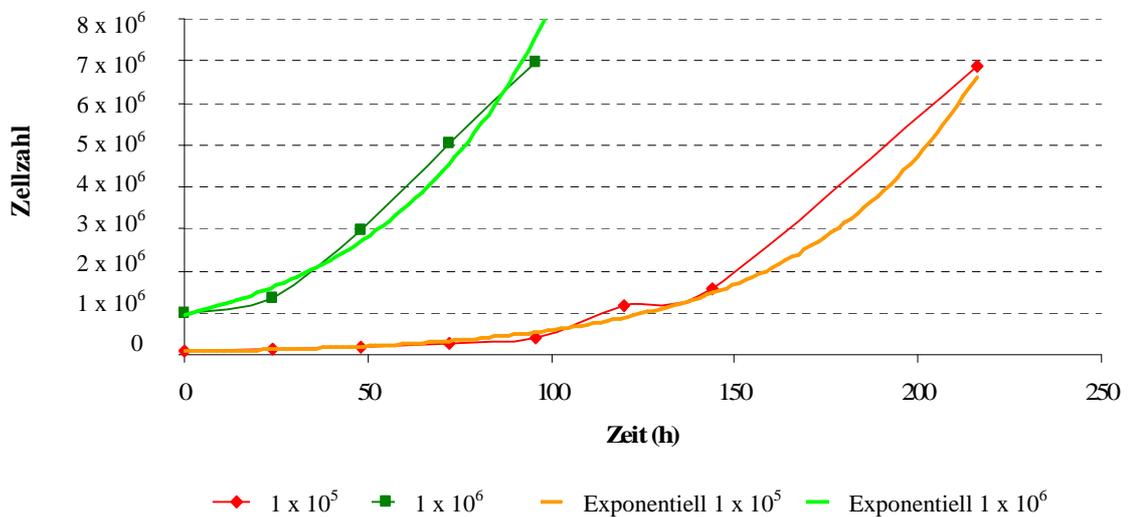
Bei einer Ausgangszellzahl von  $1 \times 10^5$  HSC45-M2 pro Zellkulturflasche zeigte sich 216 h nach Subkultivierung eine maximale Zunahme auf  $6,88 \times 10^6$  Zellen bei einer Zellverdoppelungszeit von 33 h. Nach Abfall der Zellzahl an den Messzeitpunkten 240 h und 264 h nach Versuchsbeginn bis auf  $4,32 \times 10^6$  Zellen wurde der Versuch, bei fortschreitendem Zelluntergang und Zunahme von avitalen Zellresten, abgebrochen (Abb. 5 und s. 4.2.2 Abb. 6).

Auch bei der Ausgangszahl von  $1 \times 10^6$  Zellen pro Kulturflasche zeigte sich eine schnelle Proliferationskinetik mit maximal  $6,98 \times 10^6$  Zellen 96 h nach Aussaat mit anschließendem Abfall auf  $3,80 \times 10^5$  Zellen 360 h nach Versuchsbeginn. Neben der Reduktion der vitalen Zellen ließ sich eine Zunahme von Zellabbauprodukten feststellen. Die Zellverdoppelungszeit lag bei 32 h (Abb. 5 und s. 4.2.2 Abb. 7).

Die mittlere Verdoppelungszeit der HSC45-M2-Zellen, unabhängig von der Ausgangszellzahl, betrug  $34 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$  (MW  $\pm$  SD).



**Abb. 4: Proliferationskinetik von HSC45-M2 bei  $1 \times 10^3$  Ausgangszellen**  
 Graphische Darstellung über 360 h mit Trendlinie,  $y = 390 \cdot e^{0,0183 \cdot x}$   
 und Korrelationskoeffizient  $r^2 = 0,97$ , Zellverdopplungszeit 38 h



**Abb. 5: Proliferationskinetik von HSC45-M2 bei  $1 \times 10^5$  und  $1 \times 10^6$  Ausgangszellen**  
 Graphische Darstellung bei  $1 \times 10^5$  Ausgangszellen über 216 h mit Trendlinie,  
 $y = 73124 \cdot e^{0,0209 \cdot x}$  und Korrelationskoeffizienten  $r^2 = 0,98$ ,  
 Zellverdopplungszeit von 33 h (rote und orangene Kurven)  
 Graphische Darstellung bei  $1 \times 10^6$  Ausgangszellen über 96 h mit Trendlinie,  
 $y = 954990 \cdot e^{0,0216 \cdot x}$  und Korrelationskoeffizient  $r^2 = 0,98$ ,  
 Zellverdopplungszeit von 32 h (grüne und hellgrüne Kurven)

#### 4.2.2 CEA-Konzentrationsverlauf im Vergleich zur Zellproliferation

Neben der Zellzahlbestimmung (s. 4.2.1) wurden aus den Kulturflaschen Mediumproben zur CEA-Konzentrationsbestimmung entnommen.

Auf Grund technischer Probleme bei der Auswertung musste bei einzelnen Messzeitpunkten auf die CEA-Konzentrationsergebnisse von Proben verzichtet werden.

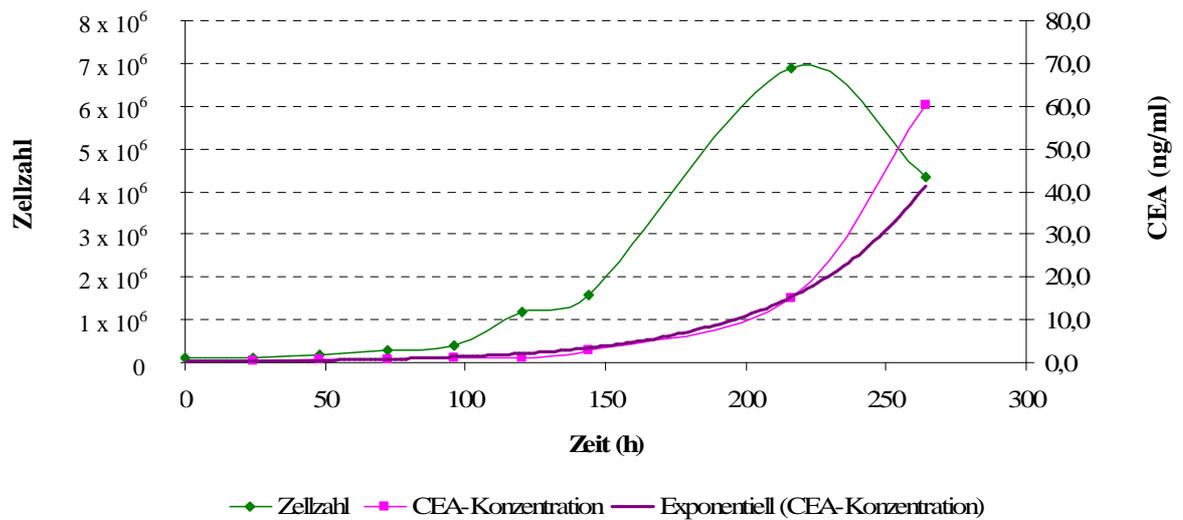
Für jede Ausgangszellzahl wurden die CEA-Konzentration ( $y_2$ -Achse) sowie die Zellzahl ( $y_1$ -Achse) über den Zeitverlauf ( $x$ -Achse) graphisch aufgetragen. Mittels exponentieller Trendlinie und ermitteltem Korrelationskoeffizient mit  $r^2 > 0,9$  konnte der CEA-Verlauf bei  $1 \times 10^5$  und  $1 \times 10^6$  Zellen als spezielle Exponentialfunktion beschrieben und die CEA-Verdoppelungszeit berechnet werden (s. 3.7.1 Gleichung 3 und 4).

Bei der Ausgangszellzahl von  $1 \times 10^3$  HSC45-M2 konnte erstmalig nach 312 h bei einer Probe mit  $1,37 \times 10^5$  Zellen eine CEA-Konzentration mit 1,9 ng/ml im Medium bestimmt werden.

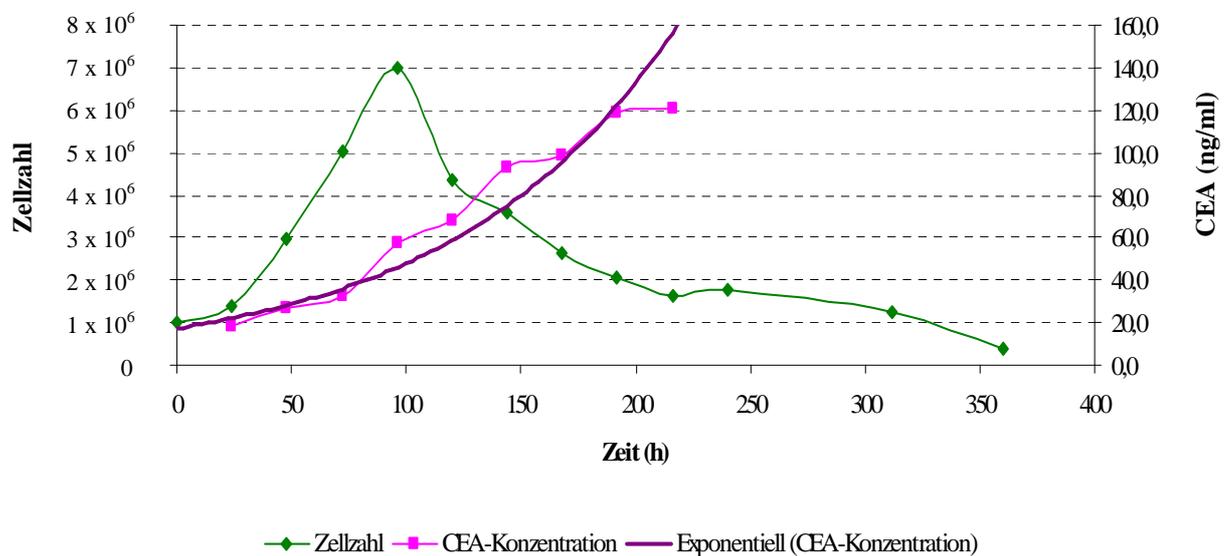
Bei der Ausgangszellzahl von  $1 \times 10^5$  Zellen stieg die CEA-Konzentration mit Zunahme der vitalen Zellen nach 216 h auf 14,9 ng/ml Medium an. Das Ende der Zellproliferation mit Verlust der Zellarchitektur und Zunahme von Zellresten nach 264 h verursachte einen Anstieg des CEA im Medium auf 60,2 ng/ml. Mittels Trendlinie und dazugehöriger Exponentialfunktion ergab sich eine CEA-Konzentrationsverdoppelungszeit von 34 h (Abb. 6).

Bei  $1 \times 10^6$  Ausgangszellen stieg die CEA-Konzentration im Medium kontinuierlich, mit Zunahme der vitalen und avitalen Zellen, von 17,9 ng/ml 24 h nach Kultivierung bis auf 120,4 ng/ml nach 216 h an. Die CEA-Werte der Messzeitpunkte  $> 240$  h konnten durch Überschreitung des Sensitivitätsmaximums, trotz Verdünnung der Medien, mit dem Automated Chemiluminescence System ACS: 180<sup>®</sup> CEA-Testsystem nicht bestimmt werden. Es ergab sich eine CEA-Konzentrationsverdoppelungszeit von 70 h (Abb. 7).

Schlussfolgernd zeigte sich eine Korrelation von CEA-Konzentration und Zellproliferation in Abhängigkeit von Zunahme an vitalen HSC45-M2 und avitalem Zellmaterial.



**Abb. 6: CEA-Konzentrationsverlauf bei  $1 \times 10^5$  HSC45-M2 Ausgangszellen**  
 Graphische Darstellung der Zellzahl und CEA-Konzentration über 264 h  
 mit CEA-Konzentrationsverlaufstrendlinie,  $y = 0,1753 \cdot e^{0,0207 \cdot x}$ ,  
 Korrelationskoeffizient  $r^2 = 0,97$ , Konzentrationsverdoppelungszeit von 34 h



**Abb. 7: CEA-Konzentrationsverlauf bei  $1 \times 10^6$  HSC45-M2 Ausgangszellen**  
 Graphische Darstellung der Zellzahl und CEA-Konzentration über 216 h  
 mit CEA-Konzentrationsverlaufstrendlinie,  $y = 0,1753 \cdot e^{0,0207 \cdot x}$ ,  
 Korrelationskoeffizient  $r^2 = 0,97$ , Konzentrationsverdoppelungszeit von 70 h

### 4.2.3 Proliferationsverhalten im klonogenen Test

Die Bestimmung der Klonogenität der HSC45-M2-Zellen zeigte ein Proliferationsverhalten in Abhängigkeit von Ausgangszellzahl und applizierter  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$ -Aktivität.

Die Klonogenität nach RIK-Inkubation wird in Prozent im Verhältnis zur Klonanzahl der Kontrolle ohne RIK-Administration angegeben, wobei die Klone der Kontrolle als 100 % gewertet werden.

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test. Auf Grund einer nicht vorhandenen Normalverteilung erfolgte die weitere Auswertung zwischen den einzelnen Gruppen mit dem Mann-Whitney-Test mit  $P_{\text{adjustiert}} < 0,002$ .

Beide Versuchsreihen mit der unterschiedlichen Ausgangszellzahl von 50 bzw. 100 Zellen wurden separat ausgewertet, da sich bei den applizierten Aktivitäten von  $1 \times 0,185 \text{ MBq}$  und  $2 \times 0,185 \text{ MBq}$  ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) in der Klonogenität für beide Ausgangszellzahlen zeigte.

Mit steigender Aktivität und zweimaliger RIK-Inkubation zeigte sich eine Reduktion der Klonogenität (Abb. 8).

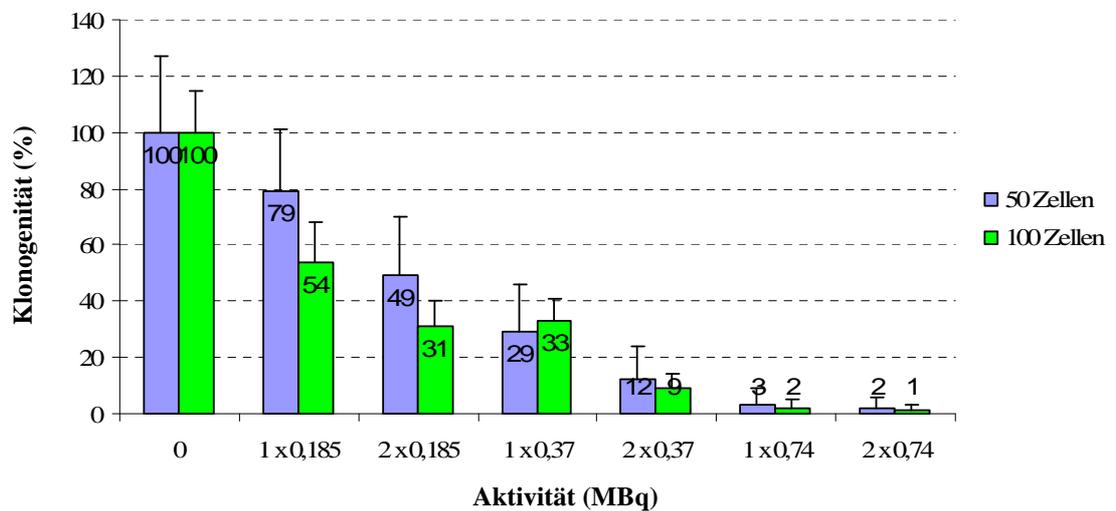


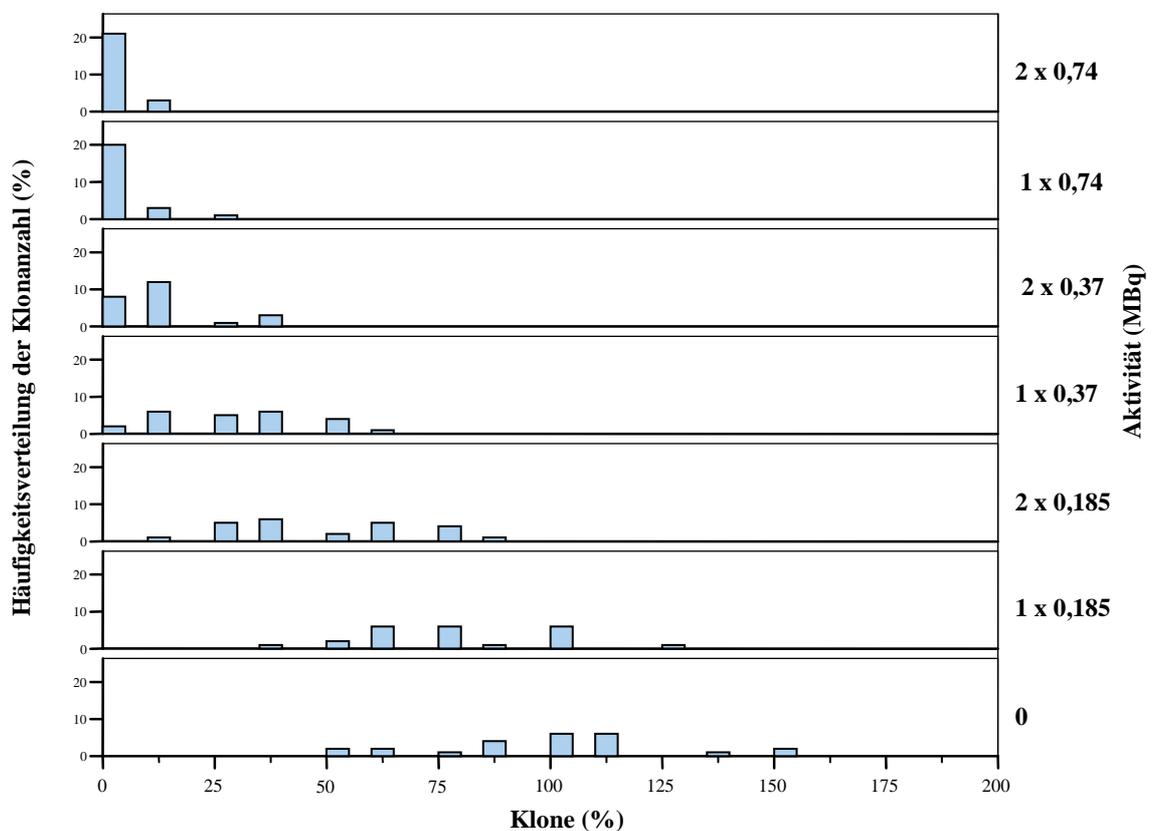
Abb. 8: Klonogenität von 100 vs. 50 Ausgangszellen in Abhängigkeit zur Aktivität

#### 4.2.3.1 $^{213}\text{Bi}$ -Immunkonjugat-Inkubation bei 50 Zellen pro well

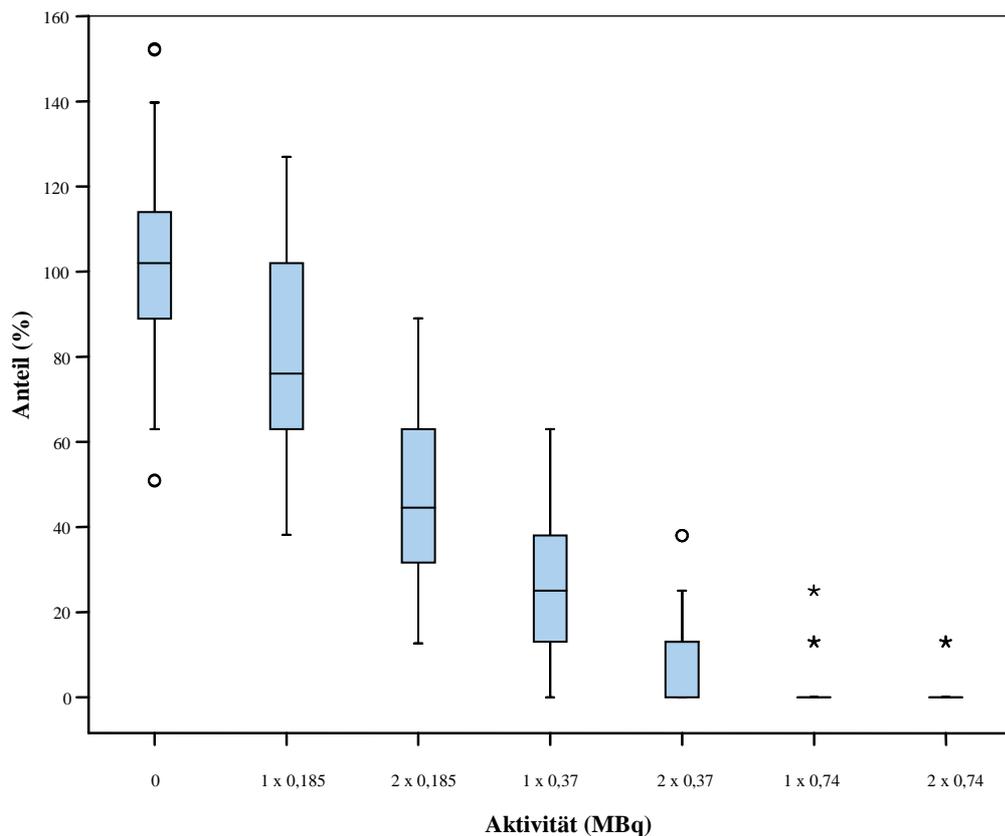
Nach 15-tägiger Subkultivierung bildeten die Kontrollzellen ohne RIK Inkubation  $7,9 \pm 2,1$  (MW  $\pm$  SD) Klone pro well.

Durch ansteigende Aktivitäten und zweimaliger Applikation des  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk-Konjugats wurde die Klonogenität im Vergleich zur Kontrolle reduziert (s. 4.2.3 Abb. 8).

Die entstandenen Klone je Aktivitätsgruppe zeigten innerhalb ihrer eigenen Gruppe keine Normalverteilung (Abb. 9). Zur statistischen graphischen Darstellung wurde das Boxplot-Diagramm ausgewählt (Abb. 10).



**Abb. 9: Häufigkeitsverteilung der Klonanzahl je Aktivitätsgruppe bei 50 Ausgangszellen**  
 Darstellung in Intervallbreite von 5 %  
 Keine Normalverteilung der Klonogenität innerhalb der einzelnen Aktivitätsgruppen



**Abb. 10: Klonogenität in Abhängigkeit von der applizierten Aktivität bei 50 Ausgangszellen**  
 Abnahme der Klonanzahl (%) mit steigender Aktivität und fraktionierter Applikation  
 ° milde Ausreißer: zwischen 1,5 – 3 Boxenlängen \* starke Ausreißer: > 3 Boxenlängen

Bei Testung aller Gruppen gegeneinander ergab sich kein signifikanter Unterschied ( $P_{\text{adjustiert}} > 0,002$ ) für die Kontrollen vs. 1 x 0,185 MBq, 2 x 0,185 MBq vs. 1 x 0,37 MBq und 1 x 0,74 MBq vs. 2 x 0,74 MBq. Alle anderen Gruppenauswertungen gegeneinander zeigten einen signifikanten Unterschied mit  $P_{\text{adjustiert}} < 0,002$  zugunsten der höheren Gesamtaktivität.

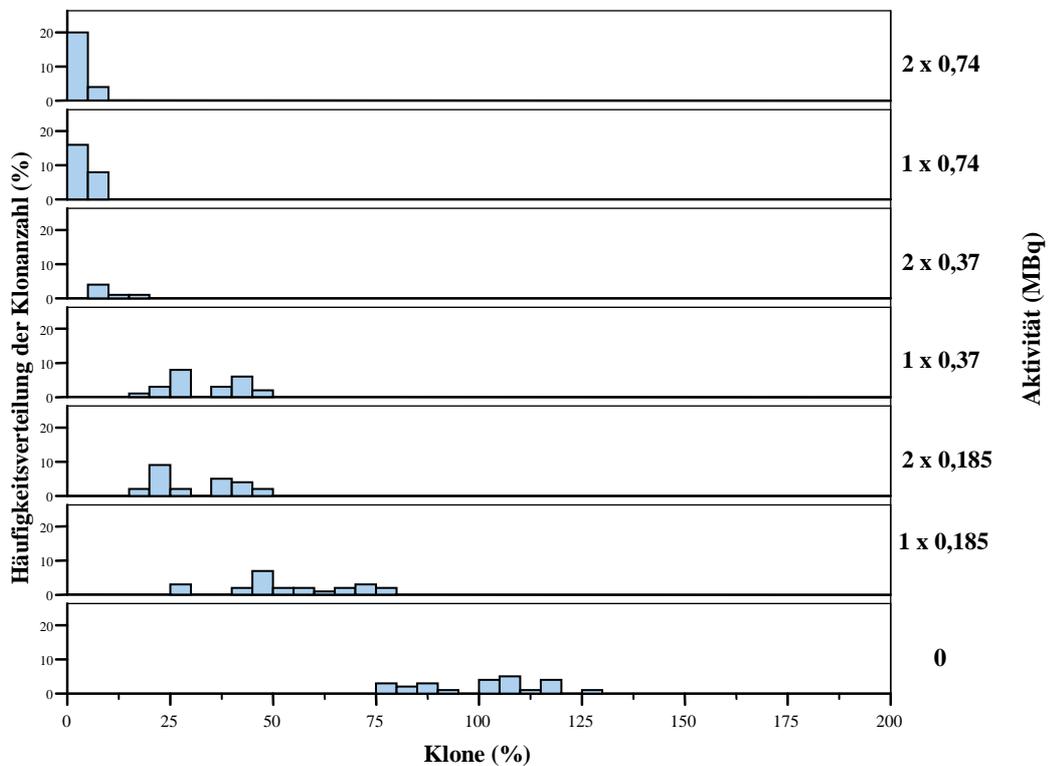
Es zeigte sich keine signifikante Überlegenheit der zweimalig fraktionierten Administration vs. einmaliger Applikation des  $^{213}\text{Bi}$ -Immunkonjugats bei gleicher Gesamtaktivität.

#### 4.2.3.2 <sup>213</sup>Bi-Immunkonjugat-Inkubation bei 100 Zellen pro well

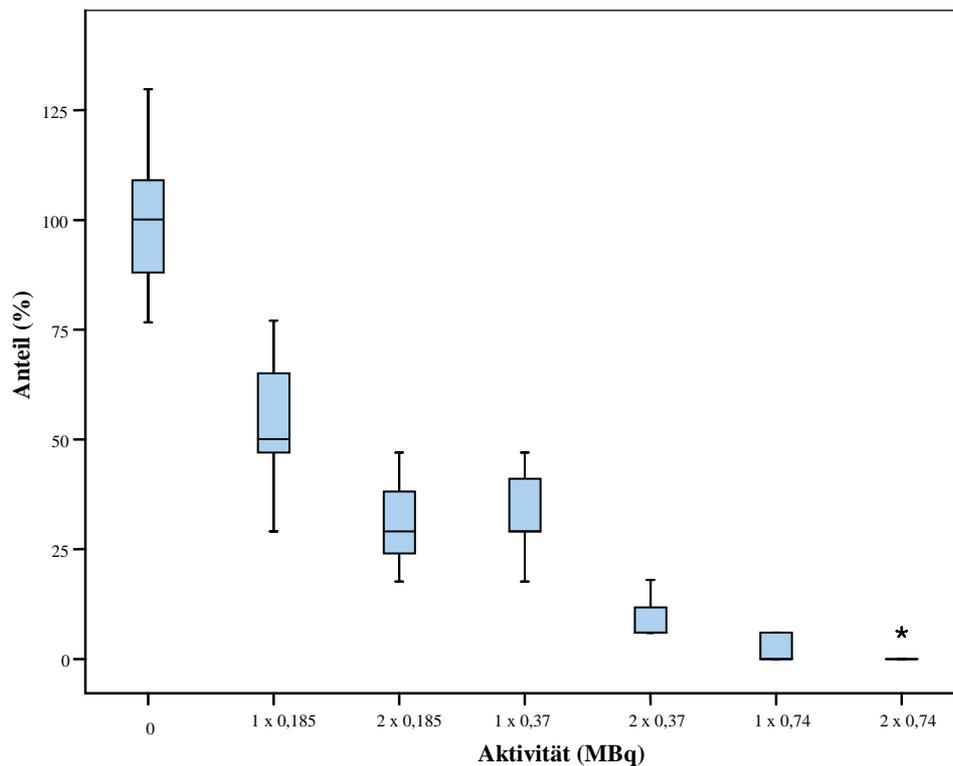
Nach 15-tägiger Subkultivierung bildeten die Kontrollzellen ohne RIK-Inkubation  $17 \pm 2,5$  (MW  $\pm$  SD) Klone pro well.

Durch ansteigende Aktivitäten und zweimalige Applikation des <sup>213</sup>Bi-d9MAk-Konjugats konnte die Klonogenität im Vergleich zur Kontrolle reduziert werden (s. 4.2.3 Abb. 8).

Die entstandenen Klone pro Gruppe zeigten, analog zu 50 Ausgangszellen, keine Normalverteilung (Abb. 11). Zur statistischen graphischen Darstellung wurde das Boxplot-Diagramm ausgewählt (Abb. 12).



**Abb. 11: Häufigkeitsverteilung der Klonanzahl je Aktivitätsgruppe bei 100 Ausgangszellen**  
 Darstellung in Intervallbreite von 5 %  
 Keine Normalverteilung der Klonogenität innerhalb der einzelnen Aktivitätsgruppen



**Abb. 12: Klonogenität in Abhängigkeit von der applizierten Aktivität bei 100 Ausgangszellen**

Abnahme der Klonanzahl (%) mit steigender Aktivität und fraktionierter Applikation

\* > 3 Boxenlängen

Kein signifikanter Unterschied ( $P_{\text{adjustiert}} > 0,002$ ) konnte zwischen der Klonogenität der Gruppe mit 2 x 0,185 MBq vs. 1 x 0,37 MBq, 2 x 0,37 MBq vs. 1 x 0,74 MBq und 1 x 0,74 MBq vs. 2 x 0,74 MBq erzielt werden. Alle anderen Testungen der einzelnen Gruppen gegeneinander zeigten einen signifikanten Unterschied mit  $P_{\text{adjustiert}} < 0,002$  hinsichtlich der Klonreduktion bei steigender Aktivität.

Es zeigte sich keine signifikante Überlegenheit der zweimalig fraktionierten Administration vs. einmaliger Applikation des  $^{213}\text{Bi}$ -Immunkonjugats bei gleicher Gesamtaktivität.

### 4.3 In Vivo Versuche

#### 4.3.1 Therapeutische Effizienz der einmaligen und fraktionierten Applikation des $^{213}\text{Bi-d9MAk-Radioimmunkonjugats}$

Swiss nu/nu Mäuse erhielten nach i.p. Tumorzellinokulation eine ein- oder zweimalige i.p. Applikation des  $^{213}\text{Bi-d9MAk-Konjugats}$  unterschiedlicher Aktivität. Die eingesetzten  $^{213}\text{Bi-Aktivitäten}$  lagen je Injektion bei 0,37 MBq, 0,74 MBq oder 1,48 MBq. Die Versuchstiere wurden über einen Zeitraum von 250 d nach HSC45-M2-Injektion beobachtet. Alle therapierten Mäuse überlebten hochsignifikant ( $p < 0,01$ ) länger als die unbehandelte Kontrollgruppe.

Die Beurteilung der Effizienz der jeweiligen Therapie erfolgte über die medianen Überlebenszeiten der Tiere, dem dazugehörigen Mittelwert und das entsprechende 95 %ige Konfidenzintervall. Die statistische Auswertung hinsichtlich der Signifikanz zwischen den einzelnen Gruppen erfolgte mittels Log-Rank-Tests und die graphische Darstellung des Überlebens als Kaplan-Meier-Kurven.

##### 4.3.1.1 Therapiebeginn einen Tag nach Zellinokulation

Untherapierte Tiere der Kontrollgruppe erreichten ein medianes Überleben von 22 d. Dies war hochsignifikant kürzer als das Überleben der Tiere mit  $^{213}\text{Bi-d9MAk-Therapie}$  unabhängig zur eingesetzten Aktivität mit Therapiebeginn 1 d nach HSC45-M2-Inokulation.

Bei einmaliger  $^{213}\text{Bi-d9MAk-Applikation}$  wurde den Versuchstieren 24 h nach i.p. Tumorzellinokulation 0,37 MBq ( $n = 4$ ) oder 0,74 MBq ( $n = 9$ ) des RIK i.p. injiziert.

Die Erhöhung der applizierten Aktivität von 0,37 MBq auf 0,74 MBq zeigte keinen signifikanten Unterschied ( $p > 0,05$ ) im Überleben der Tiere. Das mediane Überleben nach Gabe von 0,37 MBq betrug 48 d, das der RIT-Gruppe mit 0,74 MBq 42 d (Abb. 13, Tab. 1 und 2).

Bei fraktionierter RIT wurde den Versuchstieren (je Gruppe  $n = 9$ ) 1 d und 8 d nach i.p. Tumorzellinjektion entweder je 0,37 MBq oder 0,74 MBq i.p. appliziert.

Das mediane Überleben der Gruppe mit 2 x 0,37 MBq betrug 84 d und das der Gruppe mit 2 x 0,74 MBq 86 d, ohne statistisch signifikanten Unterschied ( $p > 0,05$ ) beider Gruppen zueinander (Abb. 13, Tab. 1 und 2).

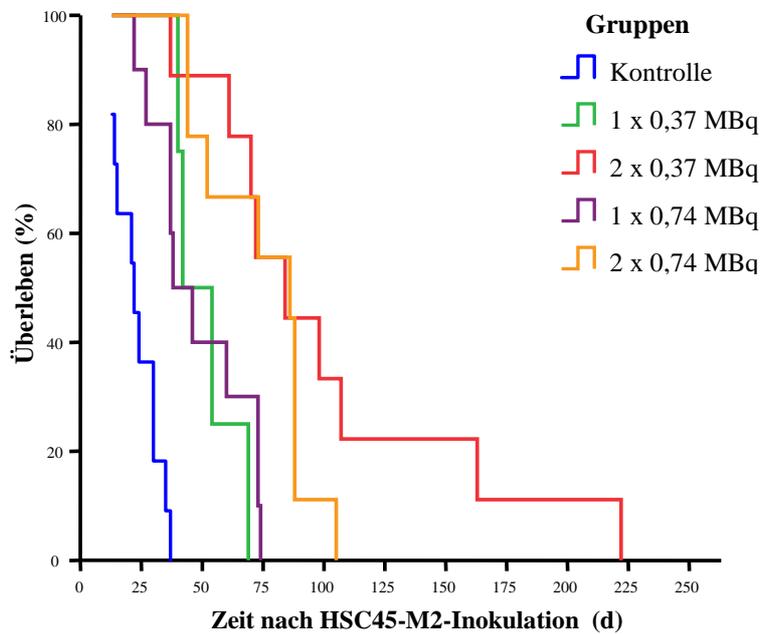
Zur Evaluierung der Effizienz der fraktionierten zweimaligen i.p. Applikation des  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$ -Konjugats wurden die Gruppen mit 1 x 0,37 MBq, 2 x 0,37 MBq, 1 x 0,74 MBq und 2 x 0,74 MBq gegeneinander ausgewertet.

Die einmalige Applikation des RIK mit einer Aktivität von 0,37 MBq führte zu einer medianen Überlebenszeit von 48 d. Tiere, die mit 2 x 0,37 MBq behandelt wurden erzielten ein signifikant längeres medianes Überleben mit 84 d.

Es zeigte sich auch eine signifikante Überlegenheit der zweimaligen Applikation von je 0,37 MBq im Intervall von 7 Tagen vs. der einmaligen Applikation mit 0,74 MBq 24 h nach Tumorzellinokulation (medianes Überleben 84 d vs. 42 d).

Auch die zweimalige Applikation von je 0,74 MBq erzielte ein signifikant längeres Überleben der Versuchstiere (medianes Überleben 86 d) als die einmalige Applikation von 0,74 MBq.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die einmalige Applikation des RIK zu einem ~2-fach längeren Überleben und die zweimalige RIK Applikation zu einem ~4-fach längeren Überleben im Vergleich zur Kontrollgruppe führte, jedoch unabhängig von der applizierten Aktivität. Die zweimalig fraktionierte Applikation im Zeitintervall von 7 d vs. einmaliger Injektion der Gesamtaktivität mit Beginn 24 h nach Tumorzellinokulation führte zu einem signifikant besseren Therapieerfolg (Abb. 13, Tab. 1 und 2).



**Abb. 13: Kaplan-Meier-Überlebenskurven der Therapiegruppen mit Therapiebeginn einen Tag nach Tumorzellinokulation**

Vergleich der Gruppen mit 1 x 0,37 MBq, 2 x 0,37 MBq, 1 x 0,74 MBq oder 2 x 0,74 MBq; mit statistisch signifikanten längeren Überlebenszeiten bei zweimaliger vs. einmaliger Applikation unabhängig von der applizierten  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAK Aktivität

Gruppen	Kontrolle	1 x 0,37MBq	2 x 0,37MBq	1 x 0,74MBq	2 x 0,74MBq
<b>Kontrolle</b>	-	0,001	0,000	0,000	0,000
<b>1 x 0,37MBq</b>	0,001	-	0,008	0,767	0,022
<b>2 x 0,37MBq</b>	0,000	0,008	-	0,008	0,266
<b>1 x 0,74MBq</b>	0,000	0,767	0,008	-	0,008
<b>2 x 0,74MBq</b>	0,000	0,022	0,266	0,008	-

**Tab. 1: Tabellarischer Vergleich der Signifikanzen der verschiedenen Therapiegruppen bei Therapiebeginn einen Tag nach Tumorzellinokulation**

Gruppe	Mittelwert				Median			
	Mittelwert	Standardabweichung	95 %-Konfidenzintervall		Median	Standardabweichung	95 %-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze			Untere Grenze	Obere Grenze
Kontrolle	23	3	18	28	22	5	12	32
1 x 0,37 MBq	51	7	38	64	48	7	28	56
2 x 0,37 MBq	102	19	64	139	84	18	49	119
1 x 0,74 MBq	49	6	36	61	42	7	24	52
2 x 0,74 MBq	74	7	60	89	86	19	48	124

**Tab. 2: Tabellarische Aufstellung von Mittelwert und Median mit Standardabweichung und 95%-Konfidenzintervall der Therapiegruppen bei Therapiebeginn einen Tag nach Tumorzellinokulation**

#### 4.3.1.2 Therapiebeginn acht Tage nach Zellinokulation

Um die Effizienz der einmaligen bzw. zweimalig fraktionierten  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk-Therapie am Modell der fortgeschrittenen Peritonealkarzinose zu evaluieren, erhielten die Tiere 8 d nach Tumorzellinokulation einmalig 0,37 MBq (n = 15), 0,74 MBq (n = 15) oder 1,48 MBq (n = 14) bzw. 8 d und 15 d nach i.p. HSC45-M2-Injektion 0,37 MBq (n = 16) oder 0,74 MBq (n = 16)  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk i.p. appliziert.

Untherapierte Tiere der Kontrollgruppe erzielten ein medianes Überleben von 22 d. Die Überlebenszeit war hochsignifikant kürzer als das Überleben der Tiere mit  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk-Therapie unabhängig zur eingesetzten Aktivität.

Nach einmaliger Gabe des RIK 8 d nach HSC45-M2-Inokulation zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Überleben der 3 Untersuchungsgruppen. Nach Applikation von 0,37 MBq  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk wurde ein medianes Überleben von 37 d, nach 0,74 MBq von 42 d und nach 1,48 MBq von 44 d erzielt (Abb. 14, Tab. 3 und 4).

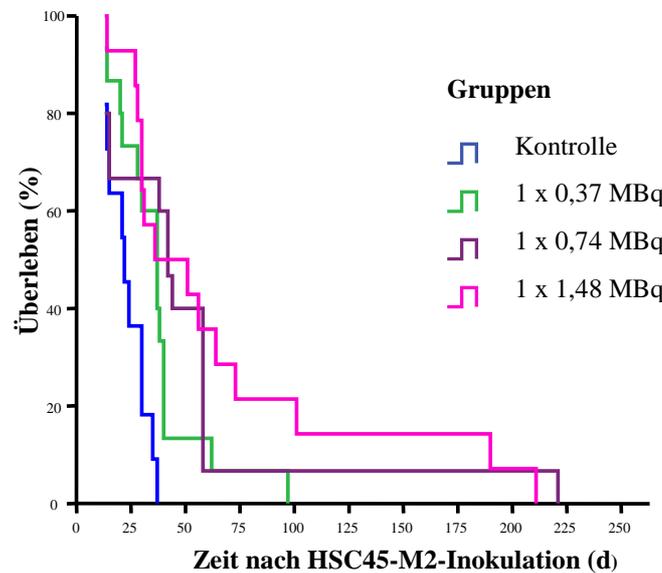


Abb. 14: Kaplan-Meier-Überlebenskurven der Therapiegruppen mit Therapiebeginn 8 Tage nach Tumorzellinokulation mit einmaliger Applikation des  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk-Konjugats

Gruppen	Kontrolle	1 x 0,37 MBq	2 x 0,37 MBq	1 x 0,74 MBq	2 x 0,74 MBq	1 x 1,48 MBq
Kontrolle	-	0,007	0,001	0,003	0,000	0,001
1 x 0,37MBq	0,007	-	0,189	0,199	0,003	0,105
2 x 0,37MBq	0,001	0,189	-	0,941	0,062	0,918
1 x 0,74MBq	0,003	0,199	0,941	-	0,036	0,760
2 x 0,74MBq	0,000	0,003	0,062	0,036	-	0,053
1 x 1,48MBq	0,001	0,105	0,918	0,760	0,053	-

Tab. 3: Tabellarischer Vergleich der Signifikanzen der verschiedenen Therapiegruppen bei Therapiebeginn 8 Tage nach Tumorzellinokulation

Signifikanter Unterschied im Überleben bei zweimaliger Applikation von 0,74 MBq vs. einmaliger Applikation von 0,74 MBq  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk

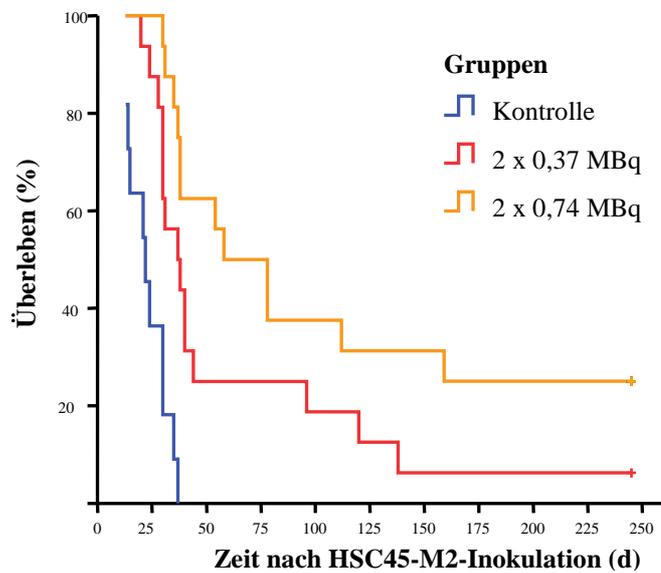
Keine signifikante Unterscheidung in der Überlebenszeit im Vergleich zwischen zweimaliger Applikation von 0,74 MBq vs. einmaliger Applikation von 1,48 MBq  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk ( $p = 0,053$ )

Gruppe	Mittelwert				Median			
	Mittelwert	Standardabweichung	95%-Konfidenzintervall		Mittelwert	Standardabweichung	95%-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze			Untere Grenze	Obere Grenze
Kontrolle	23	3	18	28	22	5	12	32
1 x 0,37 MBq	37	5	26	47	37	4	28	46
2 x 0,37 MBq	62	15	33	91	38	7	23	51
1 x 0,74 MBq	50	13	24	76	42	4	34	50
2 x 0,74 MBq	108	21	66	150	68	16	27	89
1 x 1,48 MBq	67	16	35	99	44	19	0	73

**Tab. 4: Tabellarische Aufstellung von Mittelwert und Median mit Standardabweichung und 95 %-Konfidenzintervall der Therapiegruppen bei Therapiebeginn 8 Tage nach Tumorzellinokulation**

Bei fraktionierter  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$ -Applikation wurde den Versuchstieren zweimalig 0,37 MBq bzw. 0,74 MBq 8 d und 15 d nach HSC45-M2-Inokulation i.p. appliziert.

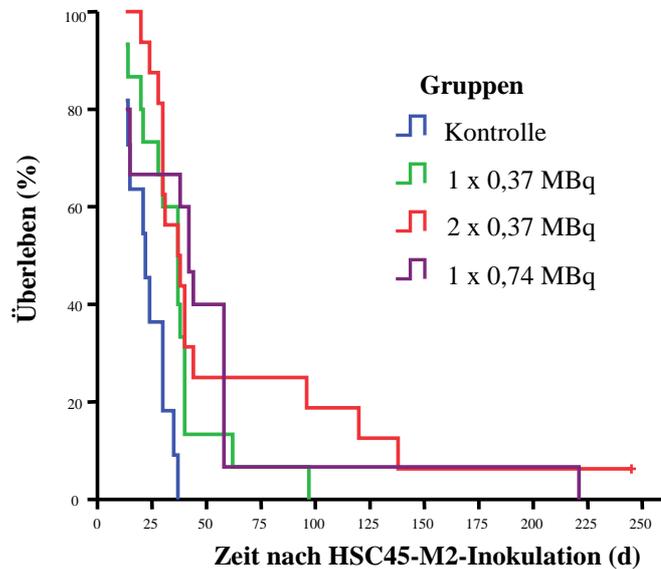
Die Studiengruppe mit 2 x 0,37 MBq  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$  erreichte ein medianes Überleben von 38 d, die mit 2 x 0,74 MBq  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$  eines von 68 d. Mit  $p = 0,062$  zeigte sich ein Trend zugunsten der zweimaligen Applikation von 0,74 MBq, jedoch ohne statistische Signifikanz (Abb. 15, Tab. 3 und 4).



**Abb. 15: Kaplan-Meier-Überlebenskurven der Therapiegruppen mit Therapiebeginn 8 Tage nach Tumorzellinokulation mit zweimaliger Applikation des  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$ -Konjugats im Intervall von 7 Tagen**

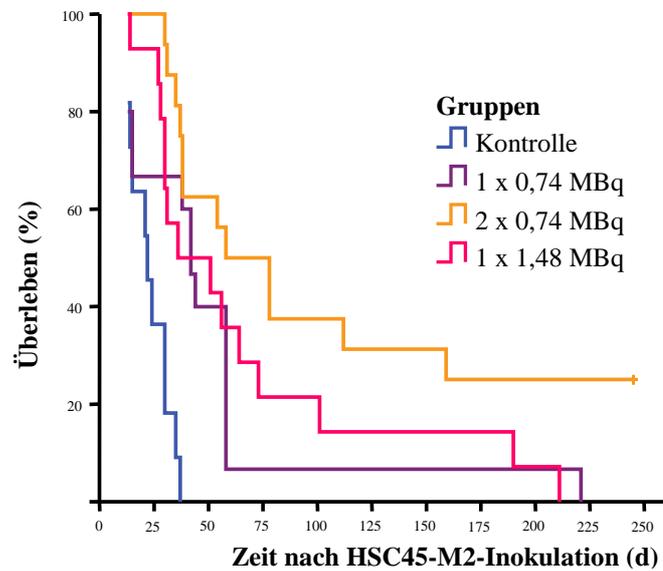
Zur Evaluierung der Effizienz der fraktionierten zweimaligen i.p. Applikation des  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$ -Konjugats im Vergleich zur einmaligen Applikation wurden die Therapiegruppen mit 1 x 0,37 MBq, 2 x 0,37 MBq und 1 x 0,74 MBq sowie die Gruppen mit 1 x 0,74 MBq, 2 x 0,74 MBq und 1 x 1,48 MBq gegeneinander ausgewertet.

Die Evaluation der Therapie mit 1 x 0,37 MBq vs. 2 x 0,37 MBq vs. 1 x 0,74 MBq zeigte keinen signifikanten Unterschied im Überleben der Tiere der 3 Versuchsgruppen. Mäuse mit i.p. Applikation von 1 x 0,37 MBq  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$  erreichten ein medianes Überleben von 37 d, Tiere mit 2 x 0,37 MBq  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$  von 38 d und 1 x 0,74 MBq von 42 d (Abb. 16, Tab. 3 und 4).



**Abb. 16:** Kaplan-Meier-Überlebenskurven der Therapiegruppen mit Therapiebeginn 8 Tage nach Tumorzellinokulation mit einmaliger (0,37 MBq oder 0,74 MBq  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$ ) und zweimaliger Applikation (0,37 MBq  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$ ) des RIK im Intervall von 7 Tagen

Der Vergleich der Überlebenszeiten der Therapiegruppen mit 1 x 0,74 MBq, 2 x 0,74 MBq und 1 x 1,48 MBq  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$  zeigte ein signifikant ( $p = 0,036$ ) verlängertes Überleben zugunsten der Tiergruppe mit 2 x 0,74 MBq  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$  (medianes Überleben 68 d) vs. 1 x 0,74 MBq  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$  (medianes Überleben 42 d). Es zeigte sich ein deutlicher positiver Trend ( $p = 0,053$ ) in der Überlebenszeit zugunsten der zweimaligen Applikation von 0,74 MBq  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$  (medianes Überleben 68 d) vs. der einmaligen Applikation der Gesamtaktivität von 1 x 1,48 MBq  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$  (medianes Überleben 44 d) (Abb. 17, Tab. 3 und 4).



**Abb. 17: Kaplan-Meier-Überlebenskurven der Therapiegruppen mit Therapiebeginn 8 Tage nach Tumorzellinokulation mit einmaliger (0,74 MBq oder 1,48 MBq  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$ ) und zweimaliger Applikation (0,74MBq  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$ ) des RIK im Intervall von 7 Tagen**

Zusammenfassend zeigte sich ein signifikant verlängertes Überleben aller Therapiegruppen mit  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$  im Vergleich zur untherapierten Kontrollgruppe. Die einmalige RIK-Applikation unterschiedlicher Aktivitäten erbrachte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen.

Es zeigte sich ein deutlicher Vorteil hinsichtlich des Überlebens bei zweimaliger i.p. Applikation mit 0,74 MBq  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$  im Vergleich zu den anderen überprüften Therapieschemata. Eine statistische Überlegenheit der fraktionierten zweimaligen Applikation von 0,74 MBq im Vergleich zur einmaligen Applikation von 1,48 MBq bei Therapiebeginn 8 d nach HSC45-M2-Inokulation konnte nicht belegt werden.

### 4.3.2 CEA als Tumormarker zur Therapiekontrolle des diffusen Magenkarzinoms

#### 4.3.2.1 CEA-Konzentrationsverlauf im Serum

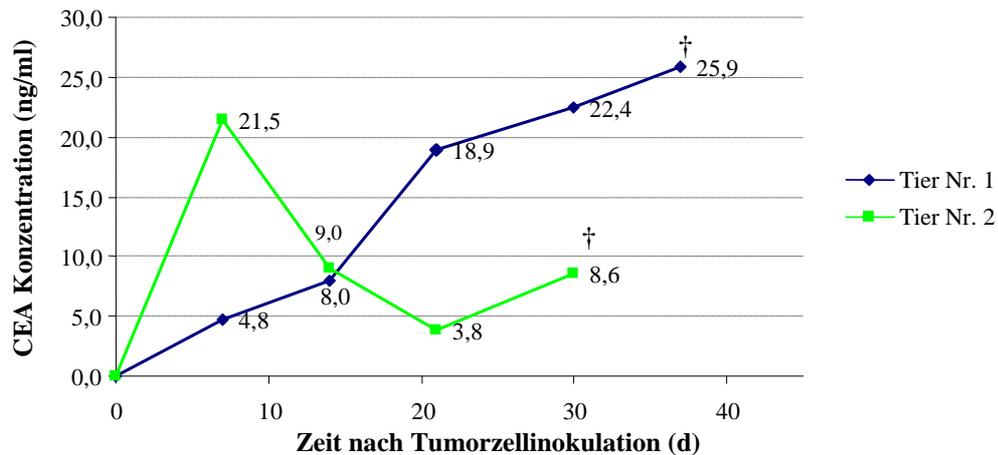
Nach Tumorzellinokulation mit/ohne anschließender RIT wurde der CEA-Konzentrationsverlauf im Serum der Versuchstiere bestimmt.

Die Bestimmung erfolgte bei tumorzellinokulierten Kontrolltieren ohne folgende RIT (n = 2) und bei Tieren nach Tumorzellinokulation mit einmaliger <sup>213</sup>Bi-d9MAk-Therapie 8 d nach i.p. Zellinjektion mit 0,37 MBq (n = 1) bzw. 0,74 MBq (n = 1) und nach zweimaliger RIK-Applikation mit 0,37 MBq (n = 1) bzw. 0,74 MBq (n = 2) 8 d und 15 d nach HSC45-M2-Zellinjektion.

Der Tumormarker war im Serum von Tieren ohne Tumorzellinokulation, die lediglich einmalig oder zweimalig das RIK erhielten (1 x 0,37 MBq, 2 x 0,37 MBq, 1 x 0,74 MBq, 2 x 0,74 MBq, 1 x 7,4 MBq, 1 x 14,8 MBq, 1 x 22,2 MBq mit je n = 2), nicht nachweisbar.

Die CEA-Konzentration nach i.p. Tumorzellinokulation ohne folgende RIT war zu allen Zeitpunkten der Bestimmung messbar. Bei Tier Nr. 1 stieg die Tumormarkerkonzentration bis zum Todestag kontinuierlich bis 25,9 ng/ml (37. Tag) an (Abb. 18). Die Autopsie ergab eine massive Tumordinfiltration. Neben peritonealer Metastasierung, Aszitesbildung und Hepatomegalie wiesen die abdominalen Organe (Leber, Milz, Magen und Nieren) Tumorfokale auf. Das Zwerchfell war durch die HSC45-M2-Zellen infiltriert und bei Eröffnung des Thorax zeigte sich eine intrathorakale Metastasierung.

Tier Nr. 2 zeigte 7 d nach Zellinjektion eine maximale CEA-Serumkonzentration von 21,5 ng/ml mit anschließendem Abfall auf 3,8 ng/ml und erneutem Anstieg bis 8,6 ng/ml bei Euthanasie (30. Tag) (Abb. 18). Die Autopsie erbrachte eine fortgeschrittene i.p. Tumorzellinfiltration mit hepatischer, gastraler, diaphragmaler Metastasierung mit Tumorknoten zwischen den abdominalen Organen.



**Abb. 18: CEA-Serumkonzentrationsverläufe untherapierter tumorzellinokulierter Kontrolltiere**

Tier Nr. 1 zeigt einen kontinuierlichen CEA-Anstieg bis zum Tod (†)

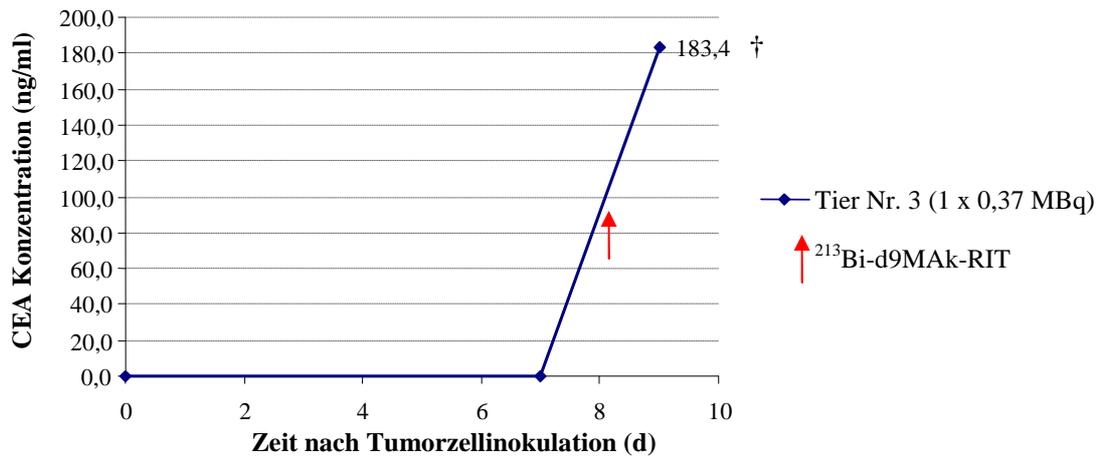
Tier Nr. 2 zeigt einen biphasischen Verlauf mit initialem Peak, anschließendem Abfall und erneutem Anstieg bis zum Tod (†)

Beide Tiere mit einmaliger Applikation des RIK (1 x 0,37 MBq (Tier Nr. 3) und 1 x 0,74 MBq (Tier Nr. 4)) zeigten einen deutlichen Anstieg der CEA-Konzentration im Serum bis zum Todestag mit initialem Anstieg ca. 8 d nach Tumorzellinokulation.

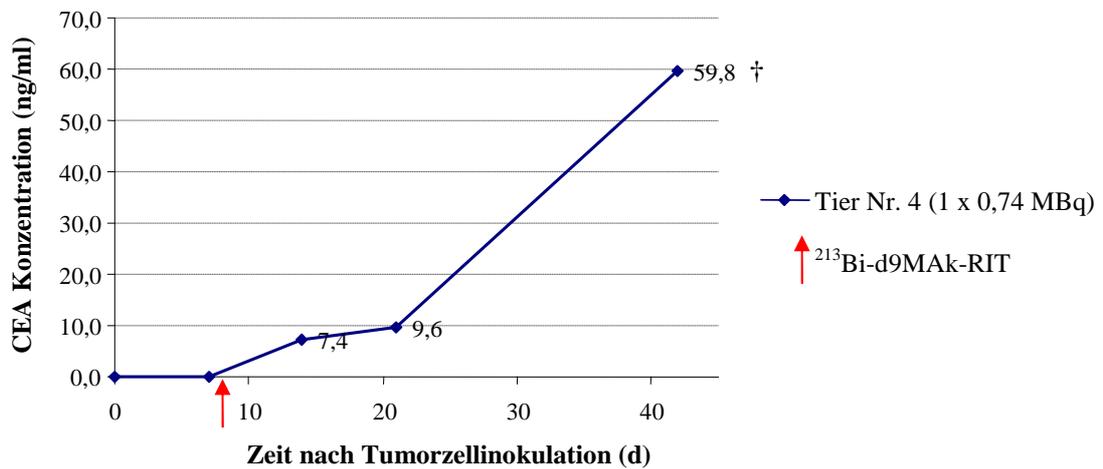
Der Tumormarkerlevel von Nr. 3 stieg rapide innerhalb von 2 d auf 183,4 ng/ml am Todestag (9. Tag) an (Abb. 19 a). Vor Euthanasie war das Tier apathisch als auch kachektisch und die Haut wies diffuse petechiale Einblutungen auf. Die Obduktion zeigte neben einer i.p. Tumorlokalisation einen splenalen und hepatischen Tumornachweis sowie eine orange-grünliche Verfärbung des gesamten Darms.

Tier Nr. 4 wies einen progredienten CEA Anstieg bis auf 59,8 ng/ml beim Tod am 42. Lebenstag auf (Abb. 19 b). Es zeigte sich bei Euthanasie eine massive Aszitesentwicklung.

a)



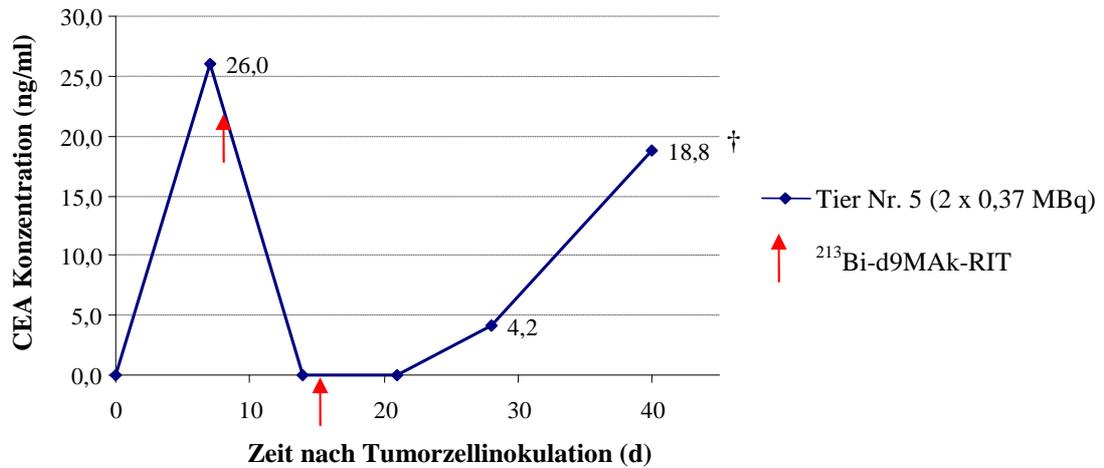
b)



**Abb. 19: CEA-Serumkonzentrationsverläufe nach Tumorzellinokulation und einmaliger Applikation von  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$  nach 8 Tagen**

Die einmalige Applikation von 0,37 MBq (a) oder 0,74 MBq  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$  (b) zeigte keine Reduktion der Antigenkonzentration im Serum

Tier Nr. 5 erhielt 2 x 0,37 MBq  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$  i.p. 8 d und 15 d nach Tumorzellinokulation. Nach initialem CEA-Anstieg auf 26,04 ng/ml am 7. Tag nach Tumorzellimplantation sank die CEA-Konzentration im Anschluss an die erste RIT in den nicht messbaren Bereich ab. Ab Tag 28 stieg die CEA Konzentration im Serum bis zum Todestag (Tag 40) auf 18,76 ng/ml an (Abb. 20). Die Obduktion erbrachte neben einer Aszitesbildung eine massive peritoneale, renale, splenale, hepatische sowie diaphragmale Karzinose mit einem Unterbauchtumor ( $\varnothing$  1cm).



**Abb. 20: CEA-Serumkonzentrationsverlauf nach Tumorzellinokulation und zweimaliger Applikation von 0,37 MBq  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$**

Nach initialem CEA Anstieg, Abfall der CEA-Konzentration nach zweimaliger  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$  Applikation (8 und 15 Tage nach Tumorzellinokulation) in nicht messbare Bereiche mit Wiederanstieg bis zur Euthanasie (†)

Der Tumormarkerlevelverlauf von Tier Nr. 6 (2 x 0,74 MBq) zeigte einen initialen Konzentrationsanstieg auf 9,16 ng/ml bis zum 7. Tag nach Tumorzellinokulation mit anschließendem Abfall in den nicht nachweisbaren Konzentrationsbereich. Das Tier zeigte bis zum Abschluss des Versuchs keinen erneuten Antigenanstieg und keine Zeichen einer Tumorentwicklung bei der klinischen Untersuchung (Abb. 21).

Das Serum-CEA war bei Tier Nr. 7 (2 x 0,74 MBq) über einen Zeitraum von 70 d nicht nachweisbar. Bei Euthanasie auf Grund von klinischen Zeichen der Tumormanifestation (78. Tag) konnte das CEA mit einer Konzentration von 15,9 ng/ml bestimmt werden (Abb. 21). Es zeigten sich bei der Autopsie ein subkutaner linksseitiger Unterbauchtumor ( $\varnothing$  1,5 cm) sowie ein Tumorknoten im rechten Oberbauch ( $\varnothing$  0,5 cm) mit diaphragmaler, peritonealer, splenaler, hepatischer und intrakutaner Tumordinfiltration.

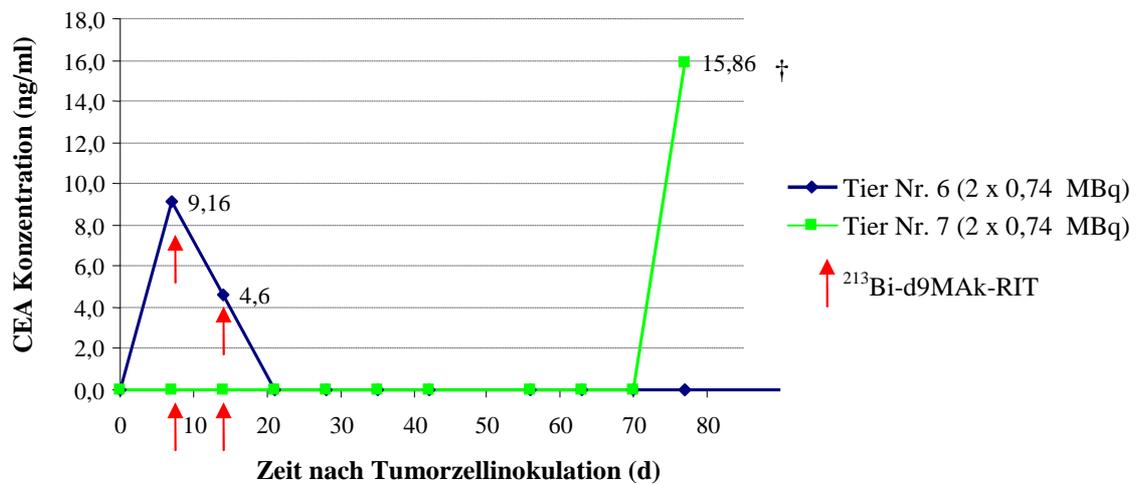


Abb. 21: CEA-Serumkonzentrationsverlauf nach Tumorzellinokulation und zweimaliger Applikation von 0,74 MBq  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$

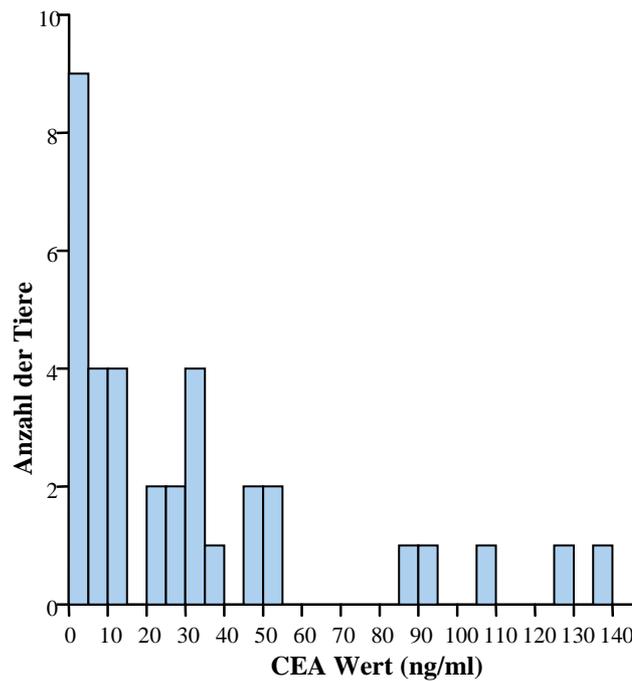
Zusammenfassend zeigten sich nach i.p. HSC45-M2-Inokulation unterschiedliche individuelle CEA-Konzentrationsverläufe bei therapierten und nicht therapierten Versuchstieren.

Die positiven therapeutischen Effekte der RIT, abhängig von der verwendeten Aktivität und Fraktionierung der  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$ -Applikation, spiegelten sich in nicht nachweisbarem Serum-CEA-Level und Abfall der Konzentration nach initialem CEA-Anstieg nach Zellinjektion wieder.

#### 4.3.2.2 CEA-Konzentrationen im Serum post mortem

Insgesamt wurden 35 post mortem entnommene Seren der Versuchstiere auf ihre CEA-Konzentration untersucht. Bei allen Tieren wurde makroskopisch eine Peritonealkarzinose mit teilweiser diffuser Organinvasion beobachtet.

Bei 9 Mäusen (26 %) wurden CEA Werte  $< 5$  ng/ml gemessen. 8 Tiere (23 %) erreichten ein Level von 5 - 15 ng/ml und 18 Tiere (51 %) Werte  $> 15$  ng/ml. Es errechnete sich ein MW  $\pm$  SD von  $31,8 \pm 37,1$  ng/ml der CEA-Konzentration. Die Werte zeigten keine Normalverteilung (Abb. 22).



**Abb. 22: Histogramm mit Darstellung der CEA-Konzentrationen bei Autopsie bei positivem Tumornachweis**

#### **4.3.2.3 CEA-Konzentration im Aszites post mortem**

Eine Aszitesentwicklung in Verbindung mit einer milden bis massiven abdominellen Metastasierung mit/ohne Kachexie wurde bei insgesamt 50 % aller autopsierten Tiere vorgefunden (s. 4.3.3).

5 Tiere wurden hinsichtlich einer möglichen CEA-Positivität im Aszites untersucht. Alle Untersuchungen zeigten deutlich pathologisch erhöhte CEA-Werte im Aszites (17,38 ng/ml, 29,3 ng/ml, 29,7 ng/ml, 69,67 ng/ml und 85,31 ng/ml).

### 4.3.3 Evaluation der Autopsiebefunde, der histopathologischen Untersuchungen und des Körpergewichts bei Exitus letalis

Alle Tiere, die zu Versuchsbeginn Tumorzellen i.p. injiziert bekamen wurden nach Exitus letalis einer Bestimmung des Körpergewichts (KG) und einer Autopsie mit makroskopischer Inspektion des Situs unterzogen. Das KG bei Euthanasie der Tiere ( $n = 113$ ) lag bei  $25,62 \text{ g} \pm 4,57 \text{ g}$  ( $\text{MW} \pm \text{SD}$ ) mit annähernder Normalverteilung der einzelnen Werte (Abb. 23).

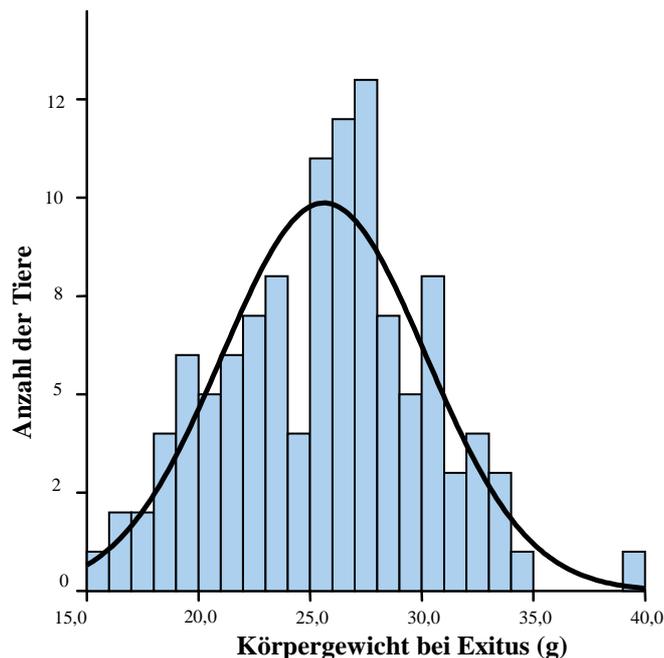
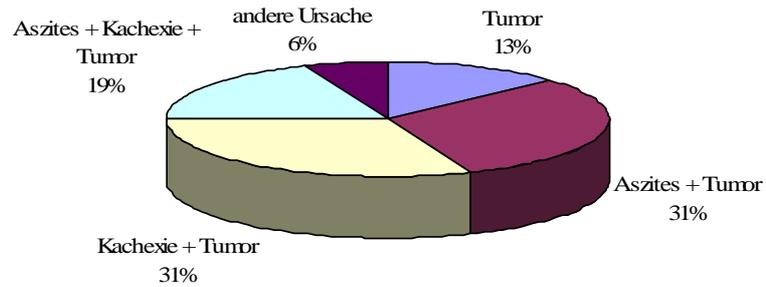


Abb. 23: Histogramm des Körpergewichts der Swiss nu/nu Mäuse zum Zeitpunkt des Exitus letalis

Der Status des Situs bei Autopsie konnte bei 95 Tieren erhoben werden und wurde mit Hilfe der Abbruchkriterien (s. 3.8.3) in 5 Kategorien (nur Tumor, Aszites + Tumor, Kachexie + Tumor, Aszites + Kachexie + Tumor oder andere Ursache) eingeteilt.

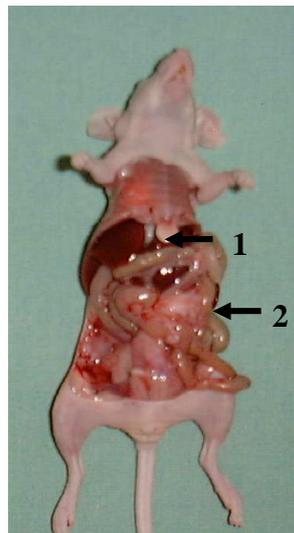
6 % der Tiere mussten primär unabhängig von der i.p. Tumorzellimplantation getötet werden. Gründe zur vorzeitigen Euthanasie waren cerebraler Genese bzw. Störungen des motorischen Apparats (z.B. Exophthalmus mit/ohne Hydrocephalus, Gangataxie, Hüftproblematik). Ob in diesen Fällen ein eventueller Zusammenhang zwischen Zellinokulation oder RIT bestand, konnte nicht geklärt werden.

13 % der autopsierten Tiere fielen der Kategorie „nur Tumor“ zu. Bei jeweils 31 % wurde ein Tumor mit Aszites bzw. Kachexie beobachtet und bei 19 % ein Zusammentreffen von Aszites, Kachexie und abdomineller maligner Raumforderung (Abb. 24).



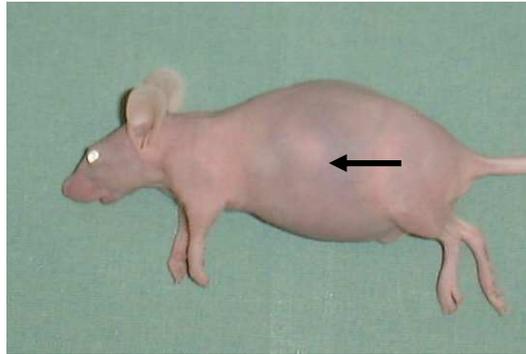
**Abb. 24: Tortendiagramm mit Darstellung der Aufteilung der Befunde bei Euthanasie nach HSC45-M2-Inokulation**

Bei Autopsie zeigte sich bei den Tieren nach i.p. HSC45-M2-Tumorzellinokulation das typische makroskopische Bild einer Peritonealkarzinose mit großteils weiterer diffuser maligner Tumorzellinfiltration mit Organfiliae (Abb. 25).



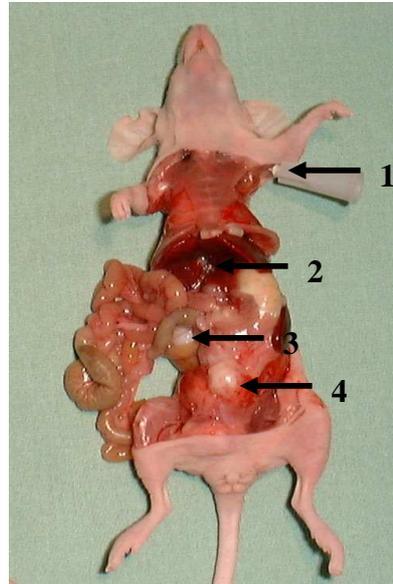
**Abb. 25: Versuchstier mit Peritonealkarzinose nach Euthanasie**  
 1. oberflächliche Lebermetastase  
 2. deutliche Peritonealkarzinose am Mesenterium

50 % der verstorbenen Tiere wiesen neben einer abdominellen Metastasierung eine maligne Aszitesbildung mit klinischem Zeichen einer Abdomenumfangszunahme auf. In 19 % war der Aszites verbunden mit Kachexie. Zudem wurden diese Tiere durch Bewegungsarmut und Apathie auffällig (Abb. 26).



**Abb. 26: Versuchstier mit Aszites nach Euthanasie**

Deutliche Abdomenumfangszunahme bei Aszitesbildung mit durch die Haut ( → ) erkennbarer Raumforderung und anämischen Hautkolorit



**Abb. 27: Autopsie bei Euthanasie nach HSC45-M2-Tumorzellinokulation und 1 x 0,37 MBq <sup>213</sup>Bi-d9MAk i.p. Applikation**

1. axilläre Lymphadenopathie, 2. oberflächliche Lebermetastase,
3. peritoneale Raumforderung, 4. Tumor im Unterbauch

Eines von den insgesamt 95 autopsierten Tieren wies nach Applikation von  $1 \times 0,37 \text{ MBq } ^{213}\text{Bi-d9MAk}$  neben Aszites, abdominellem Tumor eine unklare axilläre Lymphadenopathie auf (Abb. 27).

Die histopathologische Darstellung eines Tumors (vergleichbar mit Abb. 27, Nr. 4) mittels H.E. Färbung zeigt eine unterschiedliche Zelldichte und Zellverteilung innerhalb des Tumorknotens (Abb. 28).

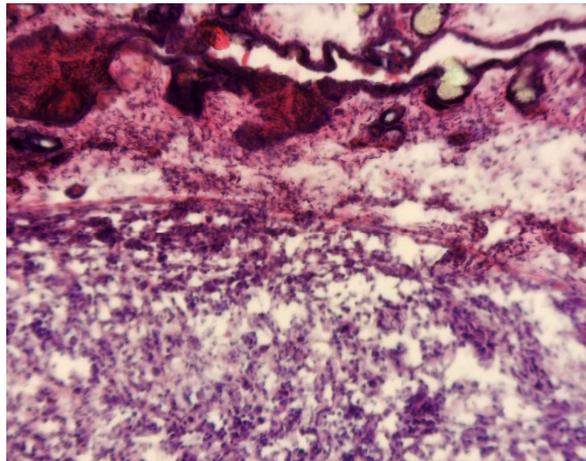


Abb. 28: H.E. Färbung eines Tumorknotens

#### 4.3.4 Bewertung des Körpergewichtsverlaufs

Huber (2003) zeigte, dass eine HSC45-M2-Tumorzellinokulation ohne bzw. mit nachfolgender RIT mit  $7,4 \text{ MBq } ^{213}\text{Bi-d9MAk}$  8 d nach Zellinjektion zu einer initialen KG-Reduktion mit anschließender Zunahme des Gewichts durch Aszitesbildung führte. In Hinblick auf diese Erkenntnisse wurde evaluiert, ob aus einer zeitlichen KG-Änderung ein Rückschluss auf Therapieerfolg/-versagen und Toxizität der ein- oder zweimaligen  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$ -RIT getroffen werden konnte.

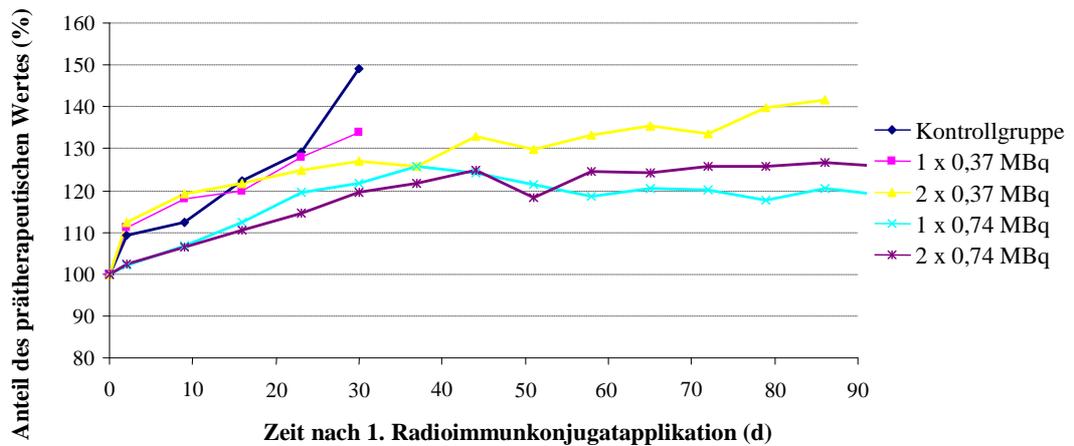
Verglichen wurden 5 Versuchsgruppen nach i.p. Tumorzellinokulation mit HSC45-M2; eine Kontrollgruppe ohne RIK-Applikation ( $n = 6$ ), Gruppen (je  $n = 12$ ) mit  $1 \times 0,37 \text{ MBq}$  bzw.  $1 \times 0,74 \text{ MBq } ^{213}\text{Bi-d9MAk}$ -Applikation 8 d nach Tumorzellinokulation und Gruppen mit zweimaliger  $0,37 \text{ MBq}$  bzw.  $0,74 \text{ MBq } ^{213}\text{Bi-d9MAk}$ -Applikation 8 d und 15 d nach Tumorzellinokulation.

Die graphische Darstellung des KG-Verlaufs über die Zeit nach HSC45-M2-Inokulation bezieht sich auf den prätherapeutischen Ausgangswert des Gewichts (100 %) der einzelnen Gruppen.

Es ergab sich im Vergleich der Gruppe mit Tumorzellinokulation ohne RIK-Applikation und den Gruppen mit einmaliger vs. zweimaliger Applikation, dass die i.p. Injektion von je 500 µl des RIK keinen signifikanten Einfluss auf das KG hatte. Huber (2003) zeigte, dass das Gewicht von gesunden, nicht tumorzellinokulierten und nicht therapierten, Swiss nu/nu Mäusen über 56 d kontinuierlich auf 120 % des Ausgangsgewichts anstieg.

Innerhalb der ersten 16 d nach 1. RIT (23 d nach Tumorzellinokulation) erreichten die Tiere der Kontrollgruppe (HSC45-M2-Inokulation ohne Therapie), die Gruppen mit 1 x 0,37 MBq und 2 x 0,37 MBq die 120 % ihres Ausgangsgewichts und mit zunehmenden Gewicht mussten die Tiere dieser Gruppen nach Abbruchkriterien (s. 3.8.3) getötet werden (Abb. 29). Therapieversagen, auf Grund von Tumorprogression mit/ohne Aszitesbildung und/oder Tumorkachexie, führte in der Mehrzahl der ausgewerteten Fälle zu einer Zunahme des Gewichts bei Euthanasie (s. 4.3.3 Abb. 23).

Versuchstiere, die 1 x 0,74 MBq oder 2 x 0,74 MBq nach Tumorzellinjektion appliziert bekamen, zeigten einen deutlich geringeren Anstieg des KG. Die Gruppe mit 1 x 0,74 MBq erreichte die 120 % Grenze am 30. Tag nach Tumorzellinokulation und die Versuchsgruppe mit 2 x 0,74 MBq am 37. Tag nach Tumorzellinokulation. Im Verlauf lag ihr Gewicht zwischen 120 % und 130 % des prätherapeutischen Wertes (Abb. 29).



**Abb. 29: Körpergewichtsverlauf der Versuchsgruppen über die Zeit nach 1. Radioimmuntherapie**  
Es zeigte sich abhängig von der Therapiemodalität ein Anstieg des Körpergewichts

#### 4.3.5 Toxizität des $^{213}\text{Bi-d9MAk}$ -Konjugats

##### 4.3.5.1 Änderung der peripheren Blutzellen

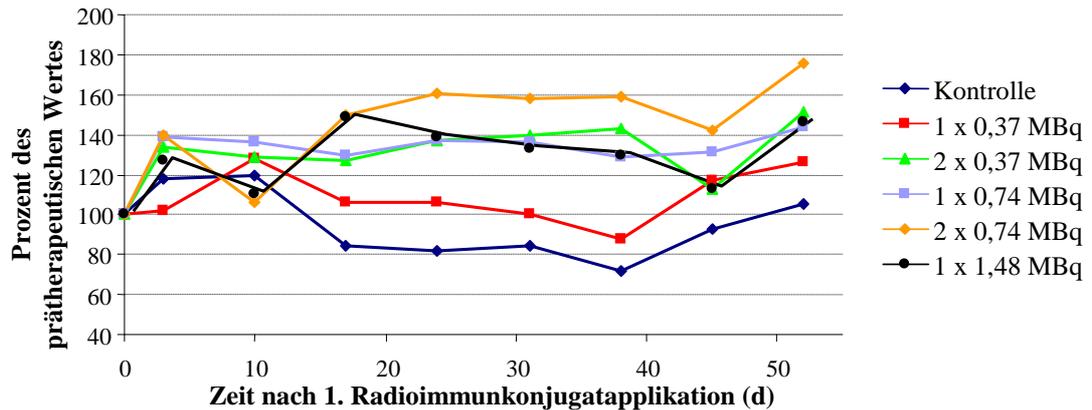
Nach i.p. Applikation von einmalig 0,37 MBq, 0,74 MBq oder 1,48 MBq bzw. zweimaliger Applikation im Intervall von 7 d mit 0,37 MBq, 0,74 MBq des  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$ -Konjugats wurde der zeitliche Verlauf von Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten im peripheren Blut der Swiss nu/nu Mäuse bestimmt.

Bei allen untersuchten Gruppen zeigte sich eine Zunahme der Leukozyten nach i.p. Injektion des  $^{213}\text{Bi}$ -Immunkonjugats bzw. der reinen PBS-Lösung (Kontrollgruppe) bis zum 10. Tag nach erster i.p. Applikation.

Die weißen Blutkörperchen stiegen am 10. Tag bei Versuchstieren mit 1 x 0,37 MBq auf 128 %, mit 2 x 0,37 MBq auf 129 %, mit 1 x 0,74 MBq auf 136 %, mit 2 x 0,74 MBq auf 106 %, mit 1 x 1,48 MBq auf 110 % und bei den Kontrollmäusen auf 120 % des prätherapeutischen Ausgangswertes an.

Bei Messungen nach 10 d schwankten die Leukozytenzahlen der mit RIK-injizierten Tiere zwischen dem prätherapeutischen Wert und einer Zunahme auf maximal 176 % des Ausgangswertes. Bei den PBS-injizierten Kontrolltieren sanken die weißen

Blutkörperchen bei den Messungen nach Tag 10 um 17 % im Vergleich zum Anfangswert. Es zeigte sich, dass Tiere die lediglich PBS i.p. erhielten deutlich geringere positive Änderungen der Leukozytenzahlen aufwiesen, als Tiere, die das  $^{213}\text{Bi}$ -Immunkonjugat erhielten (Abb. 30).



**Abb. 30: Zeitlicher Verlauf der Leukozyten ohne RIK-Applikation und nach Applikation von 1 x 0,37 MBq, 2 x 0,37 MBq, 1 x 0,74 MBq, 2 x 0,74 MBq oder 1 x 1,48 MBq  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk**  
Nach ein- oder zweimaliger Applikation des RIK zeigte sich keine Suppression der Leukozyten im Blut

Die i.p.  $^{213}\text{Bi}$ -Immunkonjugatapplikation mit 1 x 0,37 MBq, 1 x 0,74 MBq, 1 x 1,48 MBq, 2 x 0,37 MBq oder 2 x 0,74 MBq induzierte keine signifikante Abnahme der Erythrozyten. Es konnte folglich keine strahleninduzierte toxische Wirkung auf die Reihe der roten Blutzellen nachgewiesen werden. Von allen Versuchsgruppen zeigten die PBS-injizierten Kontrolltiere die niedrigsten Werte der roten Blutkörperchen innerhalb der ersten 20 d nach Studienbeginn. Die Erythrozyten sanken um maximal 6 %, verglichen mit dem prätherapeutischen Ausgangsniveau (Abb. 31).

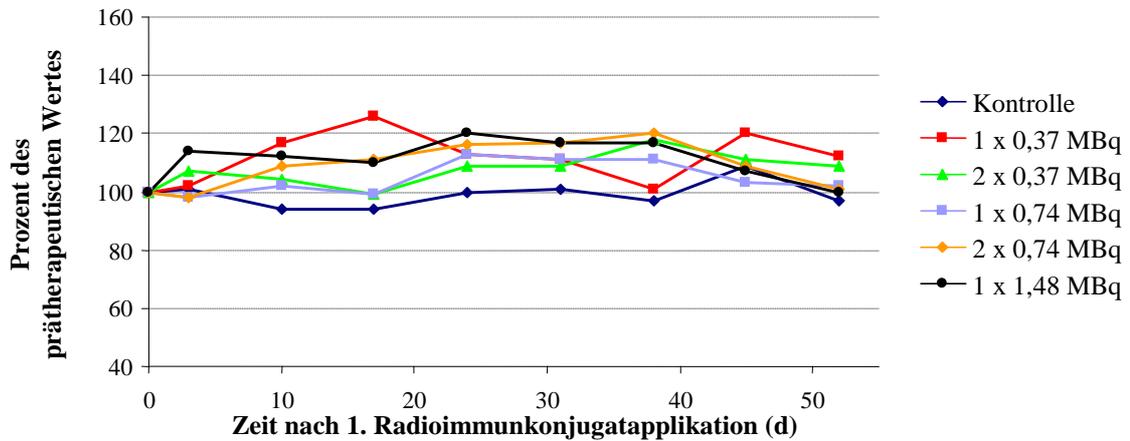


Abb. 31: Zeitlicher Verlauf der Erythrozyten ohne RIK-Applikation und nach Applikation von 1 x 0,37 MBq, 2 x 0,37 MBq, 1 x 0,74 MBq, 2 x 0,74 MBq oder 1 x 1,48 MBq  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$   
Keine Reduktion der Erythrozyten in Abhängigkeit zur applizierten Aktivität

Die Evaluation des Thrombozytenverlaufs zeigte keine signifikante strahleninduzierte Abnahme der Zellzahl nach 1. RIT bei den verschiedenen Therapiegruppen (Abb. 32).

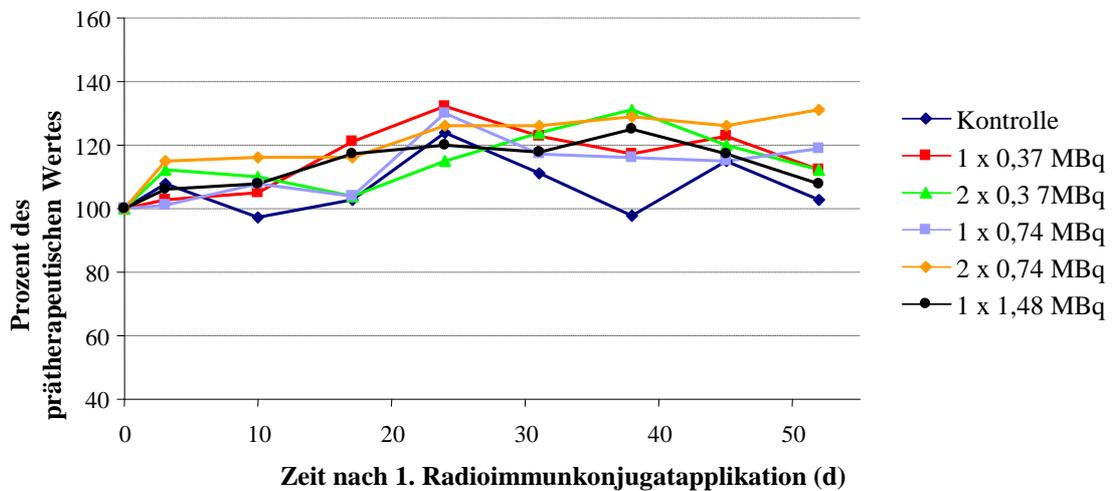


Abb. 32: Zeitlicher Verlauf der Thrombozyten ohne RIK-Applikation und nach Applikation von 1 x 0,37 MBq, 2 x 0,37 MBq, 1 x 0,74 MBq, 2 x 0,74 MBq oder 1 x 1,48 MBq  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$   
Keine Reduktion der Thrombozyten in Abhängigkeit zur applizierten Aktivität

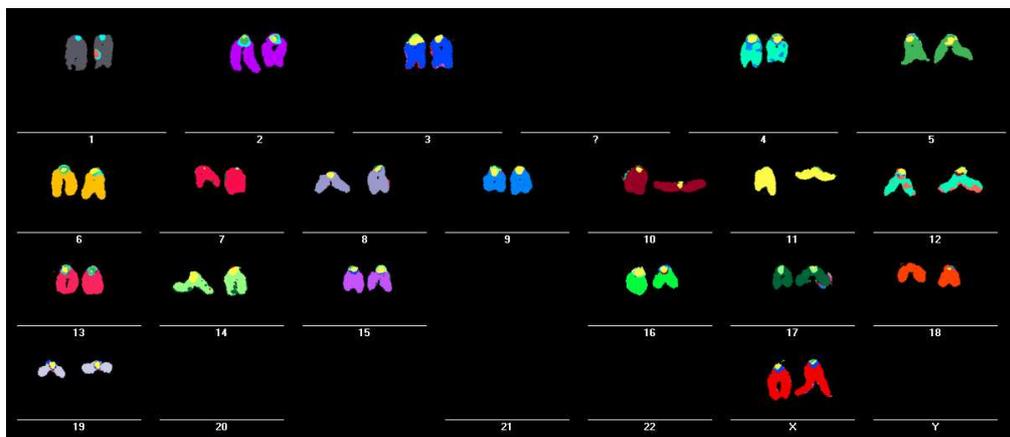
#### 4.3.5.2 Chromosomale Schäden der Knochenmarkszellen

Nach Gewinnung der Knochenmarkszellen wurden die murinen Karyogramme von Herrn Stefan Nathrath mit Unterstützung durch das Institut für Humangenetik, Klinikum Rechts der Isar der Technischen Universität München, mittels M-FISH untersucht und die Ergebnisse mitgeteilt.

Den Versuchstieren wurden einmalig 0,74 MBq, 1,48 MBq, 7,4 MBq oder 14,8 MBq  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$  i.p. injiziert. Bei fraktionierter Gabe erhielten die Tiere zweimalig 0,74 MBq oder 1,48 MBq im Intervall von 7 d i.p. appliziert.

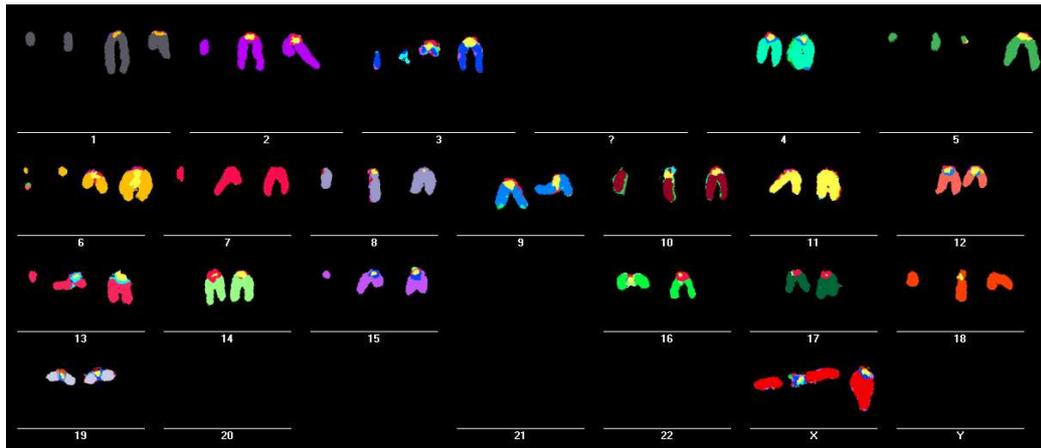
Bei den verwendeten Aktivitäten bis 1,48 MBq konnten keine Chromosomenaberrationen beobachtet werden. Auch die zweimalige Applikation von 0,74 MBq und 1,48 MBq führte bei Untersuchungen 24 h nach der 2. RIT zu keinen chromosomalen Veränderungen.

Die untersuchten Karyogramme entsprachen denen von untherapierten Balb/c Mäusen (Abb. 33).



**Abb. 33: normales Karyogramm einer Balb/c Maus (M-FISH)**

Bei der Untersuchung der Knochenmarkszellen einer Balb/c Maus 24 h nach einmaliger Applikation von 7,4 MBq konnten lediglich bei 1 von 20 Metaphasen strukturelle Chromosomenaberrationen nachgewiesen werden (Abb. 34).



**Abb. 34:** strukturelle Chromosomenaberrationen (bei 1, 2, 3, 5, 6, 7, 10, 13, 15, 18, X)  
24 Stunden nach 7,4 MBq  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$  i.p. Applikation (M-FISH)

#### 4.3.5.3 Histopathologische Beurteilung der Nieren

Die histopathologische Auswertung der Nierenschnitte und mündliche Befundmitteilung erfolgte durch Frau Dr. Leticia Quintanilla-Fend.

Die einmalige i.p. Applikation von 0,37 MBq oder 0,74 MBq bzw. zweimalige Injektion von 0,37 MBq oder 0,74 MBq führte zu keiner histopathologischen Nierenschädigung.

## 5 Diskussion

Die Peritonealkarzinose gastrointestinaler Malignitäten stellt eine terminale Tumorerkrankung mit einer Lebenserwartung zwischen 3 bis 6 Monaten dar und die Prognose für Patienten mit Magenkarzinomen verbleibt, trotz multimodaler Therapieverfahren, auf Grund der mäßigen Chemo- und Radiosensitivität, schlecht (Lordick et al., 2005; Sadeghi et al., 2000).

Bei ca. 10 % - 20 % der Patienten mit Magenkarzinomen wird intraoperativ, bei geplanter Resektion des Primärtumors, erstmals die Diagnose einer Carcinomatosis peritonei gestellt, insbesondere gehäuft bei Karzinomen vom Siegelringzelltyp. Als Therapieoptionen zur maximalen Tumorreduktion bei peritonealer Tumorzell dissemination stehen aktuell intraoperative Verfahren wie ausgeweitete Gastrektomie und Peritonektomie sowie perioperative intraperitoneale Chemotherapie, adjuvante und neoadjuvante Chemo- und Strahlentherapien zur Verfügung. Dennoch liegt das 5-Jahresüberleben auch nach kompletter Zytoreduktion bei lediglich 10 % und das mediane Überleben der Patienten bei 12 Monaten (Sugarbaker und Yonemura, 2000).

Neue in klinischer Erprobung stehende Therapiemodalitäten, wie z.B. Immuntherapieverfahren mit Trastuzumab (anti-HER2-MAk) oder anti-EGFR-MAk zeigten bei Überexpression von entsprechenden Zellmolekülen in Kombination mit Chemotherapie erste positive Erfolge (Lordick et al., 2005).

Becker et al. (1999) konnten bei ca. 50 % der untersuchten Patienten mit Magenkarzinomen eine Mutation im Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin und eine spezifische in-frame Deletion am Exon 9 des E-Cadherins mit resultierender Mutation des Adhäsionsoberflächenmoleküls in retrospektiven Studien bei ca. 10 % der untersuchten diffusen Magenkarzinome nachweisen.

Ein erfolgsversprechender präklinischer Therapieansatz ist die spezifische RIT mit dem zytotoxischen  $\alpha$ -Strahler  $^{213}\text{Bi}$ . Durch Koppelung von  $^{213}\text{Bi}$  an den tumorzellspezifischen d9MAk kommt es zu einer spezifischen Bindung an das mutierte E-Cadherin Molekül der Tumorzellen.

In Vivo Versuche am Mausmodell konnten bei einmaliger lokoregionaler i.p. Applikation des  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk-Konjugats signifikante Erfolge im Überleben der Tiere bei früher und fortgeschrittener peritonealer Metastasierung durch Magenkarzinomzellen des diffusen humanen Siegelringtyps vom Typ 45-M2 erzielen, jedoch mit Nachweis von Toxizität bei ansteigender Radioaktivität. Das beste Ergebnis konnte nach Gabe von 1,85 MBq  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk 1 d nach Tumorzellinokulation erzielt werden. 87 % der therapierten Tiere waren 300 d nach HSC45-M2-Inokulation noch am Leben. Nach Applikation von 7,4 MBq  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk 1 d nach Tumorzellinokulation lag das mediane Überleben nur noch bei 213 d auf Grund der induzierten Toxizität. Es zeigte sich eine Überlegenheit in der Verwendung des spezifischen AK (d9MAk) im Vergleich zum unspezifischen AK (d8MAk) im fortgeschrittenen Tumorstadium (Beck et al., 2007).

Ziel dieser Studie bestand in der Optimierung der lokoregionalen  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk-RIT in Vitro und in Vivo am Mausmodell hinsichtlich der therapeutischen Effizienz, der Toxizität und des Therapiemonitorings mittels CEA-Konzentration, insbesondere in Hinblick auf eine zweimalig fraktionierte Applikation des Radiopharmakons mit niedrigen Aktivitäten bei begrenzter Verfügbarkeit des  $\alpha$ -Strahlers  $^{213}\text{Bi}$ .

## 5.1 $\alpha$ -Radioimmuntherapie mit $^{213}\text{Bi}$ Bismut

Die therapeutische Effizienz der RIT von malignen Erkrankungen ist abhängig von der geeigneten Auswahl des Radionuklids, Applikationsart (systemisch, lokoregional, intratumoral), Aktivität, fraktionierter Administration, Pharmakokinetik und Spezifität des AK. Die therapeutische Überlegenheit der  $\alpha$ -RIT gegenüber der Verwendung von  $\beta$ -Strahlern wurde von zahlreichen Studiengruppen belegt (Borchardt et al., 2000; Imam, 2001; McDevitt et al., 1998; Zalutsky und Vaidyanathan, 2000).  $\alpha$ -Strahler weisen eine höhere Energie bei geringerer Reichweite mit größerer Zytotoxizität im Vergleich zu  $\beta$ -Nukliden auf (Imam, 2001). Insbesondere zur Behandlung von Mikrometastasen, hämatologischen Erkrankungen und disseminierten Tumorzellen (Peritonealkarzinose, neoplastische Meningitiden) wurde in Studien die Anwendung von  $\alpha$ -emittierenden Nukliden favorisiert (Behr et al., 1999). In zahlreichen präklinischen Studien wurden  $\alpha$ -RIK mit hohen Aktivitäten (5,5 MBq - 40,7 MBq) im

i.p. oder s.c. Tumormodell zur Therapie eingesetzt. Die Ergebnisse dieser Studien zeigten eine Wachstumsinhibition der Tumore oder eine Tumorregression mit ansteigenden Aktivitäten. Jedoch konnte auf Grund der kurzen Observationszeiten keine Aussage über radiotoxische Langzeitstrahlenschäden getroffen werden (Adams et al., 2000; Allen et al., 2001; Andersson et al., 2000; Behr et al., 1999; Borchardt et al., 2000; Kennel et al., 2002; McDevitt et al., 2000; Milenic<sup>(2)</sup> et al., 2004; Nikula et al., 1999).

<sup>213</sup>Bi (LET ~100 keV/μm, HWZ 45,6 min) mit einer Reichweite von ~60 μm ist nach Konjugation an einen Carrier ein ideales zytotoxisches Agens für die Elimination von einzelnen Tumorzellen oder Tumorzellclustern.

In einem ca. 20-minütigen Prozess wurde <sup>213</sup>Bi mittels Eluierung aus einem <sup>225</sup>Ac/<sup>213</sup>Bi-Generatorsystem gewonnen. Direkt nach Eluation von <sup>213</sup>Bi erfolgte die Koppelung des gewonnenen α-Nuklids <sup>213</sup>Bi an den monoklonalen AK d9-E-Cadherin über das bifunktionelle Chelat SCN-CHX-A''-DTPA (2-(4-isothiocyanatobenzyl)-trans-cyclohexyldiethylenetriamin-Pentaacetat). Es zeigte sich bei insgesamt 53 abgeschlossenen Eluierungsprozessen eine <sup>213</sup>Bi-d9MAk-Markierungseffizienz, nach Abtrennung des ungebundenen <sup>213</sup>Bi-Anteils, von 95 % ± 3 % (MW ± SD). Seidenschwang (2006) zeigte ein vergleichbares Ergebnis von 97 % ± 11 % (Median ± SD) bei 42 Markierungsprozessen und Huber (2003) gab die mittlere Ausbeute mit 98 % an.

Auf Grund der sehr kurzen HWZ von <sup>213</sup>Bi mit 45,6 min ist eine schnelle Konjugation an das Immunglobulin und zügige Administration des RIK von essentieller Bedeutung. Die Zeit zwischen Abschluss der <sup>213</sup>Bi-d9MAk-Markierung und i.p. Injektion bzw. Inkubation betrug 15-20 min. Dies entsprach etwa der Zeit, die auch andere Studiengruppen benötigten. McDevitt<sup>(1)</sup> et al. (1999) benötigten 23 ± 3 min (n = 66) bis zur RIK-Administration am Patienten.

## 5.2 Bewertung des $^{213}\text{Bi}$ -d9-E-Cadherin-Konjugats in Hinblick auf die resultierende Tumorzelltoxizität bei HSC45-M2-Zellen

Die Tumorzellspezifität des  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk-Konjugats wurde bereits durch Huber et al. (2003) belegt. Es zeigte sich nach in Vitro Inkubation der HSC45-M2-Zellen eine 25 %ige Bindung des spezifischen  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk-Konjugats an die Tumorzellen, wohingegen das unspezifische  $^{213}\text{Bi}$ -d8MAk-Konjugat lediglich eine 2 %ige Bindung aufwies. Zöckler (2006) bestätigte die Spezifität unter Verwendung des  $\beta$ -RIK  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk mit einer Bindung von 10 % - 21 % an HSC45-M2 im Gegensatz zum unspezifischen  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk mit 1 % - 4,5 %. Ursächlich für die schwache Bindung des d8MAk ist eine unspezifische Interaktion der Fc-Domäne des AK an Oberflächenmoleküle der HSC45-M2 (Seidl et al., 2005).

Neben der spezifischen Bindung des  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk an das mutierte Adhäsionsmolekül d9-E-Cadherin tragen auch unspezifische Kreuzfeuereffekte (Zytotoxizität ausgehend von ungebundenen RIK) bei einem hohen Verhältnis von  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk zu vorhandenen Antikörperbindungsstellen zur Zytotoxizität bei.

Unterstützt wird diese These dadurch, dass die mittleren Überlebenszeiten nach einmaliger  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk- vs. tumorzellunspezifischer  $^{213}\text{Bi}$ -d8MAk-Therapie 1 d nach HSC45-M2-Tumorzellinokulation, bei Aktivitäten  $\geq 1,85$  MBq, sich als nicht signifikant unterschiedlich erwiesen haben. Somit war die Zytotoxizität bei Therapie 1 d nach Tumorzellinokulation auf tumorzellunspezifische Effekte zurückzuführen (Beck et al., 2007). Lediglich die Applikation von 0,37 MBq  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk im Vergleich zu unspezifischen 0,37 MBq  $^{213}\text{Bi}$ -d8MAk erbrachte einen signifikanten Vorteil im medianen Überleben (99 d vs. 37 d) zugunsten der spezifischen RIT (Beck et al., 2007). Auf Grund der aktuell geringen Verfügbarkeit des  $\alpha$ -Strahlers  $^{213}\text{Bi}$  wurden in dieser Studie geringe Aktivitäten eingesetzt und eine Optimierung des Therapieerfolgs mittels fraktionierter Applikation evaluiert. Durch Reduktion der Aktivität auf der einen Seite und Verringerung der AK-Menge andererseits wurde versucht, unspezifische Kreuzfeuereffekte in der spezifischen  $\alpha$ -RIT zu minimieren.

Mittels Fluorescence assorted cell sorting (FACS)-Analyse ermittelt, lag die Antigenanzahl der mutierten d9-E-Cadherin-Adhäsionsmoleküle bei  $3 \times 10^5$  pro HSC45-M2-Zelle (Seidenschwang, 2006).

Im in Vivo Versuch wurden jeder Maus  $1 \times 10^7$  Tumorzellen i.p. appliziert mit daraus resultierenden  $3 \times 10^{12}$  d9MAk-Bindungsstellen 1 d nach Tumorzellinokulation.

Rechnerisch ermittelt wurde den Versuchstieren im Mittel  $1,3 \times 10^{13}$  Moleküle d9MAk appliziert, dies entsprach einer mittleren Antikörpermenge von  $3,25 \mu\text{g}$  in Abhängigkeit zur applizierten Aktivität (s. 3.6.2.2 Gleichung 1). Die zum Applikationszeitpunkt erreichten spezifischen Aktivitäten betragen  $467 \text{ MBq} \pm 383 \text{ MBq}$  (MW  $\pm$  SD). Bei der geringsten spezifischen Aktivität war lediglich jedes 27150ste Molekül, bei der mittleren jedes 2150ste Molekül und bei der maximalen jedes 706ste Molekül d9MAk mit  $^{213}\text{Bi}$  gekoppelt. Huber et al. (2003) erreichten ein vergleichbares Ergebnis mit einem maximalen Verhältnis von  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk : d9MAk mit 1 : 685. Huber et al. (2003) setzten ca.  $10 \mu\text{g}$  Antikörper d9MAk je Maus ein, jedoch waren die applizierten Aktivitäten in der Regel deutlich höher. Zöckler (2006) verwendete am gleichen Tumor-Antikörper-Modell den  $\beta$ -Strahler  $^{177}\text{Lu}$  mit einer HWZ von 6,71 d, wodurch sich eine deutlich bessere Ratio mit 1 : 8 ( $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk : d9MAk) ergab (s. 3.6.2.2 Gleichung 2).

Acht Tage nach Tumorzellinokulation liegen bei ca. 5 Teilungsvorgängen  $3,2 \times 10^8$  Tumorzellen mit  $9,6 \times 10^{13}$  AK-Bindungsstellen vor, wenn man von einer mittleren Verdoppelungszeit von 34 h für HSC45-M2-Zellen ausgeht.

Makroskopische und histologische Untersuchungen von Huber (2003) zeigten, dass 8 d nach Tumorzellinokulation ohne Therapie eine ausgedehnte Peritonealkarzinose mit diaphragmaler, parapankrealer, splenaler, hepatischer und mesenterialer Metastasierung bestand. Im Gegensatz zum Therapiebeginn 1 d nach Tumorzellinokulation bestand bei Therapiebeginn 8 d nach HSC45-M2-Injektion ein Antigenüberschuss ( $9,6 \times 10^{13}$  AK-Bindungsstellen) auf den Tumorzellen im Vergleich zur mittleren applizierten Antikörpermenge ( $1,3 \times 10^{13}$ ). Auf Grund der geringen Reichweite des  $\alpha$ -Strahlers  $^{213}\text{Bi}$  von  $\sim 60 \mu\text{m}$  wurde der Therapieerfolg der  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk-RIT durch manche Autoren bei fortgeschrittener Metastasierung bezweifelt. Jedoch zeigten Beck et al. (2007) eine signifikante Überlegenheit im Überleben nach spezifischer  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk Therapie mit

7,4 MBq bzw. 22,2 MBq im Vergleich zur unspezifischen Therapie mit  $^{213}\text{Bi-d8MAk}$  acht Tage nach Tumorzellinokulation. Ursächlich wurde ein geringeres Verhältnis von RIK im Verhältnis zu Oberflächenantigenen bei fortgeschrittenem Tumorstadium diskutiert. Studien von Elgqvist<sup>(2)</sup> et al. (2006) und Milenic<sup>(1)</sup> et al. (2004) bestätigten diesen Effekt bei Therapie mit spezifischen bzw. unspezifischen RIK in frühen Tumorstadien und erhöhter Spezifität zugunsten des spezifischen RIK bei fortgeschrittener Tumorerkrankung.

### **5.3 Effizienz der einmaligen und fraktionierten**

#### **Radioimmuntherapie mit niedrigen Aktivitäten von $^{213}\text{Bi-d9MAk}$**

##### **5.3.1 Analyse der HSC45-M2 Klonogenität in Vitro**

Nach ein- oder zweimaliger Inkubation im einwöchigen Intervall mit 0,185 MBq, 0,37 MBq oder 0,74 MBq  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$  bei 50 bzw. 100 Ausgangszellen pro 1 ml Inkubationsvolumen erfolgte die Bestimmung der Klonogenität nach 15-tägiger Subkultivierung (s. 4.2.3). Ziel dieser Untersuchung war es, den Nutzen von ansteigenden Aktivitäten und eine mögliche Überlegenheit der zweimaligen vs. einmaligen Applikation des RIK auf die Klonogenität von HSC45-M2-Zellen zu evaluieren.

Es zeigte sich keine signifikante Überlegenheit unabhängig von der Ausgangszellzahl bei fraktionierter Applikation der Gesamtaktivität nach zweimaliger Applikation von 0,185 MBq bzw. 0,37 MBq im Vergleich zur einmaligen Applikation von 0,37 MBq bzw. 0,74 MBq  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$ .

Die errechnete mittlere spezifische Aktivität lag bei 348 MBq/mg AK (250 MBq/mg AK – 529 MBq/mg AK) mit einem mittleren Verhältnis von 1 : 2780  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$  : d9MAk. Der berechnete Antikörperüberschuss lag bei ca. 100.000 im Verhältnis zu den auf den Zellen vorhandenen AK-Bindungsstellen.

Seidenschwang (2006) zeigte in unterschiedlichen Versuchsansätzen den Einfluss auf die Klonogenität von HSC45-M2 nach Inkubation mit dem tumorzellspezifischen  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$  und unspezifischen  $^{213}\text{Bi-d8MAk}$ -Konjugat. Sie konnte keinen Unterschied zwischen spezifischen und unspezifischen RIK nachweisen. Die Ursache

wurde im Kreuzfeuereffekt gesucht; mit der Annahme, dass ungebundene RIK im Medium Tumorzellen ebenfalls bestrahlen und abtöten. Analoge Ergebnisse wurden durch Zöckler (2006) nach Applikation von  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk bzw.  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk erzielt. Die Hemmung der Proliferation von HSC45-M2 zeigte sich abhängig von der applizierten Aktivität nicht aber von der Spezifität des AK.

Seidl et al. (2005) untersuchten ebenfalls die Klonogenität der HSC45-M2-Tumorzellen nach  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk-Inkubation. Nach Aussaat von 80 Zellen erfolgte nach 24 h die Applikation von Aktivitäten von 0 MBq/ml bis 2 MBq/ml des RIK. Sieben bis 14 Tage nach Inkubation erfolgte die Auswertung der Klonogenität. Mit ansteigenden Aktivitätskonzentrationen kam es zu einer Reduktion der Klonogenität. Nach Applikation von 0,15 MBq wurde die Klonogenität (graphisch ermittelt) auf ca. 35 %, bei 0,37 MBq auf 23,5 % und bei 0,74 MBq auf ca. 5 % reduziert. In Abhängigkeit zur Ausgangszellzahl wurde in den hier vorliegenden Versuchen nach Applikation von 0,185 MBq die Klonogenität auf 79 % (50 Ausgangszellen) bzw. auf 54 % (100 Ausgangszellen) reduziert. Bei Seidl et al. (2005) zeigte sich nach Applikation von 0,15 MBq bei 80 Ausgangszellen eine bessere Reduktion der Klonogenität als nach Applikation von 0,185 MBq im hier vorliegenden Versuch. Die Klonogenität wurde bei 0,37 MBq auf 29 % (50 Zellen) bzw. 33 % (100 Zellen) und bei 0,74 MBq auf 3 % (50 Zellen) bzw. 2 % (100 Zellen) reduziert und war vergleichbar mit den Ergebnissen von Seidl et al. (2005).

Nach 1 x 0,185 MBq bzw. 2 x 0,185 MBq Applikation  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk ergab sich ein signifikanter Unterschied in der Proliferationsinhibition in Abhängigkeit zur Ausgangszellzahl (50 vs. 100 Zellen). Ursächlich könnte für dieses Resultat ebenfalls der Einfluss des Kreuzfeuereffekts sein. Wie bereits erwähnt wird der HSC45-M2-Zelluntergang durch die im Medium frei schwimmenden RIK verursacht und nicht durch eine spezifische  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk-Bindung an die Zellen. Untersuchungen von Macklies et al. (1992) mit dem  $\alpha$ -Strahler  $^{212}\text{Bi}$  zeigten, dass ca. 4  $\alpha$ -Teilchen den Zellkern zur Abtötung durchqueren mussten um diesen zu zerstören. Bei der geringen Aktivität von 0,185 MBq von ~4 nötigen vorbeischwimmenden RIK (Reichweite von 100  $\mu\text{m}$ ) letal geschädigt zu werden erscheint bei 50 Zellen im Vergleich zu 100 Zellen deutlich unwahrscheinlicher. Verstärkt wird diese These, dass es keinen signifikanten Unterschied in der Klonogenität zwischen der unbehandelten Kontrollgruppe und der

Gruppe mit 50 Ausgangszellen nach 1 x 0,185 MBq gab, jedoch aber einen signifikanten Unterschied zwischen Kontrollgruppe und der Gruppe mit 100 Ausgangszellen nach 1 x 0,185 MBq Applikation.

### 5.3.2 Bewertung der einmaligen und fraktionierten Radioimmuntherapie in Vivo

Senekowitsch-Schmidtke et al. (2001), Huber (2003), Huber et al. (2003) und Beck et al. (2007) etablierten das in Vivo-Mausmodell der HSC45-M2-Peritonealkarzinose und der spezifischen  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk bzw. unspezifischen  $^{213}\text{Bi}$ -d8MAk i.p. RIT. Beck et al. (2007) zeigten, dass die i.p. Applikation des nicht radioaktiv markierten d9MAk (38 d medianes Überleben) 1 d nach Tumorzellinokulation zu keinem signifikanten Unterschied im Überleben im Vergleich zur untherapierten Kontrollgruppe (19 d medianes Überleben) führte. Die erfolgreichste Therapiemodalität in Hinblick auf das Langzeitüberleben, ohne Nachweis einer induzierten Toxizität auf den murinen Organismus, war die i.p. Injektion von 1,85 MBq  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk bzw. 1,85 MBq  $^{213}\text{Bi}$ -d8MAk 1 Tag nach Tumorzellinokulation. Durch Eskalation der applizierten Aktivität wurde die strahleninduzierte Toxizität auf den Gesamtorganismus erhöht und das Überleben der Tiere reduziert (Beck et al., 2007).

Auf Grund der geringen Verfügbarkeit von  $^{213}\text{Bi}$  wurden in dieser Studie, die im Vergleich zu Huber (2003) und Huber et al. (2003) eingesetzten i.p. applizierten Aktivitäten in Vivo reduziert. Es erfolgte in dieser Studie eine weitere Optimierung der  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk-Therapie hinsichtlich einer Aktivitätsreduktion mit Evaluierung der therapeutischen Effizienz einer fraktionierten RIK-Applikation.

Weiblichen Swiss nu/nu Mäusen wurden i.p. ein- oder zweimalig (im Intervall von 7 d) 0,37 MBq, 0,74 MBq bzw. 1,48 MBq  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk 1 d oder 8 d nach i.p. Tumorzellinokulation appliziert.

Das mediane Überleben aller Therapiegruppen war signifikant länger, im Vergleich zur untherapierten Kontrollgruppe (medianes Überleben 22 d). Bei Euthanasie zeigten alle Tiere, die in die Studie eingeschlossen waren, Zeichen einer peritonealen Metastasierung ohne klinischen oder makroskopischen Hinweis auf eine strahleninduzierte Organschädigung.

Bei Therapiebeginn 1 d nach Tumorzellinokulation (Modell der frühesten peritonealen Metastasierung bzw. Situation nach R0-Resektion) wurde ein medianes Überleben nach einmaliger Applikation von 0,37 MBq von 48 d und nach 0,74 MBq  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$  von 42 d, ohne signifikanten Unterschied zwischen den Therapiegruppen, erzielt.

Bei zweimaliger RIT im Intervall von 7 d mit Therapie am 1. und 8. Tag nach Zellinokulation mit 0,37 MBq oder 0,74 MBq wurde ein medianes Überleben von 84 d bzw. 86 d, ebenfalls ohne signifikanten Unterschied, erreicht.

Zur Imitation des Modells der fortgeschrittenen peritonealen Metastasierung wurde die einmalige bzw. fraktionierte Therapie mit Therapiebeginn 8 d nach Tumorzellinokulation durchgeführt.

Nach einmaliger i.p. Applikation von 0,37 MBq, 0,74 MBq bzw. 1,48 MBq  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$  8 d nach Tumorzellinokulation wurde kein signifikanter Unterschied im medianen Überleben der drei Versuchsgruppen (0,37 MBq mit 37 d, 0,74 MBq mit 42 d, 1,48 MBq mit 44 d) erzielt. Die Überlebenszeiten waren jedoch vergleichbar mit dem der Tiere, die schon 1 d nach Zellinokulation die RIT erhielten (0,37 MBq mit 48 d, 0,74 MBq mit 42 d). Ursache könnte das höhere AG/AK-Verhältnis bei fortgeschrittener Karzinose sein, wodurch die Wahrscheinlichkeit, dass alle  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$  Konjugate an die d9-E-Cadherin-Oberflächenbindungsstellen binden höher ist als bei geringerer AK-Bindungsstellen der HSC45-M2-Zellen einen Tag nach Tumorzellinokulation.

Nach einmaliger Therapie 1 d bzw. 8 d nach HSC45-M2-Inokulation konnte zwischen den Therapiegruppen trotz ansteigender Aktivität kein signifikanter Unterschied im Überleben erzielt werden. Ursache könnte sehr wahrscheinlich ein zu geringer Unterschied zwischen den applizierten Aktivitäten bzw. eine zu geringe Gesamtaktivität zur Induktion einer kompletten Tumorelimination sein.

Im Modell der fortgeschrittenen Peritonealkarzinose mit Therapiebeginn 8 d nach Zellinjektion wurde den Versuchstieren 2 x 0,37 MBq oder 2 x 0,74 MBq im Intervall von 7 d i.p. appliziert. Nach fraktionierter Applikation von 0,37 MBq erreichten die Tiere ein medianes Überleben von 38 d und nach 0,74 MBq ein medianes Überleben von 68 d.

Zur Bewertung der Effizienz der fraktionierten, zweimaligen i.p. Applikation des  $^{213}\text{Bi-d9MAk-RIK}$  im Intervall von 7 d wurde das mediane Überleben der Therapiegruppen mit dem der Tiere nach einmaliger Applikation verglichen.

Bei Therapiebeginn 1 d nach Tumorzellinokulation erbrachte die fraktionierte Applikation von zweimalig 0,37 MBq bzw. 0,74 MBq  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$  (medianes Überleben 84 d bzw. 86 d) einen hochsignifikanten Überlebensvorteil im Vergleich zu Tieren mit einmaliger Applikation von 0,37 MBq (medianes Überleben 48 d) bzw. 0,74 MBq (medianes Überleben 42 d)  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$ . Die einmalige Applikation des RIK 1 d nach Tumorzellinokulation führte zu einem ~2-fach längeren Überleben und die zweimalige RIK-Applikation zu einem ~4-fach längeren Überleben im Vergleich zur Kontrollgruppe, jedoch unabhängig von der applizierten Gesamtaktivität. Es zeigte sich eine deutliche Überlegenheit der fraktionierten RIK-Applikation.

Der Vergleich zwischen einmaliger und zweimaliger RIT mit Therapiebeginn 8 d nach Tumorzellinokulation zeigte, dass es keine signifikante Unterscheidung im medianen Überleben der Tiergruppen nach 1 x 0,37 MBq (medianes Überleben 37 d), 2 x 0,37 MBq (medianes Überleben 38 d) und 1 x 0,74 MBq (medianes Überleben 42 d)  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$  Applikation gab. Die zweimalige Applikation von 0,74 MBq (medianes Überleben 68 d) zeigte sich der einmaligen Applikation von 1,48 MBq (medianes Überleben 44 d) mit einem deutlichen Trend ( $p=0,053$ ) im Überleben zugunsten der fraktionierten Applikation überlegen. Es zeigt sich auch hier ein Vorteil der fraktionierten RIT. Jedoch sollte eine Erhöhung der Aktivitäten und des Fraktionierungsgrades überdacht werden, um eine eventuelle statistische Signifikanz zugunsten der fraktionierten Therapie zu erreichen.

Abweichend zu den hier erhobenen Daten erreichten Beck et al. (2007) nach einmaliger i.p. Applikation von 0,37 MBq  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$  1 d nach Tumorzellinokulation ein medianes Überleben von 99 d. Gründe für das längere Überleben der Tiere im gleichen Tumor- und Therapiemodell bei Beck et al. (2007) sind spekulativ. Ursächlich könnten Unterschiede der HSC45-M2-Zelllinien, der Tumorzellaufbereitung/-injektion, der Swiss nu/nu Mäuse-Chargen und der eingesetzten spezifischen Aktivitäten in Frage kommen. In der Arbeit von Beck et al. (2007) wurde gezeigt, dass die Versuchsgruppen, mit Therapiebeginn 1 d nach Tumorzellinokulation, keinen signifikanten Unterschied

im Überleben nach unspezifischer bzw. spezifischer RIT gleicher Aktivitäten ab 1,85 MBq aufwiesen. (Beck et al., 2007). Die strahleninduzierte Toxizität auf die Tumorzellen wurde folglich durch unspezifische Kreuzfeuereffekte induziert und nicht durch den tumorzellgebundenen Anteil des spezifischen  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk-Konjugats (s. 5.2). Nur nach Gabe von geringerer Aktivität mit 0,37 MBq  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk (medianes Überleben 99 d) im Vergleich zur Applikation von 0,37 MBq  $^{213}\text{Bi}$ -d8MAk (medianes Überleben 37 d) wurde ein signifikanter Unterschied im Überleben der Tiere erhoben. Nach persönlicher Auskunft der Autoren wurde der signifikante Unterschied auch auf die erhöhte spezifische Aktivität zurückgeführt.

Beck et al. (2007) erzielten nach Applikation von 1 x 7,4 MBq bzw. 1 x 22,2 MBq  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk 8 d nach Tumorzellinokulation ein medianes Überleben von 73 d bzw. 86 d, welches signifikant länger war als nach Applikation des unspezifischen  $^{213}\text{Bi}$ -d8MAk-Konjugats bei gleicher Aktivität (Beck et al., 2007; Huber, 2003; Huber et al., 2003).

Beck et al. (2007) zeigten, dass nach einmaliger Applikation 8 d nach HSC45-M2-Zellinokulation von 7,4 MBq ein medianes Überleben von 73 d und von 22,2 MBq  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk von 86 d, mit Nachweis einer induzierten Radiotoxizität auf den murinen Organismus, erreicht werden konnte. Es zeigt sich folglich, dass eine fraktionierte Applikation von 2 x 0,74 MBq (Gesamtaktivität 1,48 MBq) am 8. und 15. Tag nach Tumorzellinokulation ohne Toxizitätsnachweis (s. 5.6) ein vergleichbares medianes Überleben (68 d) erzielt wie die einmalige Applikation der 5-fachen Gesamtaktivität von 7,4 MBq bei Beck et al. (2007).

Die fraktionierte Gabe von Radiopharmaka erscheint ein erfolgsversprechendes Konzept, da die systemische Toxizität bei gleichzeitiger Erhöhung der maximal tolerierten Aktivität reduziert werden kann. Auf Grund der Kenntnis der heterogenen Verteilung von RIK im Tumorgewebe mit folglich unterschiedlich starker Bestrahlung des Tumors ist eine fraktionierte RIT zu favorisieren, um bei erneuter RIK-Applikation noch nicht erlangte Tumorareale zu erreichen und damit die therapeutische Effizienz zu verbessern (DeNardo et al., 2002). Neben der Annahme einer RIK-Diffusion in den Tumor (s. 1.4.4) ist zu erwarten, dass nach Bindung des RIK und folgender Zerstörung von oberflächlichen Tumorzellen in Clusters oder Tumorknötchen, diese im Verlauf

abgebaut werden und bei der nächsten RIK Administration „neue“ oberflächliche Tumorzellen mit ihren AK-Bindungsstellen dem Radiopharmakon zur Verfügung stehen.

Neben der hier durchgeführten Studie belegen weitere Studien die Vorteile einer fraktionierten RIK-Applikation in der Behandlung von malignen Erkrankungen.

Nach einmaliger oder fraktionierter i.p. Applikation von  $^{90}\text{Y}$ -2B12 zur Therapie der Peritonealkarzinose des Ovarialkarzinoms zeigte sich die fraktionierte Therapie gegenüber der Einzelgabe überlegen. Nach i.p. RIK-Applikation von 3 x 6,29 MBq im 7-tägigen Intervall erreichten die Nacktmäuse ein mittleres Überleben von 76 d. Nach 2 x 7,4 MBq i.p. RIK-Injektion überlebten diese 69 d und nach 2 x 3,7 MBq ein Überleben von 33 d. Tiere, die einmalig 14,8 MBq bzw. 7,4 MBq des RIK erhielten, erlangten lediglich ein mittleres Überleben von 14 d bzw. 46 d und untherapierte Kontrolltiere von 20 d (Borchardt et al., 2000).

Tian et al. (2000) verglichen am Mausmodell die einmalige und fraktionierte Applikation eines  $^{131}\text{I}$ -gekoppelten anti-CEA-AK ( $^{131}\text{I}$ -C50) in der Behandlung von s.c. Tumorknoten eines murinen Adenokarzinoms. Nach sechsmaliger Applikation von 1,85 MBq in 2-tägigen Intervallen ohne primär chirurgische Resektion erreichten die Tiere ein medianes Überleben von 39 d. Tiere nach einmaliger Applikation der Gesamtaktivität von 11,1 MBq erlangten ein Überleben von nur 36 d. Die untherapierten Kontrolltiere überlebten 27 d. Die Kombination von RIT mit einer chirurgischen Tumorreduktion verlängerte das Überleben nach fraktionierter Applikation von 39 d auf 47 d und nach einmaliger RIK-Applikation von 36 d auf lediglich 40 d.

Zur Therapie des malignen B-Zell Non-Hodgkin-Lymphoms und der chronischen lymphatischen Leukämie wurden eine niedrig dosierte fraktionierte RIT am Menschen etabliert (DeNardo et al. 1998). Dreißig Lym-1 positiv getestete Patienten erhielten mehrere i.v. Injektionen von  $^{131}\text{I}$ -Lym-1 bis zu einer Gesamtaktivität von 11,1 GBq. Die resultierende Thrombozytopenie war dosislimitierend. Eine Tumorreduktion war bei 83 % der behandelten Patienten zu beobachten und bei 53 % der Patienten konnte diese als Response gewertet werden. Dennoch musste in einigen Fällen wegen Fortschreitens der Erkrankung die RIT abgebrochen werden. Im Mittel nach 4 Applikationen

entwickelten 30 % der Patienten HAMA, jedoch musste lediglich in 10 % der Fälle die Therapie auf Grund der Antikörperentwicklung beendet werden.

Zum aktuellen Zeitpunkt gibt es jedoch nur eine Studie (PubMed Recherche) welche die fraktionierte Therapie mit einem  $\alpha$ -emittierenden Nuklid durchführte. Elgqvist<sup>(1)</sup> et al. (2006) untersuchten die therapeutische Effizienz und Myelotoxizität (s. 5.6.1) nach einmaliger oder fraktionierter Applikation mit dem RIK  $^{211}\text{Astatin-MX35 F(ab')}_2$ . Der  $\alpha$ -Strahler  $^{211}\text{Astatin}$  mit einer Reichweite von  $\sim 62 \mu\text{m}$  und einem LET von  $\sim 111 \text{ keV}/\mu\text{m}$  unterscheidet sich von  $^{213}\text{Bi}$  durch seine deutlich längere HWZ von 7,21 h. Mäusen wurden i.p.  $1 \times 10^7$  Zellen der Ovarialkarzinomzelllinie NIH:OVCA-3 injiziert und 4 Wochen später mit der Therapie begonnen. Sie erhielten i.p.  $1 \times 0,8 \text{ MBq}$ ,  $3 \times 0,267 \text{ MBq}$ ,  $1 \times 0,4 \text{ MBq}$ ,  $3 \times 0,133 \text{ MBq}$ ,  $1 \times 0,05 \text{ MBq}$  oder  $3 \times 0,017 \text{ MBq}$  des RIK appliziert. Die 2. und 3. RIT wurde am 4. und 8. Tag nach der 1. RIT durchgeführt. Zur Kontrolle dienten Tiere, welche den unmarkierten AK appliziert bekamen. Acht Wochen nach letzter RIK-Applikation wurden die Tiere euthanasiert und mikro- sowie makroskopisch auf Tumore untersucht. Es zeigte sich kein Vorteil der fraktionierten Therapie im Vergleich zur einmaligen Gabe des Radiopharmakons bei gleicher Gesamtaktivität. Der tumorfreie Anteil der Mäuse lag nach Applikation von  $1 \times 0,8 \text{ MBq}$  vs.  $3 \times 0,267 \text{ MBq}$  bei 56 % vs. 41 %, nach  $1 \times 0,4 \text{ MBq}$  vs.  $3 \times 0,133 \text{ MBq}$  bei 39 % vs. 28 %, nach  $0,05 \text{ MBq}$  vs.  $3 \times 0,017 \text{ MBq}$  bei 17 % vs. 22 % und nach Applikation des unmarkierten MAK bei 0 %. Als Ursache, die einen Benefit der fraktionierten vs. einmaligen Applikation verhindern könnte, wurde angenommen, dass die Tumorknötchen bereits zu groß und eventuell auf Grund ihrer Lage dem Radiopharmakon schlecht zugänglich waren (Elgqvist<sup>(1)</sup> et al., 2006).

Eine Erhöhung der Aktivitäten und der Applikationsanzahl bei fraktionierter Therapie könnte eine Überlegenheit der fraktionierten RIT auch im fortgeschrittenen Tumorstadium zeigen.

#### 5.4 CEA-Konzentration als Tumormarker bei HSC45-M2

Die in dieser Studie eingesetzten Tumorzellen HSC45-M2 vom Siegelringtyp des diffusen Magenkarzinoms zeichneten sich durch Expression von Tumormarkern aus. Die Sekretion von CEA der HSC45-M2 wurde durch Yanagihara et al. bereits 1993 publiziert.

Die durchgeführten in Vitro Studien erbrachten eine Korrelation von CEA-Konzentration mit Zunahme der Zellzahl und avitalen Zellmaterials über die Zeit mit Konzentrationsverdoppelungszeiten von 34 h bzw. 70 h in Abhängigkeit zur Ausgangszellzahl ( $1 \times 10^5$  bzw.  $1 \times 10^6$ ) im Medium. Bei der Ausgangszellzahl von  $1 \times 10^6$  war schon 24 h nach Kultivierung eine deutlich erhöhte CEA-Konzentration im Medium mit 17,9 ng/ml bei  $1,37 \times 10^6$  Zellen messbar. Analog hierzu zeigte sich auch bei der Ausgangszellzahl von  $1 \times 10^5$  der Nachweis von erhöhten Tumormarkerwerten mit 14,9 ng/ml bei  $1,19 \times 10^6$  Zellen 216 h nach Subkultivierung.

Dieser positive Korrelationsachweis von CEA-Konzentration zu HSC45-M2-Zellzahl diene als Basis zur Durchführung der in Vivo Versuche.

Die Serum-CEA-Konzentrationen bei nicht tumorzellinokulierten, aber RIK-applizierten Tieren lagen unterhalb des Nachweisbereiches. Bei tumorzellinokulierten Mäusen mit/ohne i.p. RIT zeigten sich individuelle, sehr unterschiedliche Serumkonzentrationsverläufe. Positive therapeutische Effekte zeigten sich durch fehlenden Nachweis des Tumormarkers im Serum, Abfall der Konzentration nach RIT oder langsameren Anstieg des CEA nach Therapie. Therapieversager zeigten einen Anstieg der Konzentration prä mortal und bei Euthanasie. Nach zweimaliger i.p. Applikation des  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk ließ sich nach initialem CEA-Anstieg nach Tumorzellinokulation ein Abfall des Tumormarkers unter die Nachweisgrenze beobachten. Nach Applikation von  $2 \times 0,37$  MBq kam es zu einem prä mortal Neuanstieg und bei  $2 \times 0,74$  MBq verblieb die CEA-Konzentration unterhalb der Sensitivitätsgrenze über 70 d. Ein Tier mit  $2 \times 0,74$  MBq zeigte einen erneuten CEA-Anstieg bei Euthanasie am 78. Tag und eine andere Maus mit  $2 \times 0,74$  MBq überlebte bis zum Ende des Untersuchungszeitraums ohne Tumoranhalt.

Bei einem Tier wurde nach  $1 \times 0,37$  MBq Applikation erstmalig ein extrem hoher CEA-Wert von 183,4 ng/ml bei Euthanasie am 9. Tag p.i. gemessen. Zudem zeigte sich

eine orange-grünliche Färbung des Darms. Dieser deutlich erhöhte Wert könnte auch durch eine schwere Kolitis mitbedingt gewesen sein. Die 35 ausgewerteten Serumproben bei Euthanasie der Tiere ergaben im Mittel eine CEA-Konzentration von 31,8 ng/ml mit einer Standardabweichung von 37,1 ng/ml. Dies verdeutlicht erneut die große individuelle Schwankungsbreite der CEA-Konzentrationen. Bei Aszitesnachweis im Rahmen der Peritonealkarzinose war ein positiver CEA-Level (17,4 ng/ml - 85,3 ng/ml, n = 5) im Exudat der Tiere nachweisbar. Folglich könnte auch eine okkulte Peritonealkarzinose oder intraabdominelle Metastasierung durch eine CEA-Konzentrationsbestimmung im Aszites verifiziert werden.

Publikationen der letzten Jahre beschäftigten sich primär mit der prognostischen Aussagekraft des prätherapeutisch erhobenen CEA-Wertes bei Patienten mit Magenkarzinomen ohne Kontrolle des Tumormarkerspiegels im Behandlungsverlauf.

In der Nachsorge ist eine CEA-Bestimmung nur sinnvoll bei positiver CEA-Konzentration bei Erstdiagnose. Das CEA ist in der Tumornachsorge des Magenkarzinoms ca. 3 Monate vor Diagnose des Tumorrezidives nachweisbar. Jedoch führt der frühe positive Nachweis des CEA und die folglich mögliche frühzeitigere therapeutische Interventionsmöglichkeit zu keiner Verlängerung des Überlebens der Patienten (Sendler et al., 2006).

Mihmanli et al. (2004) zeigten bei Untersuchungen von 36 Patienten im Zeitraum von 01/2000 bis 01/2003 eine Korrelation der CEA-Serumkonzentration mit Invasionstiefe und Tumorstadium. Ein signifikant verlängertes Langzeitüberleben wurde bei Patienten mit negativen CEA-Werten erreicht.

Präoperative CEA-Konzentrationen über 5 ng/ml führten zur signifikanten ( $p < 0,001$ ) Erniedrigung der 3-Jahresüberlebensrate im Vergleich zu Patienten mit Magenkarzinomen mit Levels unter 5 ng/ml (Gaspar et al. 2001).

Eine weitere Studie bei Patienten, die am Magenkarzinomen erkrankt waren, belegte, dass die Serum-CEA-Konzentration signifikant mit Invasionstiefe und Lebermetastasierung korrelierte. Ebenso waren niedrige Konzentrationen mit der Option einer kurrativen Resektion und dem 5-Jahresüberleben verbunden. Die chirurgischen Ergebnisse waren signifikant besser bei Patienten mit CEA-Werten  $< 5$  ng/ml. Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen CEA-Konzentration und einer vorhandenen Peritonealkarzinose (Ishigami et al., 2001).

Eine prä- und postoperative Follow-Up Kontrolle von Serumtumormarkern AFP ( $\alpha$ -Fetoprotein), CEA und CA19-9 nach radikaler Gastrektomie bei Patienten mit Magenkarzinomen wurde 2006 durch Choi et al. publiziert. Ein hoher prädiktiver Wert zeigte sich für AFP zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, für CA 19-9 für ein Rezidiv insbesondere bei peritonealer Karzinose und für CEA bei Lebermetastasierung nach rezidivfreiem Intervall.

Klinisch reicht eine Tumormarkerbestimmung bei klinischem Befund zur Diagnosefindung auf Grund unzureichender Sensitivität und Spezifität nicht aus. Dennoch sollte geprüft werden, ob in Zusammenschau mit Verdachtsdiagnose oder Tumorerkrankung ein sinnvoller Einsatz der additiven, intermittierenden oder ersatzweisen CEA-Bestimmung als sinnvoll zu erachten ist, um für den einzelnen Patienten apparative Diagnostik (z.B. Koloskopien, CT-Untersuchungen) zu minimieren. Neben der bereits routinemäßigen Anwendung der CEA-Bestimmung bei kolorektalen Karzinomen, medullären Schilddrüsenkarzinomen und Mammakarzinomen sollte auch beim Pankres-, Bronchial- und Magenkarzinom ein CEA-Monitoring in Betracht gezogen werden (Wolter und Neumeier, 2006).

Die individuellen CEA-Levelschwankungen der Swiss nu/nu Mäuse nach Tumorzellinokulation ohne bzw. mit nachfolgender  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk Therapie in dieser durchgeführten Studie lassen Schlüsse auf die Option eines Verlaufmonitorings mittels CEA-Bestimmung auf Therapieresponse bzw. Versagen über Anstieg oder Abfall der Tumormarkerkonzentration zu. Bei Patienten mit Tumoren von Siegelringzellen mit Expression von CEA könnte eine regelmäßige Kontrolle des Serumantigenverlaufs als zusätzliches diagnostisches Therapiemonitoring von Nutzen sein. Die Fragestellung, ob hierdurch eine Verbesserung des Langzeitüberlebens der Patienten erzielt werden kann, bleibt für zukünftige Studien offen.

## **5.5 Bewertung der Radioimmuntherapie mittels Autopsiebefunden und Körpergewichtsverläufen**

Das KG lag bei den verstorbenen Tieren bei ca. 25 g bei annähernder Normalverteilung der Werte. Die makroskopische Untersuchung der Tiere nach Euthanasie zeigte eine hohe Aggressivität der inokulierten Tumorzellen vom Typ HSC45-M2 mit Peritonealkarzinose oder fortschreitender Metastasierung mit Organinfiltration und Aszitesbildung. Ein unzureichendes Therapieansprechen mit weiterer Tumorzellproliferation war verbunden mit Reduktion der Allgemeinkonstitution. Bei der Obduktion nach Euthanasie zeigte sich in 13 % ein Tumornachweis (ohne Aszitesbildung oder Kachexie), in jeweils 31 % ein Tumor mit Aszitesbildung oder Kachexie und in 19% ein Zusammentreffen von Aszites, Kachexie und maligner Raumforderung. 6 % der Tiere mussten auf Grund anderer Genese, unabhängig von der i.p. Tumorzellimplantation, euthansiert werden und wurden deshalb aus den Studien ausgeschlossen.

Alle Therapiegruppen überlebten signifikant länger als die Kontrollgruppe, was sich im zeitlich rascheren mittleren KG-Anstieg der untherapierten Kontrolltiere bis maximal ~150 % des Ausgangsgewichts widerspiegelte. Bereits 2 d nach 1. RIT war ein deutlicher Unterschied im KG zu beurteilen. Nach Applikation von 0,74 MBq war das KG nahezu unverändert, wohingegen die Applikation von 0,37 MBq oder keine RIK-Applikation einen Anstieg von 10 % des KG innerhalb von 2 d bedeutete. Die Applikation von 1 x 0,74 MBq bzw. 2 x 0,74 MBq erbrachte initial einen deutlich langsameren KG-Anstieg mit Erreichen eines Plateaus mit ca. 120 % des Ausgangsgewichts ca. 25 d nach 1. RIT im Vergleich zu den anderen Gruppen. Tiere, die 2 x 0,37 MBq erhielten, wiesen nach der 1. RIT einen vergleichbaren KG-Verlauf auf wie die Tiere nach 1 x 0,37 MBq Applikation. Nach der 2. Applikation von 0,37 MBq zeigte sich ein deutlich langsamerer Weiteranstieg mit längerem Überleben einzelner Tiere.

Anzunehmen ist, dass ein kurzfristiger therapeutischer Erfolg nach einmaliger Applikation von 0,74 MBq durch eine initiale Tumorzellreduktion erzielt wurde, und das KG initial nicht so schnell anstieg. Die 2. RIT mit 0,37 MBq oder 0,74 MBq zeigte

erneut eine therapeutische Wirkung mit längerem Überleben und Erreichen eines konstanten KG der überlebenden Tiere im Verlauf.

Elgqvist<sup>(1)</sup> et al. (2006) untersuchte den KG-Verlauf hinsichtlich der Allgemeinkonstitution der Versuchsmäuse nach i.p. Tumorzellinokulation ( $1 \times 10^7$  NIH:OVCAR-3) mit folgender i.p. Administration des monoklonalen AK MX35 F(ab')<sub>2</sub> (Kontrollgruppe) und nach  $1 \times 0,8$  MBq,  $3 \times 0,267$  MBq,  $1 \times 0,4$  MBq,  $3 \times 0,133$  MBq,  $1 \times 0,05$  MBq oder  $3 \times 0,017$  MBq <sup>211</sup>At-MX35 F(ab')<sub>2</sub>. Es zeigte sich, dass das Gewicht der Kontrolltiere auf Grund von Aszitesproduktion signifikant höher war als das KG der Therapiegruppen. Trotz unterschiedlicher Therapieeffizienz in Abhängigkeit zur applizierten Aktivität konnte zwischen den Therapiegruppen kein signifikanter Unterschied im KG-Verlauf erhoben werden (s. 5.3.2) (Elgqvist<sup>(1)</sup> et al., 2006).

Die KG-Bestimmung im zeitlichen Verlauf nach RIT kann für die Beurteilung des Therapieverlaufs genutzt werden. Insbesondere ein schneller Anstieg des KG ist als negativer Trend hinsichtlich des Langzeitüberlebens zu werten.

## 5.6 Analyse der Toxizität nach einmaliger und zweimaliger

### <sup>213</sup>Bi-d9MAk-Applikation

Die Therapie mit zytotoxischen Substanzen oder ionisierender Strahlung ist in der heutigen Tumorthherapie als unverzichtbar anzusehen. Jedoch müssen bei jeder Administration von Chemotherapeutika, ionisierender Strahlung oder Radiopharmaka der therapeutische Benefit und die möglichen induzierten Schäden auf gesunde Organsysteme beurteilt werden. Zahlreiche Studien beweisen die Toxizität von Radiopharmaka in Abhängigkeit vom Nuklid und der applizierten Aktivität.

Als Hinweis auf eine durch <sup>213</sup>Bi-induzierte radiotoxische Morbidität und Mortalität zeigten Beck et al. (2007), dass die i.p. Injektion von 22,2 MBq <sup>213</sup>Bi-d9MAk 1 d nach bzw. ohne vorangehende Tumorzellinokulation zu einem vergleichbaren Überleben der Tiere (medianes Überleben 119 d bzw. 128 d) führte. Diese applizierte Aktivität führte zu einer Reduktion der Leukozyten im peripheren Blut, zu chromosomalen Aberrationen und zur Schädigung der Nieren. Im Vergleich zur i.p. Gabe von 22,2 MBq

$^{213}\text{Bi}$ -d9MAk führte die i.p. Applikation von 7,4 MBq  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk mit bzw. ohne Tumorzellinokulation zu einem signifikanten Unterschied im Überleben zugunsten der Tiere ohne HSC45-M2-Tumorzellen. Lediglich 10 % der Tiere aus der HSC45-M2 freien Gruppe und 64 % aus der tumorzellinokulierten Gruppe verstarben, ohne Anhalt auf einen strahleninduzierten Organschaden bei Autopsie.

### 5.6.1 Veränderungen des peripheren Blutbildes

In dieser Studie wurden vor und nach einmaliger bzw. zweimaliger i.p.  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk-Applikation die Erythrozyten-, Leukozyten- und Thrombozytenwerte der Versuchstiere über einen ca. 50-tägigen Zeitraum im Intervall von 7 d bestimmt.

Die Verlaufsbeurteilung der Erythrozyten- und Thrombozytenzahlen zeigten nach i.p. Applikation von 1 x 0,37 MBq, 2 x 0,37 MBq, 1 x 0,74 MBq, 2 x 0,74 MBq bzw. 1 x 1,48 MBq  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk keine strahleninduzierte Toxizität auf die beiden Zellreihen. Nach i.p. Injektion von 1 x 0,37 MBq, 2 x 0,37 MBq, 1 x 0,74 MBq, 2 x 0,74 MBq oder 1 x 1,48 MBq zeigte sich ein Anstieg der Leukozyten zwischen 6 % und 36 % des prätherapeutischen Ausgangswertes am 10. Tag nach 1. RIK Applikation. Tiere, denen lediglich PBS i.p. injiziert wurde, wiesen eine geringere Schwankungsbreite der Leukozyten auf als Tiere, denen das RIK appliziert wurde. Lediglich bis 10 d nach PBS-Injektion zeigte sich eine Zunahme der Leukozyten auf 120 % des Ausgangswertes und im Anschluss eine Reduktion um 17 % unter das prätherapeutische Ausgangsniveau. Huber et al. (2003) zeigten, dass auch Versuchstiere nach Applikation des nativen d9MAk bzw. unbehandelte Mäuse eine geringe Zunahme der Leukozytenzahlen aufwiesen.

Bei Messungen nach 10 d schwankten die weißen Blutkörperchen der RIK-applizierten Tiere um eine Zunahme von maximal 176 % des prätherapeutischen Niveaus. Ursächlich für die starken Leukozytenänderungen zum prätherapeutischen Ausgangswert der RIK applizierten Mäuse im Vergleich zu den Kontrolltieren könnte ein stimulierender Einfluss des  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk-Immunkonjugats auf das Immunsystem sein.

Die induzierte Toxizität von  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk auf die Leukozytenzahl im peripheren Blut wurde ebenfalls durch Huber et al. (2003) nach RIK-Applikation bestimmt. Es zeigte

sich eine stärkere Regression der Leukozyten auch bei geringeren Aktivitäten. Nach Radionuklidapplikation von 1,85 MBq, 7,4 MBq bzw. 22,2 MBq fielen die weißen Blutkörperchen innerhalb der ersten 2 d nach Therapie auf 87 %, 55 % bzw. 32 % des prätherapeutischen Wertes ab und normalisierten sich innerhalb der folgenden 14 d - 21 d. 42 Tage nach 7,4 MBq bzw. 22,2 MBq lagen die Leukozyten bei 182 % bzw. 151 % des Ausgangswertes (Huber et al., 2003).

Neben der eindeutig belegten Radiotoxizität auf die Leukozyten durch Huber et al. (2003) nach i.p.  $^{213}\text{Bi}$ -Immunkonjugatapplikation mit Suppression der Leukozyten zeigt sich auf der anderen Seite in dieser Studie und bei Huber et al. (2003) eine Erhöhung der Leukozytenzahl nach i.p. Injektion im Sinne einer Immunreaktion nach RIK-Applikation.

Nikula et al. (1999) publizierten, dass 8 d nach i.p. Applikation von  $^{213}\text{Bi}$ -CHX-A-DTPA-HuM195 es zu einer Reduktion der Leukozyten in Abhängigkeit zur applizierten Aktivität kam (unbehandelte Kontrolle  $8,6 \times 10^3$  Zellen/ $\mu\text{l}$ , 2,8 MBq  $6,8 \times 10^3$  Zellen/ $\mu\text{l}$ , 13,5 MBq bei  $3,8 \times 10^3$  Zellen/ $\mu\text{l}$ ). Nach i.v. RIK-Administration mit jeweils 4 Injektionen an 2 d von insgesamt 1,96 MBq, 3,52 MBq, 6,92 MBq bzw. 13,0 MBq  $^{213}\text{Bi}$ -CHX-A-DTPA-HuM195 wurde ebenfalls eine Reduktion der Leukozyten ohne Veränderung der Erythrozyten bestimmt. Nach Applikation von 6,92 MBq und 13 MBq trat zudem eine Knochenmarksaplasie auf. Die Autoren postulierten, dass i.v. Aktivitäten  $> 13$  MBq (666 MBq/kg) über der maximal tolerierbaren Dosis für Mäuse lagen (Nikula et al., 1999).

Behr et al. (1999) beobachteten nach einmaliger Applikation von 25,9 MBq  $^{213}\text{Bi}$ -CO17-1A Fab' einen Abfall der Leukozyten und Thrombozyten mit maximaler Suppression eine Woche nach RIK-Administration und vollständiger Erholung nach 2 - 3 Wochen.

Die i.p. Injektion des  $\beta$ -RIK  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk mit 7,4 MBq bzw. 14,8 MBq verursachte eine Reduktion der Leukozyten auf 40 % am 10. Tag p.i. bzw. minimal auf 5 % 17 d nach RIT. Bedingt durch die deutlich längere HWZ von 6,7 d des  $^{177}\text{Lu}$  stellte sich auch der Abfall der Leukozyten nach  $\beta$ -Nuklidapplikation als protrahiert im Vergleich zur Gabe des  $\alpha$ -Emitters  $^{213}\text{Bi}$  dar (Zöckler, 2006).

Diverse Studien zeigten, dass durch fraktionierte RIT eine gleiche Tumoreradikation erzielt werden konnte, aber mit weniger radiotoxischer Schädigung des gesunden

Gewebes. Klinische Anwendungen einer einzelnen RIK-Applikation erzeugten eine so starke Myelotoxizität, dass in der Folge eine Knochenmarkstransplantation nötig wurde. Die fraktionierte Administration reduzierte die Notwendigkeit der Knochenmarkstransplantationen und schwerer Leuko- und/oder Thrombozytopenien.

Vriesendorp et al. (1993) veröffentlichten eine Abnahme der Knochenmarkstoxizität mittels Bestimmung der Zellzahl von Thrombo-, Leuko- und Lymphozyten nach fraktionierter Applikation vs. einmaliger Injektion der Gesamtaktivität bei der Therapie des Adenokarzinoms am Hund. Beagles wurde nach Tumorzellinokulation einmalig oder zweimalig  $^{90}\text{Y}$ -B72.3 i.v. appliziert. Nach einmaliger Applikation mit 64,75 MBq/kg wurde eine deutlich stärkere Depression der Hämatopoese nachgewiesen im Vergleich zu Tieren, die 2 x 33,3 MBq/kg im Zeitintervall von 4 d oder 8 d nach der ersten Injektion erhielten. Es zeigte sich zudem, dass 15 % – 20 % mehr Gesamtaktivität bei zweimaliger fraktionierter i.v. Gabe von  $^{90}\text{Y}$ -B72.3 i.v. appliziert werden konnte, um eine äquivalente Schädigung des Knochenmarks zu erreichen. Zwei von drei Tieren verstarben nach einmaliger Injektion von 92,5 MBq/kg auf Grund einer strahleninduzierten Knochenmarksaplasie. Zwei Tiere, die eine höhere Gesamtaktivität (74 MBq/kg gefolgt von 33,3 MBq/kg 8 d später) fraktioniert erhielten, überlebten.

Schlom et al. (1991) zeigten in ihrer Studie ein vergleichbares Ergebnis. Athymischen Mäusen wurden humane Kolonkarzinomzellen (LS-174T) injiziert und im Verlauf i.p.  $^{177}\text{Lu}$ -CC49 appliziert. Nach Applikation von 1 x 18,5 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -CC49 starben 5 von 9 Tieren auf Grund der induzierten Knochenmarkstoxizität. Mäuse, die 3 x 9,25 MBq in aufeinander folgenden Wochen appliziert bekamen, vertrugen die Gesamtdosis gut und lediglich 1 von 10 Tieren verstarb.

Am gleichen Tumor- und Antikörpermodell untersuchten Buchsbaum et al. (1995) unter Verwendung des Nuklids  $^{131}\text{I}$ , die mögliche Überlegenheit einer fraktionierten RIK-Applikation vs. einmaliger Gabe hinsichtlich einer induzierter Radiotoxizität und Tumorresponse. Nach Applikation von 1 x 22,2 MBq verstarben 25 % der Tiere auf Grund eintretender Toxizität und es ergab sich keine Tumorregression. 2 x 11,1 MBq im 3-tägigen Intervall war ebenso für 25 % der Tiere letal toxisch, jedoch zeigten 30 % der Versuchstiere eine Tumorregression. Die Gabe von 2 x 11,1 MBq im wöchentlichen Intervall führte zu einer 15 %igen Letalität ohne komplette Tumorregression. Nach

Applikation von 3 x 11,1 MBq in 3-tägigen Intervallen verstarben 30 % der Tiere auf Grund radiotoxischer Schädigung und es ergab sich eine 40 %ige Tumorregression.

Therapiestudien mit  $^{131}\text{I}$ -B72.3 zeigten, dass bei einmaliger Applikation von 37,6 MBq das Wachstum der humanen Kolonadenokarzinomzellen (LS-174T) inhibiert, aber 6 von 10 Mäusen an der Toxizität verstarben. Fraktionierte Applikation von 2 x 11,1 MBq bzw. 3 x 7,4 MBq waren der einmaligen Applikation überlegen. Nach Injektion von 2 x 11,1 MBq überlebten 90 % der Tiere. Toleriert wurden Aktivitäten von 3 x 11,1 MBq bei Applikation im wöchentlichen Intervall, welche zu einer besseren Tumorreduktion bei geringerer Toxizität führte (Schlom et al., 1990).

Meredith et al. (1992) zeigten, dass die zwei- (2 x 666 MBq/m<sup>2</sup>) oder dreimalig (3 x 444 MBq/m<sup>2</sup>) fraktionierte Behandlung mit  $^{131}\text{I}$ -B27.3 bei Patienten mit metastasiertem Kolonkarzinom zu einer signifikant ( $p = 0,04$ ) geringeren Knochenmarksdepression führte als die einmalige Applikation der Gesamtaktivität von 1332 MBq/m<sup>2</sup>. Der Tiefpunkt der Leukozyten- und Thrombozytenwerte wurde nach 35 – 50 d erreicht.

Lediglich eine Studie (PubMed Recherche) zur Evaluation der induzierten Radiotoxizität durch  $\alpha$ -Strahler nach einmaliger bzw. fraktionierter RIT liegt zum aktuellen Zeitpunkt vor.

Nach einmaliger (1 x 0,8 MBq) bzw. fraktionierter (3 x 0,267 MBq) i.p. Applikation von  $^{211}\text{Astatin-MX35 F(ab')_2$  wurde gezeigt, dass eine geringere Suppression und verzögerte Erniedrigung der Leukozyten nach fraktionierter Applikation des Radiopharmakons gegenüber der einmaligen Applikation der Gesamtaktivität eintrat, obgleich die fraktionierte RIT keine bessere therapeutische Effizienz bedeutete (s. 5.3.2). Es wurden keine Zellzahländerungen der Erythrozyten, Thrombozyten oder des Hämoglobins nach einmaliger bzw. dreimaliger Applikation beobachtet. Bei vergleichbarer therapeutischer Effizienz beider Therapiemodalitäten und geringerer Toxizität zugunsten des fraktionierten Therapieregimes ist anzunehmen, dass durch Erhöhung der Aktivitäten der Einzelfractionen bei fraktionierter Applikation in Richtung maximal tolerierbare Aktivität ein besserer Therapieerfolg zugunsten der fraktionierten Therapie vs. einmaliger Applikation zu erwarten ist (Elgqvist<sup>(1)</sup> et al., 2006).

### 5.6.2 Chromosomale Aberrationen der Knochenmarkszellen

In der RIT kann die Bestrahlung von gesundem Gewebe nicht verhindert werden. In Vivo Studien, welche die Radiotoxizität induziert von  $\alpha$ -Nukliden mit Strahlung mit geringem LET auf Knochenmarkszellen und Nierengewebe untersuchten, zeigten eine RBW von nahezu 1 (Behr et al., 1999; Vandenbulcke et al., 2003). Ionisierende Strahlung erzeugt ein breites Spektrum von Mutationen mit Chromosomen- und Genveränderungen. Durch Regeneration und Reparaturmechanismen können sich beginnende Mutationsprozesse wieder rückbilden, wohingegen fixierte Mutationen im Erbgut erhalten bleiben. Zwischen Strahlendosis und Anzahl der eintretenden Mutationen besteht ein direkter Zusammenhang (Sauer, 2001). Mittels Chromosomenanalysen von peripheren Lymphozyten, Haut- und Knochenmarkszellen nach Strahlenexposition versucht man, toxische Langzeitschäden zu erfassen.

$\alpha$ -Nuklide induzieren DNA-Doppelstrangbrüche, die schwer zu reparieren und zusätzlich großteils unabhängig vom Oxygenierungszustand der betroffenen Zelle sind (Chang et al., 2002).

Nach einmaliger i.p. Applikation mit 0,74 MBq, 1,48 MBq, 7,4 MBq oder 14,8 MBq oder zweimaliger Injektion im Intervall von 7 d mit 0,74 MBq oder 1,48 MBq  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$  erfolgte eine Analyse chromosomaler Aberrationen mittels M-FISH 24 h nach erster bzw. zweiter RIK-Administration. 24 Stunden nach RIK-Applikation waren die erstellten Karyogramme unauffällig. Lediglich ein Karyogramm zeigte strukturelle Chromosomenaberration nach einmaliger Applikation von 7,4 MBq  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$ . Fraglich ist diesbezüglich ob es sich hierbei, um eine strahleninduzierte oder spontane Mutation handelt, da nur eine von 20 Metaphasen betroffen war und die untersuchten Karyogramme des Tieres nach 14,8 MBq  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$ -Applikation keine Veränderungen der Chromosomen nach 24 h aufwiesen.

Huber (2003), Huber et al. (2003) und Beck et al. (2007) untersuchten ebenso die chromosomale Schädigung von Knochenmarkszellen nach RIK-Applikation bei Balb/c Mäusen mittels Giemsa-Färbung und zeigten 24 h nach RIK-Administration deutlich mehr Chromosomenaberrationen bei höheren Aktivitäten. Nach Injektion von 1,85 MBq, 7,4 MBq, 14,8 MBq oder 22,2 MBq  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$  wurden nach Fixierung und Giemsa-Färbung qualitative und quantitative Schäden der Chromosomen

ausgewertet. Nach RIT konnten 3 Arten von Schäden evaluiert werden: moderate Aberrationen von einzelnen Fragmenten oder singulärem Austausch, schwere Aberrationen von mehreren Fragmenten und/oder mehreren Austauschen und schwerste Schädigungen mit multiplen Schäden an mehr als 2 Chromosomen und mehreren Fragmentationen. Vier Stunden nach RIK-Applikation traten in allen Gruppen chromosmale Aberrationen auf, bis auf 22,2 MBq, jedoch ohne Korrelation zur applizierten Aktivität. Acht Stunden nach RIT zeigten sich eine Abhängigkeit der Schädigung von der applizierten Aktivität und eine quantitative Zunahme der Aberrationen. 24 h nach 22,2 MBq  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$  konnten in 48 %, nach 14,8 MBq in 31 % und nach 7,4 MBq in 17 % der Knochenmarkszellen chromosomale Veränderungen unterschiedlicher Schweregrade beurteilt werden. Angaben zum Ausmaß der Chromosomenaberrationen nach Applikation von 1,85 MBq 24 h nach Administration wurden von den Autoren nicht getroffen (Beck et al., 2007; Huber, 2003; Huber et al., 2003).

Die erlangten Unterschiede der M-FISH-Analyse und Giemsa-Färbung hinsichtlich der Ergebnisse der Chromosomenschädigung 24 h nach RIK-Applikation bleiben unklar. S. Nathrath berichtete mündlich, dass zahlreiche Karyogramme primär den Eindruck machten, als bestünden schwere Mutationen, welche aber letztendlich auf Grund schlechter technischer Fixation der Knochenmarkszellen bedingt waren. Eventuell waren darunter Karyogramme, welche auch strahleninduzierte Schäden aufwiesen. Durch DNA-Reparaturmechanismen oder Elimination von schwerstgeschädigten Zellen aus dem Knochenmark zeigte Huber (2003) bereits am 3. Tag nach RIK-Administration nur bei den Gruppen mit 7,4 MBq und 14,8 MBq jeweils bei einzelnen Zellen mäßige Aberrationen. Nach 22,2 MBq Administration waren die Zellen ohne Schädigung. Durch suffiziente zelleigene Reparaturmechanismen könnten bei den hier untersuchten Tieren bereits 24 h nach RIK-Applikation keine chromosomalen Aberrationen mehr nachweisbar gewesen sein.

### 5.6.3 <sup>213</sup>Bi-induzierte Nierenschädigung

Durch die hohe Radiosensitivität des renalen Gewebes kann eine Strahlennephropathie nach Ganzkörperbestrahlung bzw. nach Radionuklidtherapie entstehen. Klinisch präsentiert sich die Nierenschädigung mit arterieller Hypertonie, renaler Anämie, Ödemen, Azotämie und Proteinurie. Histopathologisch zeigen sich eine Mesangiolyse, Sklerose, Tubulusatrophie und tubulointerstitielle Vernarbungen (Behr et al., 1997; Cohen und Robbins, 2003). Die Nephrotoxizität nach Applikation von <sup>225</sup>Ac und <sup>213</sup>Bi wird durch die Akkumulation von <sup>213</sup>Bi in den Nieren bedingt (Jaggi<sup>(1)</sup> et al., 2005).

Die in dieser Studie durchgeführte einmalige i.p. Applikation von 0,37 MBq oder 0,74 MBq bzw. zweimalige Injektion von 0,37 MBq oder 0,74 MBq führte zu keiner histopathologischen Schädigung der Mäusenieren. Es zeigte sich folglich kein Anhalt für eine Nephropathie bei geringen Aktivitäten.

Bereits Beck et al. (2007) evaluierten die <sup>213</sup>Bi-d9MAk-induzierte Nierentoxizität durch Bestimmung des Serumharnstoffes, histopathologischen Nierenaufbereitungen mittels H.E.-Färbung und autoradiographischen Untersuchungen nach i.p. Injektion von 7,4 MBq <sup>213</sup>Bi und 7,4 MBq <sup>213</sup>Bi-d9MAk. In den ersten Wochen nach Applikation konnten keine Symptome beobachtet werden, die auf eine Nierenschädigung hingewiesen hätten. Ein signifikanter Anstieg des Serumharnstoffes (39 ng/dl ± 5 ng/dl vs. 17 ng/dl ± 3 ng/dl (MW ± SD)) als Zeichen einer chronischen Niereninsuffizienz konnte lediglich innerhalb von Monaten bei Tieren nach Applikation von 22,2 MBq evaluiert werden. Die histopathologische Beurteilung der Nieren bestätigte die strahleninduzierte Nierenschädigung nach i.p. Applikation von 22,2 MBq <sup>213</sup>Bi-d9MAk. Bei 5 von 6 Mäusen waren die Nieren okkerfarbig, geschwollen und die Nierenläppchen deutlich sichtbar. Fünf Monate nach 22,2 MBq Immunkonjugatapplikation zeigte sich histopathologisch das Bild einer progressiven Hyalinisierung mit Sklerosierung, Hydronephrose, Tubulusatrophie und interstitiellen Vernarbung als Zeichen einer stattgefundenen Strahlennephritis. Jedoch zeigte lediglich eine von 10 Mäusen nach 7,4 MBq das makroskopische Bild von geschwollenen Nieren ohne histopathologisches Korrelat. Autoradiographische Analysen zeigten eine vergleichbare <sup>213</sup>Bi-Anreicherung in den Nieren unabhängig davon, ob <sup>213</sup>Bi oder <sup>213</sup>Bi-d9MAk-Konjugat 45 min vor Euthanasie appliziert wurde. Biodistributionsstudien erbrachten, dass es 3 h nach i.p.

Injektion von  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$  zu einer  $^{213}\text{Bi}$  Akkumulation in den Nieren von 5,4 % ID/g Gewebe (Prozent der injizierten Aktivität pro Gramm Gewebe) kam. Ursächlich für die durch 22,2 MBq  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$  induzierten Nierenschädigung könnten die Einlagerungen von  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$ -Fragmenten in Lysosomen der renalen tubulären Epithelzellen und durch tubuläre Reabsorption von freiem  $^{213}\text{Bi}$  oder  $^{213}\text{Bi}$ -Antikörperfragmenten (Molekulargewicht < 40 kDa) ursächlich sein (Beck et al., 2007).

Manche Autoren postulieren, dass durch die intrazelluläre Aufnahme der Radiometalle in die Lysosomen im renalen Gewebe die Niere und nicht das Knochenmark das dosislimitierende Organ in der RIT zu sein scheint (Behr et al., 1997).

Norenberg et al. (2006) untersuchten die akute und chronische Nierenschädigung nach kumulativer Applikation von  $^{213}\text{Bi-DOTATOC}$  (DOTA-Tyrosin-Konjugat mit Octreotid) bei Ratten. Für den Nachweis einer möglichen akuten Nierentoxizität erhielten die Tiere 4,3 MBq (über 1 d), 9,0 MBq (über 2 d) bzw. 12,6 MBq (über 3 d)  $^{213}\text{Bi-DOTATOC}$  bei kleiner Tumormasse ( $0,75 \pm 0,3 \text{ mm}^3$ ) oder 13 MBq (dreimalig fraktioniert) bzw. 22,2 MBq (zweimalig fraktioniert im 1-stündigen Intervall). 25 Tage und 26 Wochen nach RIT konnte kein Unterschied in der Kreatininclearance zwischen der Kontrollgruppe (nur DOTATOC-Applikation) und den obengenannten  $^{213}\text{Bi-DOTATOC}$  Gruppen erhoben werden. Histopathologische Untersuchungen 25 d nach 4,3 MBq - 22,2 MBq Injektionen erbrachten keine oder minimale Zeichen einer interstitiellen Nephritis und nach 26 Wochen zeigte sich eine minimale bis milde interstitielle Nephritis bei Applikation von  $\sim 12 \text{ MBq } ^{213}\text{Bi-DOTATOC}$ . Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Nephritisausprägung nach einer nierenprotektiven Lysinapplikation (Norenberg et al., 2006).

Am Mausmodell wurde eine progrediente Nierenschädigung nach Applikation des  $\alpha$ -Nuklids  $^{225}\text{Ac}$  im Zeitverlauf beobachtet. Die Autoren stellten einen maximalen Anstieg des tubulären und interstitiellen Transforming Growth Factor (TGF)- $\beta 1$  20 bis 25 Wochen nach  $\alpha$ -Nuklidapplikation, als Zeichen eines stattgefundenen strahleninduzierten tubulären Zellverlusts mit progressiver Parenchymschädigung, fest. (Jaggi<sup>(2)</sup> et al., 2005; Cohen et al., 2000).

Eine Injektion von 25,9 MBq  $^{213}\text{Bi}$ - bzw. 9,25 MBq  $^{90}\text{Y-CO17-1A Fab}'$  wurde bei Mäusen ohne Zeichen einer akuten therapiebezogenen Mortalität toleriert. Bereits eine

10 %ige Aktivitätserhöhung des  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Emitters erbrachte eine 10 %ige Letalität. Jedoch zeigte sich ein deutlicher Anstieg des Harnstofflevels als Zeichen einer chronischen Niereninsuffizienz nach  $^{90}\text{Y}$ -Applikation bis ca. 125 mg/dl (graphisch entnommener Wert) und nach  $^{213}\text{Bi}$ -Applikation bis auf ca. 50 mg/dl (graphisch entnommener Wert) innerhalb von 6 - 7 Wochen nach RIT ohne Lysinapplikation. Ohne Nierenprotektion durch Lysin starben alle Tiere der  $^{90}\text{Y}$ -Gruppe innerhalb von 3 Monaten nach Therapie, wohingegen die Mortalität der  $^{213}\text{Bi}$ -Gruppe nach 6 Monaten lediglich bei 35 % lag. Nach i.p. D-Lysin-Monohydrochlorid-Injektionen, vor und nach RIT, zeigten beide Gruppen keine Zeichen einer Niereninsuffizienz bis 6 Monate nach Therapie (Behr et al., 1999).

Zahlreiche klinische Studien und in Vivo Studien am Mausmodell belegen den nierenprotektiven Effekt durch Applikation von kationischen Aminosäuren wie Lysin (Behr et al, 1995; Behr et al, 1996; Behr et al., 1997; Rolleman et al., 2003). Als Ursache der reduzierten renalen RIK-Aufnahme nach Lysin-Applikation wird die Inhibition der Reabsorption von glomerulär filtrierte niedermolekulare Moleküle, insbesondere von Peptiden (< 65 kDa) durch die proximalen Tubuluszellen angenommen (Behr et al, 1995; Behr et al, 1996).

Weiter wurde gezeigt, dass die renale Aufnahme von radiomarkierten Molekülen ( $^{111}\text{Indium}$ -Octreotid bzw.  $^{225}\text{Ac}$ -HuM195) durch Gelatine-Produkte inhibiert werden konnte und eine signifikante Reduktion der renalen  $^{213}\text{Bi}$ -Aufnahme durch den Einsatz von metallischen Radikalfängern wie DMPS (2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid) und DMSA (meso-2,3-dimercaptosuccinic acid), Schleifen- und Chlorothiazid diuretika erzielt werden konnte (Jaggi<sup>(1)</sup> et al., 2005; van Eerd et al., 2006; Vegt et al., 2006).

Auch wenn in dieser Studie keine histopathologische Schädigung der Mäusenieren bei Aktivitäten bis 1,48 MBq beobachtet werden konnte, zeigten andere Studiengruppen eine Nephropathie nach Radionuklidapplikation. In Hinblick auf eine  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk-Therapie am Menschen sollte eine zeitgleiche nierenprotektive Therapie während der RIT nicht vernachlässigt werden, um einer möglichen Schädigung der Nieren entgegenzuwirken.

## 5.7 Schlussfolgerung

Eine bessere therapeutische Effizienz der zweimaligen fraktionierten lokoregionalen tumorzellspezifischen  $^{213}\text{Bi-d9MAk-RIT}$  im Intervall von 7 d im Vergleich zur einmaligen  $^{213}\text{Bi-d9MAk-RIT}$  wurde in dieser Studie am Modell der frühen und fortgeschrittenen Peritonealkarzinose in Vivo nachgewiesen.

Am frühen Peritonealkarzinosemodell, d.h. Situation nach R0-Resektion, wurde eine signifikante Verlängerung des Überlebens der Tiere nicht durch Verdoppelung der Aktivität bei einmaliger Applikation, sondern durch fraktionierte Applikation des Radiopharmakons, unabhängig von der Gesamtaktivität erzielt. Bei fortgeschrittener Metastasierung führte die fraktionierte Applikation ausreichend hoher Aktivitäten zu einem verlängerten medianen Überleben im Vergleich zur einmaligen Applikation der Gesamtaktivität.

Eine fraktionierte RIT ist insbesondere bei Verwendung von  $\alpha$ -Strahlung zu favorisieren. Der Vorteil der Verwendung von hochenergetischen  $\alpha$ -Emittern in Vivo besteht in der kurzen Reichweite und folglich in der radioprotektiven Wirkung auf Nachbarstrukturen, da diese durch die Strahlung nicht erreicht werden. Die resultierende Reduktion des Kreuzfeueffekts führt aber auch dazu, dass die Tumorzellzytotoxizität nur bei direkter Bindung des Radiopharmakons an die Zelle induziert wird. Durch wiederholte Gabe von  $^{213}\text{Bi-Immunkonjugaten}$  können bei den späteren Administrationen primär nicht erreichte Tumorzellen abgetötet werden.

Die exzellenten Langzeitüberlebensergebnisse von Beck et al. (2007) nach i.p. Applikation von 1,85 MBq  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$  bzw.  $^{213}\text{Bi-d8MAk}$  einen Tag nach Tumorzellinokulation konnten jedoch nicht erreicht werden, da die eingesetzten Gesamtaktivitäten bei ein- und zweimaliger Applikation geringer waren als 1,85 MBq und die therapeutische Wirkung vermutlich nicht auf unspezifischen Kreuzfeueffekten beruhte.

Bei der fortgeschrittenen Peritonealkarzinose ist ein fraktioniertes Therapieregime absolut zu befürworten. Bereits nach zweimaliger RIT-Applikation mit 0,74 MBq im 7-tägigen Intervall konnte ein vergleichbares Überleben der Tiere, wie nach einmaliger Applikation der 5-fachen Gesamtaktivität mit 7,4 MBq erzielt werden. Im Gegensatz

zur einmaligen Applikation mit 7,4 MBq bei Beck et al. (2007) zeigte sich nach zweimaliger Applikation mit 0,74 MBq kein Nachweis einer induzierten Toxizität.

Eine Erhöhung der Aktivitäten bei fraktionierter Applikation in Richtung maximal tolerierbarer Aktivität und eine weitere Steigerung des Fraktionierungsgrades könnte eine noch bessere Überlegenheit der fraktionierten RIT am frühen und fortgeschrittenen Tumormodell zeigen.

Durch den Einsatz von geringen Aktivitäten (bis maximal 1,48 MBq) in den Therapiestudien konnten weder eine Toxizität auf das hämatopoetische System oder renale Gewebe, noch strahleninduzierte Chromosomenaberrationen evaluiert werden.

Über die Bestimmung des Körpergewichtsverlaufs der Versuchstiere nach Tumorzellinokulation und folgender ein- oder zweimaliger RIT konnte in der Initialphase nach Therapiebeginn ein Trend bezüglich eines möglichen Therapieansprechens oder -versagens beurteilt werden. Eine deutliche Gewichtszunahme der Tiere korrelierte mit einem Therapieversagen.

Insbesondere zeigte sich die wöchentliche Kontrolle der CEA-Konzentration im Serum als Prädiktor für eine Therapieresponse oder Tumorprogression. Mehrere Studien zeigten, dass die einmalige präoperative Bestimmung oder in den Nachsorgeuntersuchungen durchgeführten Bestimmungen der CEA-Konzentration ein Parameter für das Stadium und das Fortschreiten der malignen Erkrankung war. Bei Patienten mit Tumoren aus humanen Siegelringzellen mit Expression von CEA könnte eine kontinuierliche Kontrolle des Serumantigens oder Nachweis von CEA im Aszites als zusätzliches diagnostisches Therapiemonitoring von Nutzen sein.

Die lokoregionale  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAK-Therapie des diffusen Magenkarzinoms mit i.p. Tumorzell dissemination, bei Nachweis der d9-E-Cadherin-Mutation auf den Tumorzellen, ist im frühen und im fortgeschrittenen Tumorstadium eine sehr gute therapeutische Option.

Jedoch ist lediglich bei ~10 % der Patienten die spezifische d9-E-Cadherin-Mutation auf den Tumorzellen des diffusen Magenkarzinoms nachweisbar (Becker et al., 1999). Folglich steht die  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAK-RIT nur einer kleinen Patientenpopulation als therapeutische Option zur Verfügung. Andere Oberflächenantigene auf Magenkarzinomzellen, wie z.B. Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM), Epidermal-Growth-Factor-Receptor (EGF-R) oder CD-55SC-1 könnten

AK-Bindungsstellen für neue  $^{213}\text{Bi}$ -Immunkonjugate in Zukunft darstellen, wodurch mehr Patienten von diesem Therapiekonzept profitieren könnten (Seidl und Senekowitsch-Schmidtke<sup>(1)</sup>, 2008).

Unabhängig vom eingesetzten AK ist stets eine fraktionierte Applikation des  $^{213}\text{Bi}$ -Immunkonjugats am Patienten zu favorisieren, um nach chirurgischer Therapie einzelne Zellen, Tumorzellcluster oder größere Metastasen effektiv und ohne Toxizität für den Gesamtorganismus behandeln zu können.

## 6 Zusammenfassung

### **Bewertung der fraktionierten lokoregionalen Radioimmuntherapie des diffusen Magenkarzinoms mit tumorspezifischen $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk in Vitro und im Mausmodell.**

Die lokoregionale einmalige und fraktionierte tumorzellspezifische  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk-Radioimmuntherapie (RIT) von intraperitonealen (i.p.) disseminierten Tumorzellen des diffusen Magenkarzinoms vom Siegelringzelltyp (Zelllinie HSC45-M2) wurden in dieser Studie in Vitro und in Vivo am Mausmodell evaluiert.

HSC45-M2-Zellen zeichnen sich durch eine Mutation am E-Cadherin-Oberflächenmolekül mit Deletion des Exons 9 aus. Durch Entwicklung eines spezifischen monoklonalen Antikörpers, gerichtet gegen die E-Cadherin-Mutation am Exon 9 (d9MAk), wurde die spezifische  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk-RIT in Vorläuferstudien in Vitro und in Vivo am Mausmodell etabliert.

Hinsichtlich der aktuell geringen Verfügbarkeit von  $^{213}\text{Bi}$  wurden in dieser Studie geringe Aktivitäten eingesetzt. Es erfolgte die Durchführung von Untersuchungen in Vitro und in Vivo am Mausmodell mit früher Tumorzell dissemination (d.h. Situation nach R0-Resektion) und mit fortgeschrittener Carcinosis peritonei hinsichtlich der therapeutischen Effizienz, der strahleninduzierten Toxizität und des Therapiemonitorings über die Konzentration des karzinoembryonalen Antigens (CEA) und des Körpergewichtsverlaufs.

Die Analyse der HSC45-M2-Klonogenität in Vitro nach ein- oder zweimaliger Inkubation mit 0,185 MBq, 0,37 MBq oder 0,74 MBq  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk erbrachte eine Reduktion der Zellproliferation mit Zunahme der applizierten Aktivität, jedoch keine Überlegenheit der fraktionierten RIK-Applikation.

In Vivo wurden Nacktmäusen i.p.  $1 \times 10^7$  HSC45-M2-Zellen injiziert. Nach Tumorzellinokulation wurde den Tieren i.p. einmalig am 1. bzw. 8. Tag oder zweimalig am 1. und 8. Tag bzw. 8. und 15. Tag das  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk-Konjugat appliziert.

Das mediane Überleben lag bei untherapierten Kontrolltieren bei 22 Tagen (d).

Bei Therapiebeginn einen Tag nach Tumorzellinokulation kam es zu einer Verdoppelung der medianen Überlebenszeiten nach fraktionierter Applikation (84 d

nach 2 x 0,37 MBq bzw. 86 d nach 2 x 0,74 MBq) im Vergleich zur einmaligen Gabe (48 d nach 1 x 0,37 MBq bzw. 42 d nach 1 x 0,74 MBq).

Im fortgeschrittenen Peritonealkarzinosemodell mit Therapiebeginn acht Tage nach Tumorzellinokulation zeigte sich die zweimalige Applikation mit 0,74 MBq (68 d), der einmaligen Applikation mit 1,48 MBq (44 d) hinsichtlich der medianen Lebenszeit deutlich überlegen ( $p = 0,053$ ). Mit der zweimaligen Injektion von 0,74 MBq konnte sogar ein vergleichbares medianes Überleben der Tiere wie nach einmaliger Applikation acht Tage nach Tumorzellinokulation mit 7,4 MBq (73 d) am gleichen Modell bei Beck et al. (2007) erzielt werden.

Geringere Gesamtaktivitäten nach ein- oder zweimaliger Applikation führten zu einer ähnlichen medianen Überlebenszeit wie nach einmaliger Applikation mit 1,48 MBq (1 x 0,37 MBq mit 37 d, 2 x 0,37 MBq mit 38 d, 1 x 0,74 MBq mit 42 d) bei Therapiebeginn acht Tage nach Tumorzellinokulation.

Bei den therapeutisch eingesetzten Aktivitäten in Vivo am Mausmodell konnte keine Toxizität auf den Organismus der Tiere nachgewiesen werden. Es zeigten sich keine Suppression des hämatopoetischen Systems, kein histopathologischer Schädigungsnachweis des renalen Gewebes und keine Chromosomenaberrationen der Knochenmarkszellen.

Mittels Multiplex Fluoreszenz In Situ Hybridisierung (M-FISH) konnten lediglich in einer Metaphase 24 h nach i.p. Applikation von 7,4 MBq  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$  strukturelle Chromosomenaberrationen beobachtet werden. Diese könnten auch als spontane Mutationen gewertet werden, da sich 24 h nach i.p. Injektion von 14,8 MBq  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$  keine numerischen oder strukturellen chromosomalen Schäden zeigten. Andererseits kann auch von einem suffizienten zelleigenen DNA-Reparatursystem ausgegangen werden, welches strahleninduzierte chromosomale Schäden bereits 24 h nach RIK-Applikation ausgebessert oder eliminiert hat.

Eine Körpergewichtsabnahme nach RIK-Applikation im therapeutischen Aktivitätsbereich konnte nicht beobachtet werden. Jedoch war eine schnelle Gewichtszunahme mit einem geringeren Überleben der Tiere in Abhängigkeit zur applizierten Aktivität verbunden.

In Vitro konnte eine Korrelation der CEA-Konzentration und der Zellproliferation bestimmt werden. Auch die wöchentliche Kontrolle der CEA-Konzentration im Serum

der Versuchstiere nach ein- oder zweimaliger  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk-RIT zeigte einen Zusammenhang der Tumormarkerkonzentration mit einer Therapieresponse bzw. Tumorprogression. Darüber hinaus ließ sich das CEA im Aszites bei vorhandener Peritonealkarzinose nachweisen.

Schlussfolgernd zeigt sich eine bessere therapeutische Effizienz der zweimaligen fraktionierten lokoregionalen tumorzellspezifischen  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk-Applikation im Intervall von 7 d im Vergleich zur einmaligen RIT-Applikation am Modell der frühen und fortgeschrittenen peritonealen Tumorzelldissemination von HSC45-M2 Zellen bei ausreichend hoher Aktivität, ohne Nachweis einer strahleninduzierten Toxizität im therapeutischen Aktivitätsbereich. Eine Erhöhung der applizierten Aktivitäten bei fraktionierter Applikation und eine weitere Steigerung des Fraktionierungsgrades könnte eine noch bessere Überlegenheit der fraktionierten  $^{213}\text{Bi}$ -RIT zeigen.

Bei Patienten mit Tumoren aus humanen Siegelringzellen mit Expression von CEA könnte eine kontinuierliche Kontrolle des Serumantigens als zusätzliches diagnostisches Therapiemonitoring von Nutzen sein.

Der Einsatz einer fraktionierten RIT mit  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk bei Nachweis der E-Cadherin Genmutation am Exon 9 der Karzinomzellen ist nach chirurgischer zytoreduktiver Primärtherapie aber auch insbesondere als palliatives Therapieverfahren im fortgeschrittenen inoperablen Tumorstadium der Peritonealkarzinose am Patienten zu favorisieren, da eine Verlängerung des Überlebens erzielt werden konnte und im therapeutischen Aktivitätsbereich keine strahleninduzierte Toxizität des  $\alpha$ -Emitters nachweisbar war.

## 7 Literaturverzeichnis

- Aarts, F., Bleichrodt, R.P., Oyen, W.J.G., Boerman, O.C. Intracavitary radioimmunotherapy to treat solid tumors. *Cancer Biother Radiopharm.* 23 (2008) 301-309
- Adams, G.P., Shaller, C.C., Chappell, L.L., Wu, C., Horak, E.M., Simmons, H.H., Litwin, S., Marks, J.D., Weiner, L.M., Brechbiel, M.W. Delivery of the alpha-emitting radioisotope bismuth-213 to solid tumors via single-chain Fv and diabody molecules. *Nucl Med Biol.* 27 (2000) 339-346
- Allen, B.J., Rizvi, S., Li, Y., Tian, Z., Ranson, M. In vitro and preclinical targeted alpha therapy for melanoma, breast, prostate and colorectal cancers. *Crit Rev Oncol Hematol.* 39 (2001) 139-146
- Allen, B.J., Rizvi, S., Li, Y., Tsui, W., Graham, P., Thompson, J.F., Reisfeld, R.A., Kearsley, J. Intralesional targeted alpha therapy for metastatic melanoma. *Cancer Biol Ther.* 4 (2005) 1318-1324
- Andersson, H., Lindegren, S., Back, T., Jacobsson, L., Leser, G., Horvath, G. Radioimmunotherapy of nude mice with intraperitoneally growing ovarian cancer xenograft utilizing  $^{211}\text{At}$ -labeled monoclonal antibody Mov18. *Anticancer Res.* 2000 (20) 459-462
- Ballangrud, A.M., Yang, W.H., Charlton, D.E., McDevitt, M.R., Hamacher, K.A., Panageas, K.S., Ma, D., Bander, N.H., Scheinberg, D.A., Sgouros, G. Response of LNCaP spheroids after treatment with an alpha-particle emitter ( $^{213}\text{Bi}$ )-labeled anti-prostate-specific membrane antigen antibody (J591). *Cancer Res.* 61 (2001) 2008-2014
- Bayer Cooperation. Automated Chemiluminescence System ACS: 180<sup>®</sup>, Gebrauchsanweisung Deutsch (2000).
- Beck, R., Seidl, C., Pfost, B., Morgenstern, A., Bruchertseifer, F., Baum, H., Schwaiger, M., Senekowitsch-Schmidtke, R.  $^{213}\text{Bi}$ -radioimmunotherapy defeats early-stage disseminated gastric cancer in nude mice. *Cancer Sci.* 98 (2007) 1215-1222
- Becker, K.F., Atkinson, M.J., Reich, U., Becker, I., Nekarda, H., Siewert, J.R., Höfler, H. E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas. *Cancer Res.* 54 (1994) 3845-3852
- Becker, K.F., Kremmer, E., Eulitz, M., Becker, I., Handschuh, G., Schuhmacher, C., Müller, W., Gabbert, H.E., Ochiai, A., Hirohashi, S., Höfler, H. Analysis of E-cadherin in diffuse-type gastric cancer using a mutation-specific monoclonal antibody. *Am J Pathol.* 155 (1999) 3845-3852
- Behr, T.M., Becker, W.S., Sharkey, R.M., Juweid, M.E., Dunn, R.M., Bair, H.-J., Wolf, F.G., Goldenberg, D.M. Reduction of renal uptake of monoclonal antibody fragments by amino acid infusion. *J Nucl Med.* 37 (1996) 829-833

- Behr, T.M., Behe, M., Stabin, M.G., Wehrmann, E., Apostolidis, C., Molinet, R., Strutz, F., Fayyazi, A., Wieland, E., Gratz, S., Koch, L., Goldenberg, D.M., Becker, W. High-linear energy transfer (LET) alpha versus low-LET beta emitters in radioimmunotherapy of solid tumors: therapeutic efficacy and dose-limiting toxicity of  $^{213}\text{Bi}$ - versus  $^{90}\text{Y}$ -labeled CO17-1A Fab' fragments in a human colonic cancer model. *Cancer Res.* 59 (1999) 2635-2643
- Behr, T.M., Sharkey, R.M., Juweid, M.E., Blumenthal, R.D., Dunn, R.M., Griffiths, G.L., Bair, H.J., Wolf, F.G., Becker, W.S., Goldenberg, D.M. Reduction of the renal uptake of radiolabeled monoclonal antibody fragments by cationic amino acids and their derivatives. *Cancer Res.* 55 (1995) 3825-3834
- Behr, T.M., Sharkey, R.M., Sgouros, G., Blumenthal, R.D., Dunn, R.M., Kolbert, K., Griffiths, G.L., Siegel, J.A., Becker, W.S., Goldenberg, D.M. Overcoming the nephrotoxicity of radiometal-labeled immunoconjugates: improved cancer therapy administered to a nude mouse model in relation to the internal radiation dosimetry. *Cancer.* 80 (1997) 2591-2610
- Bloechl, S., Beck, R., Seidl, C., Morgenstern, A., Schwaiger, M., Senekowitsch-Schmidtke, R. Fractionated Locoregional Low-Dose Radioimmunotherapy Improves Survival in a Mouse Model of Diffuse-Type Gastric Cancer Using a  $^{213}\text{Bi}$ -Conjugated Monoclonal Antibody. *Clin Cancer Res.* 11 (2005) 7070s-7074s
- Böcker, W., Höfler, H.K., Kleihues, P., Denk, H., Heitz, Ph.U. Allgemeine Tumorpathologie In: „Pathologie“ Böcker, W., Denk, H., Heitz, Ph.U. (Hrsg.), Urban & Fischer. München, Jena, 2001, 2. Auflage, 206
- Borchard, F. Magen und Duodenum. In: „Pathologie“. Böcker, W., Denk, H., Heitz, Ph.U. (Hrsg.), Urban & Fischer. München, Jena, 2001, 2. Auflage, 635-656
- Borchardt, P.E., Quadri, S.M., Freedman, R.S., Vriesendorp, H.M. Intraperitoneal radioimmunotherapy with human monoclonal IgM in nude mice with peritoneal carcinomatosis. *Cancer Biother Radiopharm.* 15 (2000) 53-64
- Brechbiel, M.W. Targeted  $\alpha$ -therapy: past, present, future? *Dalton Trans.* (2007) 4918-4928
- Buchhorn, H.M., Seidl, C., Beck, R., Saur, D., Apostolidis, C., Morgenstern, A., Schwaiger, M., Senekowitsch-Schmidtke, R. Non-invasive visualisation of development of peritoneal carcinomatosis and tumor regression after  $^{213}\text{Bi}$ -radioimmunotherapy using bioluminescence imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 34 (2007) 841-849
- Buchsbaum, D., Khazaeli, M.B., Liu, T., Bright, S., Richardson, K., Jones, M., Meredith, R. Fractionated radioimmunotherapy of human colon carcinoma xenografts with  $^{131}\text{I}$ -labeled monoclonal antibody CC49. *Cancer Res.* 55 (1995) 5881s-5887s
- Chang, C.H., Sharkey, R.M., Rossi, E.A., Karacay, H., McBride, W., Hansen, H.J., Chatal, J.F., Barbet, J., Goldenberg, D.M. Molecular advances in pretargeting radioimmunotherapy with bispecific antibodies. *Mol Cancer Ther.* 1 (2002) 553-563

Charles River Laboratories International, Inc.<sup>(1)</sup>, Swiss Nude Mice,  
<http://www.criver.com/SiteCollectionDocuments/SWISS%20Nude.pdf>.  
Stand: 03.01.2009

Charles River Laboratories International, Inc.<sup>(2)</sup>, Research animal models, Balb/c  
Mouse, [http://www.criver.com/enUS/ProdServ/ByType/ResModOver/ResMod/Pages/  
BALBcMouse.aspx](http://www.criver.com/enUS/ProdServ/ByType/ResModOver/ResMod/Pages/BALBcMouse.aspx). Stand: 03.01.2009

Choi, S.R., Jang, J.S., Lee, J.H., Roh, M.H., Kim, M.C., Lee, W.S., Qureshi, W. Role of  
serum tumor markers in monitoring for recurrence of gastric cancer following radical  
gastrectomy. *Dig Dis Sci.* 51 (2006) 2081-2086

Cohen, E.P., Bonsib, S.A., Whitehouse, E., Hopewell, J.W., Robbins, M.E. Mediators  
and Mechanism of radiation nephropathy. *Proc Soc Exp Biol Med.* 223 (2000) 218-225

Cohen, E.P., Robbins, M.E. Radiation nephropathy. *Semin Nephrol.* 23 (2003) 486-499

Couturier, O., Supiot, S., Degraef-Mougin, M., Faivre-Chauvet, A., Carlier, T., Chatal,  
J.-F., Davodeau, F., Cherel, M. Cancer radioimmunotherapy with alpha-emitting  
nuclides. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 32 (2005) 601-614

Cunningham, D., Allum, W.H., Stenning, S.P., Thompson, J.N., Van de Velde, C.J.,  
Nicolson, M., Scarffe, J.H., Lofts, F.J., Falk, S.J., Iveson, T.J., Smith, D.B., Langley,  
R.E., Verma, M., Weeden, S., Chua, Y.J. Magic Trial Participants. Perioperative  
chemotherapy versus surgery alone for respectable gastroesophageal cancer.  
*N Eng J Med.* 355 (2006) 11-20

Dadachova, E. Radioimmunotherapy of fungal and bacterial infections. Book of  
Abstracts. 4<sup>th</sup> Alpha-Immunotherapy Symposium 28-29 June 2004. Düsseldorf,  
Germany. 30

Dadachova, E., Casadevall, A. Treatment of infection with radiolabeled antibodies.  
*Q J Nucl Med Mol Imaging.* 50 (2006) 193-204

Dadachova, E., Revskaya, E., Sesay, M.A., Damania, H., Boucher, R., Sellers, R.S.,  
Howell, R.C., Burns, L., Thornton, G.B., Natarajan, A., Mirick, G.R., DeNardo, S.J.,  
DeNardo, G.L., Casadevall, A. Pre-clinical evaluation and efficacy studies of a melanin-  
binding IgM antibody labeled with (188)Re against experimental human metastatic  
melanoma in nude mice. *Cancer Biol Ther.* 28 (2008) 1116-1127

Davies, A.J. Radioimmunotherapy for B-cell lymphoma: <sup>90</sup>Y ibritumomab tiuxetan and  
<sup>131</sup>I tositumomab. *Oncogene.* 26 (2007) 3614-3628

DeNardo, G.L., DeNardo, S.J., Lamborn, K.R., Goldstein, D.S., Levy, N.B., Lewis, J.P.,  
O'Grady, L.F., Raventos, A., Kroger, L.A., Macey, D.J., McGahan, J.P., Mills, S.L.,  
Shen, S. Low-dose, fractionated radioimmunotherapy for B-cell malignancies using  
<sup>131</sup>I-Lym-1 antibody. *Cancer Biother Radiopharm.* 13 (1998) 239-254

DeNardo, G.L., Schlom, J., Buchsbaum, D.J., Meredith, R.F., O'Donoghue, J.A.,  
Sgouros, G., Humm, J.L., DeNardo, S.J. Rationales, evidence, and design  
considerations for fractionated radioimmunotherapy. *Cancer* 2002 (94) 1332-1348

Denk, H. Peritoneum. In: „Pathologie“. Böcker, W., Denk, H., Heitz, Ph.U. (Hrsg.),  
Urban & Fischer. München, Jena, 2001, 2. Auflage, 769

- Elgqvist<sup>(1)</sup>, J., Andersson, H., Bäck, T., Claesson, I., Hultborn, R., Jensen, H., Johansson, B. R., Lindegren, S., Olsson, M., Palm, S., Warnhammar, E., Jacobsson, L. Fractionated radioimmunotherapy of intraperitoneally growing ovarian cancer in nude mice with <sup>211</sup>At-MX35 F(ab')<sub>2</sub>: therapeutic efficacy and myelotoxicity. *Nucl Med Biol.* 33 (2006) 1065-1072
- Elgqvist<sup>(2)</sup>, J., Andersson, H., Bäck, T., Claesson, I., Hultborn, R., Jensen, H., Johansson, B. R., Lindegren, S., Olsson, M., Palm, S., Warnhammar, E., Jacobsson, L.  $\alpha$ -Radioimmunotherapy of intraperitoneally growing OVCAR-3 tumors of variable dimensions: outcomerelated to measured tumor size and mean absorbed dose. *J Nucl Med.* 47 (2006) 1342-1350
- Fukudome, Y., Yanagihara, K., Takeichi, M., Ito, F., Shibamoto, S. Characterization of a mutant E-cadherin protein encoded by a mutant gene frequently seen in diffuse-type human gastric carcinoma. *Int J Cancer.* 88 (2000) 579-583
- Garmestani, K., Yao, Z., Zhang, M., Wong, K., Park, C.W., Pastan, I., Carrasquillo, J.A., Brechbiel, M.W. Synthesis and evaluation of a macrocyclic bifunctional chelating agent for use with bismuth radionuclides. *Nucl Med Biol.* 28 (2001) 409-418
- Gaspar, M.J., Arribas, I., Coca, M.C., ez-Alonso, M. Prognostic value of carcinoembryonic antigen, CA 19-9 and CA 72-4 in gastric carcinoma. *Tumour Biol.* 22 (2001) 318-322
- Gold, P., Freedman, S.O. Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. *J Exp Med.* 121 (1965) 439-462
- Goldenberg, D.M. Targeted therapy of cancer with radiolabeled antibodies. *J Nucl Med.* 43 (2002) 693-713
- Griffith, M.H., Yorke, E.D., Wessels, B.W., DeNardo, G.L., Neacy, W.P. Direct dose confirmation of quantitative autoradiography with micro-TLD measurements for radioimmunotherapy. *J Nucl Med.* 29 (1988) 1795-1809
- Hagenbeek, A., Bischof-Delaloye, A., Radford, J.A., Rohatiner, A., Salles, G., Van Hoof, A., Putz, B., Kunz, M., Morschhauser, F. <sup>90</sup>Y-Ibritumomab Tiuxetan (Zevalin®) consolidation of first remission in advanced stage follicular non-hodgkin's lymphoma: first results of the international randomized phase 3 first-line indolent trial (FIT) in 414 patients. Abstract # 634. *Blood.* 110 (2007)
- Hallisey, M.T., Dunn, J.A., Ward, L.C., Allum, W.H. The second British Stomach Cancer Group trial of adjuvant radiotherapy or chemotherapy in resectable gastric cancer: five-year follow-up. *Lancet.* 343 (1994) 1309-1312
- Heeger, S., Moldenhauer, G., Egerer, G., Wesch, H., Marmé, A., Nikula, T., Apostolidis C., Janssens, W., Brechbiel, M., Haberkorn, U., Ho, A.D., Haas, R. Alpha Radioconjugates for the Treatment of Malignant Lymphoma and Gynecological Tumors. 4<sup>th</sup> Alpha-Immunotherapy Symposium 28-29 June 2004. Düsseldorf, Germany.

- Heideman, D.A., Snijders, P.J., Craanen, M.E., Bloemena, E., Meijer, C.J., Meuwissen, S.G., van Beusechem, V.W., Pinedo, H.M., Curiel, D.T., Haisma, H.J., Gerritsen, W.R. Selective gene delivery toward gastric and esophageal adenocarcinoma cells via EpCAM-targeted adenoviral vectors. *Cancer Gene Ther.* 8 (2001) 342-351
- Held, G., Schubert, J., Pfreundschuh, M. Therapie bösartiger Hämoblastosen mit monoklonalen Antikörpern. *Der Internist.* 49 (2008) 929-937
- Herold, G. Magenkarzinom. In: „Innere Medizin“. Herold, G. und Mitarbeiter. 2008
- Huber, R. Bewertung der lokoregionalen Radioimmuntherapie disseminierter Tumorzellen des diffusen Magenkarzinoms mit einem  $^{213}\text{Bi}$  gekoppelten tumorspezifischen Antikörper im Mausmodell. Dissertation Ludwig-Maximilians-Universität München, 2003
- Huber, R., Seidl, C., Schmid, E., Seidenschwang, S., Becker, K.F., Schuhmacher, C., Apostolidis, C., Nikula, T., Kremmer, E., Schwaiger, M., Senekowitsch-Schmidtke, R. Locoregional alpha-radioimmunotherapy of intraperitoneal tumor cell dissemination using a tumor-specific monoclonal antibody. *Clin Cancer Res.* 9 (2003) 3922s-3928s
- Illert, B., Otto, C., Vollmers, H.P., Hensel, F., Thiede, A., Timmermann, W. Human antibody SC-1 reduces disseminated tumor cells in nude mice human gastric cancer. *Oncol Rep.* 13 (2005) 765-770
- Imam, S.K. Advancements in cancer therapy with alpha-emitters: a review. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 51 (2001) 271-278
- Ishigami, S., Natsugoe, S., Hokita, S., Che, X., Tokuda, K., Nakajo, A., Iwashige, H., Tokushige, M., Watanabe, T., Takao, S., Aikou, T. Clinical importance of preoperative carcinoembryonic antigen and carbohydrate antigen 19-9 levels in gastric cancer. *J Clin Gastroenterol.* 32 (2001) 41-44
- Jaggi<sup>(1)</sup>, J.S., Kappel, B.J., McDevitt, M.R., Sgouros, G., Flombaum, C.D., Cabassa, C., Scheinberg, D.A. Efforts to control the errant products of a targeted in vivo generator. *Cancer Res.* 65 (2005) 4888-4895
- Jaggi<sup>(2)</sup>, J.S., Seshan, S.V., McDevitt, M.R., LaPerle, K., Sgouros, G., Scheinberg, D.A. Renal tubulointerstitial changes after internal irradiation with alpha-particle-emitting actinium daughters. *J Am Soc Nephrol.* 16 (2005) 2677-2689
- Jain, R.K. Vascular and interstitial barriers to delivery of therapeutic agents in tumors. *Cancer Metastasis Rev.* 9 (1990) 253-266
- 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., Scheinberg, D.A. Targeted alpha particle immunotherapy for myeloid leukemia. *Blood* 100 (2002) 1233-1239
- Kennel, S.J., Lankford, T., Davern, S., Foote, L., Taniguchi, K., Ohizumi, I., Tsutsumi, Y., Nakagawa, S., Mayumi, T., Mirzadeh, S. Therapy of rat tracheal carcinoma IC-12 in SCID mice: vascular targeting with  $[^{213}\text{Bi}]$ -MAb TES-23. *Eur J Cancer.* 38 (2002) 1278-1287

- Kneifel, S., Cordier, D., Good, S., Ionescu, M.C.S., Ghaffari, A., Hofer, S., Kretzschmar, M., Tolnay, M., Apostolidis, C., Waser, B., Arnold, M., Mueller-Brand, J., Maecke, H.R., Reubi, J.C., Merlo, A. Local targeting of malignant gliomas by the diffusible peptidic vector 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1-glutaric acid-4,7,10-triacetic acid-substance P. *Clin Cancer Res.* 12 (2006) 3843-3850
- Knox, S.J., Meredith, R.F. Clinical radioimmunotherapy. *Semin Radiat Oncol.* 10 (2000) 73-93
- Köhler, G., Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 256 (1975) 495-497
- Kono, K., Rongcun, Y., Charo, J., Ichihara, F., Celis, E., Sette, A., Appella, E., Sekikawa, T., Matsumoto, Y., Kiessling, R. Identification of HER2/neu-derived peptide epitopes recognized by gastric cancer-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int J Cancer.* 78 (1998) 202-208
- Lamerz, R., Stieber, P., Borlinghaus, P., Schmid, L. Tumormarker. In: „Manual Gastrointestinale Tumoren“. Heiss, M.M. (Hrsg. ), W. Zuckschwerdt Verlag, München, Wien, New York, 2001, 6. Auflage, 43-49
- Lordick, F., Peschel, C., Siewert, J.R. Antibody-based targeted therapy for gastric cancer. *Gastric Cancer.* 8 (2005) 249-252
- Lordick, F., Siewert, J.R. Recent advances in multimodal treatment for gastric cancer: a review. *Gastric Cancer.* 8 (2005) 78-85
- Ma, D., McDevitt, M.R., Finn, R.D., Scheinberg, D.A. Breakthrough of  $^{225}\text{Ac}$  and its radionuclide daughters from an  $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$  generator: development of new methods, quantitative characterization, and implications for clinical use. *Appl Radiat Isot.* 55 (2001) 667-678
- Macdonald, J.S., Smalley, S.R., Benedetti, J., Hundahl, S.A., Estes, N.C., Stemmermann, G.N., Haller, D.G., Ajani, J.A., Gunderson, L.L., Jessup, J.M., Martenson, J.A. Chemoradiotherapy after surgery compared with surgery alone for adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction. *N Engl J Med.* 345 (2001) 725-730
- Macklis, R.M., Kinsey, B.M., Kassis, A.I., Ferrara, J.L., Atcher, R.W., Hines, J.J., Coleman, C.N., Adelstein, S.J., Burakoff, S.J. Radioimmunotherapy with alpha-particle-emitting immunoconjugates. *Science.* 240 (1988) 1024-1026
- Macklis, R.M., Lin, J.Y., Beresford, B., Atcher, R.W., Hines, J.J., Humm, J.L. Cellular kinetics, dosimetry, and radiobiology of alpha-particle radioimmunotherapy: induction of apoptosis. *Radiat Res.* 130 (1992) 220-226
- Maza, S., Gellrich, S., Assaf, C., Beyer, M., Spilker, L., Orawa, H., Munz, D.L., Sterry, W., Steinhoff, M. Yttrium-90 ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy in primary cutaneous B-cell lymphomas: first results of a prospective, monocentre study. *Leuk Lymphoma.* 25 (2008) 1-8

- McDevitt, M.R., Barendswaard, E., Ma, D., Lai, L., Curcio, M.J., Sgouros, G., Ballangrud, A.M., Yang, W.H., Finn, R.D., Pellegrini, V., Geerlings, M.W., Jr., Lee, M., Brechbiel, M.W., Bander, N.H., Cordon-Cardo, C., Scheinberg, D.A. An alpha-particle emitting antibody ([<sup>213</sup>Bi]J591) for radioimmunotherapy of prostate cancer. *Cancer Res.* 60 (2000) 6095-6100
- McDevitt<sup>(1)</sup>, M.R., Finn, R.D., Ma, D., Larson, S.M., Scheinberg, D.A. Preparation of  $\alpha$ -emitting <sup>213</sup>Bi-labeled antibody constructs for clinical use. *J Nucl Med.* 40 (1999) 1722-1727
- McDevitt<sup>(2)</sup>, M.R., Finn, R.D., Sgouros, G., Ma, D., Scheinberg, D.A. An <sup>225</sup>Ac/<sup>213</sup>Bi generator system for therapeutic clinical applications: construction and operation. *Appl Radiat Isot.* 50 (1999) 895-904
- McDevitt, M.R., Sgouros, G., Finn, R.D., Humm, J.L., Jurcic, J.G., Larson, S.M., Scheinberg, D.A. Radioimmunotherapy with alpha-emitting nuclides. *Eur J Nucl Med.* 25 (1998) 1341-1351
- McLendon, R.E., Akabani, G., Friedman, H.S., Reardon, D.A., Cleveland, L., Cokgor, I., Herndon 2<sup>nd</sup>, J.E., Wikstrand, C., Boulton, S.T., Friedman, A.H., Bigner, D.D., Zalutsky, M.R. Tumor resection cavity administered iodine-131-labeled antitenascin 81C6 radioimmunotherapy in patients with malignant glioma: neuropathology aspects. *Nucl Med Biol.* 34 (2007) 405-413
- Meredith, R.F., Buchsbaum, D.J., Alvarez, R.D., LoBuglio, A.F. Brief overview of preclinical studies in the development of intraperitoneal radioimmunotherapy for ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 13 (2007) 5642s-5645s
- Meredith, R.F., Khazaeli, M.B., Liu, T., Plott, G., Wheeler, R.H., Russell, C., Colcher, D., Schlom, J., Shochat, D., LoBuglio, A.F. Dose fractionation of radiolabeled antibodies in patients with metastatic colon cancer. *J Nucl Med.* 33 (1992) 1648-1653
- Mihmanli, M., Dilege, E., Demir, U., Coskun, H., Eroglu, T., Uysalol, M.D. The use of tumor markers as predictors of prognosis in gastric cancer. *Hepatogastroenterology.* 51 (2004) 1544-1547
- Milenic<sup>(1)</sup>, D.E., Garmestani, K., Brady, E.D., Albert, P.S., Ma, D., Abdulla, A., Brechbiel, M.W. Targeting of HER2 antigen for the treatment of disseminated peritoneal disease. *Clin Cancer Res.* 10 (2004) 7834-7841
- Milenic<sup>(2)</sup>, D., Garmestani, K., Dadachova, E., Chappell, L., Albert, P., Hill, D., Schlom, J., Brechbiel, M. Radioimmunotherapy of human colon carcinoma xenografts using a <sup>213</sup>Bi-labeled domain-deleted humanized monoclonal antibody. *Cancer Biother Radiopharm.* 19 (2004) 135-147
- Miura, S., Endo, Y., Yoshimura, Y., Endo, M., Yonemura, Y., Sasaki, T. Potent antitumor effect of 1-(2-deoxy-2-fluoro-4-thio-beta-D-arabinofuranosyl)cytosine on peritoneal dissemination models of gastrointestinal cancers. *Oncol Rep.* 9 (2002) 1319-1322
- National Cancer Institute. Surveillance Epidemiology and End Results. [http://www.seer.cancer.gov/statfacts/html/stomach\\_print.html](http://www.seer.cancer.gov/statfacts/html/stomach_print.html). Stand: 13.06.2008

- Nikula, T.K., McDevitt, M.R., Finn, R.D., Wu, C., Kozak, R.W., Garmestani, K., Brechbiel, M.W., Curcio, M.J., Pippin, C.G., Tiffany-Jones, L., Geerlings, M.W., Sr., Apostolidis, C., Molinet, R., Geerlings, M.W., Jr., Gansow, O.A., Scheinberg, D.A. Alpha-emitting bismuth cyclohexylbenzyl DTPA constructs of recombinant humanized anti-CD33 antibodies: pharmacokinetics, bioactivity, toxicity and chemistry. *J Nucl Med.* 40 (1999) 166-176
- Norenberg, J.P., Krenning, B.J., Konings, I.R.H.M., Kusewitt, D.F., Nayak, T.K., Anderson, T.L., de Jong, M., Garmestani, K., Brechbiel, M.W., Kvols, L.K.  $^{213}\text{Bi}$ -[DOTA<sup>0</sup>, Tyr<sup>3</sup>]octreotide peptide receptor radionuclide therapy of pancreatic tumors in a preclinical animal model. *Clin Cancer Res.* 12 (2006) 897-903
- Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 55 (2005) 74-108
- Persson, M., Gedda, L., Lundqvist, H., Tolmachev, V., Nordgren, H., Malmström, P.U., Carlsson, J. [ $^{177}\text{Lu}$ ]pertuzumab: experimental therapy of HER-2-expressing xenografts. *Cancer Res.* 67 (2007) 326-331
- Raja, C., Graham, P., Abbas Rizvi, S.M., Song, E., Goldsmith, H., Thompson, J., Bosserhoff, A., Morgenstern, A., Apostolidis, C., Kearsley, J., Reisfeld, R., Allen, B.J. Interim analysis of toxicity and response in a phase 1 trial of systemic targeted alpha therapy for metastatic melanoma. *Cancer Biol Ther.* 6 (2007) 846-852
- Rebischung, C., Barnoud, R., Stéfani, L., Faucheron, J.L., Mousseau, M. The effectiveness of trastuzumab (Herceptin) combined with chemotherapy for gastric carcinoma with overexpression of the c-erbB-2 protein. *Gastric Cancer.* 8 (2005) 249-252
- Reiter, W., Stieber, P., Reuter, C., Nagel, D., Cramer, C., Pahl, H., Fateh-Moghadam, A. Prognostic value of preoperative serum levels of CEA, CA 19-9 and CA 72-4 in gastric carcinoma. *Anticancer Res.* 17 (1997) 2903-2906
- Roberson, P.L., Buchsbaum, D.J. Reconciliation of tumor dose response to external beam radiotherapy versus radioimmunotherapy with  $^{131}\text{I}$ iodine-labeled antibody for colon cancer model. *Cancer Res.* 55 (1995) 5811s-5816s
- Rolleman, E.J., Valkema, R., de Jong, M., Kooij, P.P., Krenning, E.P. Safe and effective inhibition of renal uptake of radiolabelled octreotide by a combination of lysine and arginine. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 30 (2003) 9-15
- Rosenberg, R., Nekarda, H., Bauer, P., Schenck, U., Hoefler, H., Siewert, J.R. Free peritoneal tumour cells are an independent prognostic factor in curatively resected stage IB gastric carcinoma. *Br J Surg.* 93 (2006) 325-331
- Sadeghi, B., Arvieux, C., Glehen, O., Beaujard, A.C., Rivoire, M., Baulieux, J., Fontaumard, E., Brachet, A., Caillot, J.L., Faure, J.L., Porcheron, J., Peix, J.L., Francois, Y., Vignal, J., Gilly, F.N. Peritoneal carcinomatosis from non-gynecologic malignancies: results of the EVOCAPE 1 multicentric prospective study. *Cancer.* 88 (2000) 358-363

- Sauer, R. Strahlenbiologie. Möglichkeiten zur Wirkungssteigerung der Strahlentherapie. In: „Radiologie“. Kauffmann, G.W., Moser, E., Sauer, R. (Hrsg.) Urban & Fischer Verlag, München-Jena, 2001, 2. Auflage, 52-53
- Schicha, H., Schober<sup>(1)</sup>, O. Prinzipien der Nuklearmedizin. In: „Nuklearmedizin, Basiswissen und klinische Anwendung“. Schicha, H., Schober, O. (Hrsg.), Schattauer, Stuttgart-New York, 2003, 5. Auflage, 6-7
- Schicha, H., Schober<sup>(2)</sup>, O. Radiopharmazeutische Chemie. In: „Nuklearmedizin, Basiswissen und klinische Anwendung“. Schicha, H., Schober, O. (Hrsg.), Schattauer, Stuttgart-New York, 2003, 5. Auflage, 30-31, 40
- Schlom, J., Molinolo, A., Simpson, J.F., Siler, K., Roselli, M., Hinkle, G., Houchens, D.P., Colcher, D. Advantage of dose fractionation in monoclonal antibody-targeted radioimmunotherapy. *J Natl Cancer Inst.* 82 (1990) 763-771
- Schlom, J., Siler, K., Milenic, D.E., Eggensperger, D., Colcher, D., Miller, L.S., Houchens, D., Cheng, R., Kaplan, D., Goeckeler, W. Monoclonal antibody-based therapy of a human tumor xenograft with a <sup>177</sup>lutetium-labeled immunoconjugate. *Cancer Res.* 51 (1991) 2889-2896
- Seidenschwang, S.. Untersuchungen zur In-Vitro-Zytotoxizität von <sup>213</sup>Bi-Immunkonjugaten. Dissertation Technische Universität München, 2006
- Seidl, C., Port, M., Gilbertz, K.-P., Morgenstern, A., Bruchertseifer, F., Schwaiger, M., Röper, B., Senekowitsch-Schmidtke, R., Abend, M. <sup>213</sup>Bi-induced death of HSC45-M2 gastric cancer cells is characterized by G<sub>2</sub> arrest and up-regulation of genes known to prevent apoptosis but induce necrosis and mitotic catastrophe. *Mol Cancer Ther.* 6 (2007) 2346-2359
- Seidl, C., Schröck, H., Seidenschwang, S., Beck, R., Schmid, E., Abend, M., Becker, K.F., Apostolidis, C., Nikula, T.K., Kremmer, E., Schwaiger, M., Senekowitsch-Schmidtke, R. Cell death triggered by alpha-emitting <sup>213</sup>Bi-immunoconjugates in HSC45-M2 gastric cancer cells is different from apoptotic cell death. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 32 (2005) 274-285
- Seidl, C., Senekowitsch-Schmidtke<sup>(1)</sup>, R. Treatment of diffuse-type gastric cancer cells using <sup>213</sup>Bi-radioimmunotherapy in vitro and in vivo following intraperitoneal dissemination. *Current Radiopharmaceuticals.* 1 (2008) 215-224
- Seidl, C., Senekowitsch-Schmidtke<sup>(2)</sup>, R. Zielgerichtete Radionuklidtherapie mit  $\alpha$ -Emittern – Grundlagen, experimentelle und erste klinische Studien. *Der Nuklearmediziner.* 31 (2008) 81-92
- Sendler, A., Prinz, C., Janetschek, P., Becher, K., Grützner, U., Lordick, F., Schuhmacher, C., Zimmermann, F. Magenkarzinom. In: „Manual Gastrointestinale Tumoren“, Sendler, A. (Hrsg.), W. Zuckschwerdt Verlag, München, Wien, New York, 2006, 7. Auflage, 26-53

- Senekowitsch-Schmidtke, R., Schuhmacher, C., Becker, K.F., Nikula, T.K., Seidl, C., Becker, I., Miederer, M., Apostolidis, C., Adam, C., Huber, R., Kremmer, E., Fischer, K., Schwaiger, M. Highly specific tumor binding of a  $^{213}\text{Bi}$ -labeled monoclonal antibody against mutant E-cadherin suggests its usefulness for locoregional alpha-radioimmunotherapy of diffuse-type gastric cancer. *Cancer Res.* 61 (2001) 2804-2808
- Song, E.Y., Qu, C.F., Rizvi, S.M., Raja, C., Beretov, J., Morgenstern, A., Apostolidis, C., Bruchertseifer, F., Perkins, A., Allen, B.J. Bismuth-213 radioimmunotherapy with C595 anti-MUC1 monoclonal antibody in an ovarian cancer ascites model. *Cancer Biol Ther.* 7 (2008) 76-80
- Stigbrand, T., Ullen, A., Sandstrom, P., Mirzaie-Joniani, H., Sundstrom, B., Nillson, B., Arlestig, L., Norrlund, R.R., Ahlstrom, K.R., Hietala, S. Twenty years with monoclonal antibodies: State of the art--Where do we go? *Acta Oncol.* 35 (1996) 259-265
- Sugarbaker, P.H., Yonemura, Y. Clinical pathway for the management of resectable gastric cancer with peritoneal seeding: best palliation with a ray of hope for cure. *Oncology.* 58 (2000) 96-107
- Tian, J., Ding, Y., Zhang, J., Cao, L., Yin, D. Fractionated radioimmunotherapy using low doses of iodine-131 labeled anti-CEA monoclonal antibody after tumor volume reduction. *Chin Med J. (Engl.)* 113 (2000) 53-58
- van Eerd, J.E., Vegt, E., Wetzels, J.F., Russel, F.G., Masereeuw, R., Corstens, F.H., Oyen, W.J., Boerman, O.C. Gelatin-based plasma expander effectively reduces renal uptake of  $^{111}\text{In}$ -octreotide in mice and rats. *J Nucl Med.* 47 (2006) 528-533
- Vandenbulcke, K., De Vos, F., Offner, F., Philippé, J., Apostolidis, C., Molinet, R., Nikula, T.K., Bacher, K., de Gelder, V., Vral, A., Lahorte, C., Thierens, H., Dierckx, R.A., Slegers, G. In vitro evaluation of  $^{213}\text{Bi}$ -rituximab versus external gamma irradiation for the treatment of B-CLL patients: relative biological efficacy with respect to apoptosis induction and chromosomal damage. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 30 (2003) 1357-1364
- Vegt, E., Wetzels, J.F., Russel, F.G., Masereeuw, R., Boerman, O.C., van Eerd, J.E., Corstens, F.H., Oyen, W.J. Renal uptake of radiolabeled octreotide in human subjects is efficiently inhibited by succinylated gelatin. *J Nucl Med.* 47 (2006) 432-436
- Vriesendorp, H.M., Shao, Y., Blum, J.E., Quadri, S.M., Williams, J.R. Fractionated intravenous administration of  $^{90}\text{Y}$ -labeled B72.3 GYK-DTPA immunoconjugate in beagle dogs. *Nucl Med Biol.* 20 (1993) 571-578
- Wolter, C., Neumeier D. Tumormarker bei gastrointestinalen Erkrankungen. In: „Praxis der Viszeralchirurgie“. Siewert, J.R., Rothmund, M., Schumpelick, V. (Hrsg.), Springer, Berlin Heidelberg, 2006, 2. Auflage, 141-154
- Yan, T.D., Stuart, O.A., Yoo, D., Sugarbaker, P.H. Perioperative intraperitoneal chemotherapy for peritoneal surface malignancy. *J Transl Med.* 4 (2006)
- Yanagihara, K., Ito, A., Toge, T., Numoto, M. Antiproliferative effects of isoflavones on human cancer cell lines established from the gastrointestinal tract. *Cancer Res.* 53 (1993) 5815-5821

Yonemura, Y., Endo, Y., Obata, T., Sasaki, T. Recent advances in treatment of peritoneal dissemination of gastrointestinal cancers by nucleoside antimetabolites. *Cancer Sci.* 98 (2007) 11-18

Zalutsky, M.R., Vaidyanathan, G. Astatine-211-labeled radiotherapeutics: an emerging approach to targeted alpha-particle radiotherapy. *Curr Pharm Des.* 6 (2000) 1433-1455

Zöckler, C.A. Bewertung der lokoregionalen Radioimmuntherapie disseminierter Tumorzellen des diffusen Magenkarzinoms mit tumorspezifischen <sup>177</sup>Lu-d9MAK Konjugaten im Mausmodell. Technische Universität München, 2006

## Danksagung

---

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Dr. Reingard Senekowitsch-Schmidtke für die Überlassung des Themas und die sehr gute Betreuung meiner Dissertationsarbeit. Vor allem ihre unermüdliche Unterstützung und Motivation haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Besonderer Dank gebührt auch Herrn Dr. Christof Seidl für die intensive Betreuung. Ohne seine Unterstützung, Geduld und hilfreichen Ratschläge wäre meine Arbeit in dieser Form nicht zustande gekommen.

Frau Dr. Roswitha Beck danke ich für die wissenschaftlichen Inspirationen und ihre sehr gute Betreuung, insbesondere bei den tierexperimentellen Versuchen.

Frau Lydia Gebhardt möchte ich herzlichst für die Auswertung und Protokollierung meiner zahlreichen „CEA-Proben“ danken. Ohne ihre Hilfe wären die Versuche über den Nachweis des karzinoembryonalen Antigens in diesem großen Umfang nicht möglich gewesen. Gleichmaßen möchte ich allen Kolleginnen des RIA-Labors für ihre stete Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft danken.

Bei meinem Mitdoktoranden Stefan Nathrath und den Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik möchte ich für die Erstellung der murinen Karyogramme mittels M-FISH danken.

Dem Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie danke ich für die Bereitstellung der Analysegeräte.

Den Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Statistik und Epidemiologie danke ich für die Hilfe bei statistischen Fragestellungen.

Frau Ulrike Schwaiger und dem Team der Experimentellen Onkologie und Therapieforschung danke ich für die gute Pflege der Tiere.

Meinen Mitdoktoranden und allen Mitarbeitern des nuklearmedizinischen Forschungslabors danke ich für die praktischen Anregungen und Hilfestellungen. Besonders aber danke ich für die vielen unterhaltsamen Stunden im Labor und die hervorragende Arbeitsatmosphäre.

Ein besonderer Dank gebührt meiner Familie und meinen Freunden für ihre Motivation und Verständnis während meiner Zeit im Labor und beim Schreiben meiner Dissertationsarbeit.

Mein größter Dank geht an meine Mutter. Ihre unermüdliche Unterstützung, Geduld und Vertrauen haben in allen Höhen und Tiefen zum Gelingen meiner Dissertationsarbeit beigetragen.

# CURRICULUM VITAE

Stefanie Blöchl, geboren am 16.03.1980 in München

## SCHULAUSBILDUNG

---

1986 – 1990 Volksschule an der Fasanenstraße, Unterhaching  
1990 – 1999 Städtisches Theodolinden-Gymnasium, München  
06/1999 Allgemeine Hochschulreife

## HOCHSCHULSTUDIUM

---

1999 – 2001 Studium der Medizin, Ludwig-Maximilians-Universität, München  
2001 – 2006 Studium der Medizin, Technische Universität München  
05/2006 Approbation als Ärztin

## DISSERTATION

---

seit 2003 Doktorandin an der Nuklearmedizinischen Klinik und Poliklinik am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München bei Frau Prof. Dr. Dr. Senekowitsch-Schmidtke

## BERUFSTÄTIGKEIT

---

09/2006 – 01/2008 Assistenzärztin in der Klinik und Poliklinik für Herz-, Thorax- und herznahe Gefäßchirurgie, Klinikum der Universität Regensburg, Prof. Dr. D. Birnbaum / Prof. Dr. C. Schmid  
03/2008 – 05/2008 Assistenzärztin in der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie, Helios Klinikum Krefeld, Prof. Dr. F.-X. Schmid  
seit 08/2008 Assistenzärztin in der Abteilung für Anästhesiologie, Berufsgenossenschaftliche Unfallklinik Murnau, Dr. J. Büttner

## PUBLIKATIONEN UND PRÄSENTATIONEN

---

Blöchl, S., Beck, R., Seidl, C., Schuhmacher, C., Apostolidis, C., Schwaiger, M., Senekowitsch-Schmidtke, R.  
Fraktionierte Applikation eines Bi-213 markierten tumorspezifischen Antikörpers zur Radioimmuntherapie der Peritonealkarzinose im Tiermodell.  
Nuklearmedizin. 43 (2004) A75

Blöchl, S., Beck, R., Seidl, C., Becker, K.-F., Schuhmacher, C., Apostolidis, C., Nikula, T., Schuhmacher, C., Schwaiger, M., Senekowitsch-Schmidtke, R.  
Fractionated Radioimmunotherapy of Intraperitoneal Tumor Cell Dissemination in Nude Mice using a Bi-213-Conjugated Tumor Specific Antibody.  
J Nucl Med. 45 (2004) 388P

Beck, R., Blöchl, S., Seidl, C., Becker, K.F., Morgenstern, A., Schwaiger, M., Senekowitsch-Schmidtke, R.  
Optimization of Locoregional Radioimmunotherapy in Diffuse Type Gastric Cancer by Adjustment of the Activity and Fractionation in a Mouse Model.  
Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals. 19 (2004) 533

Senekowitsch-Schmidtke, R., Beck, R., Blöchl, S., Seidl, C., Becker, K.-F., Schuhmacher, C., Apostolidis, C., Morgenstern, A., Nikula, T., Schwaiger, M.  
Optimization of alpha-emitter immunotherapy following intraperitoneal application of <sup>213</sup>Bi-immunoconjugates.  
Book of Abstracts. 4<sup>th</sup> Alpha-Immunotherapy Symposium, Düsseldorf. (2004) 26

Bloechl, S., Beck, R., Seidl, C., Morgenstern, A., Schwaiger, M., Senekowitsch-Schmidtke, R.  
Fractionated Locoregional Low-Dose Radioimmunotherapy improves Survival in a Mouse Model of Diffuse-Type Gastric Cancer using a <sup>213</sup>Bi-Conjugated Monoclonal Antibody.  
Clin Cancer Res. 11 (2005) 7070s-7074s