

Nuklearmedizinische Klinik und Poliklinik  
der Technischen Universität München  
Klinikum rechts der Isar  
(Direktor: Univ.- Prof. Dr. M. Schwaiger)

In vitro Untersuchungen des zytotoxischen Effekts der alpha-  
emittierenden Nuklide  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{149}\text{Tb}$  und  $^{225}\text{Ac}$  gekoppelt an  
monoklonale Antikörper und Bewertung der physikalischen und  
biologischen Eigenschaften der Nuklide und Antikörper

Matthias Miederer

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. W.A. Weber

Die Dissertation wurde am 13.06.2002 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Medizin am 11.12.2002 angenommen.

## Meinen Eltern

1	Einleitung .....	6
2	Ziele.....	9
3	Grundlagen.....	11
3.1	Klinische Anwendung von beta-emittierenden Nukliden .....	11
3.2	Alpha-Zerfall.....	12
3.3	Tumorkrankheiten, Klinik, bisherige Therapie und möglicher Stellenwert der Radioimmuntherapie .....	13
3.3.1	Magenkarzinom.....	13
3.3.2	Neuroblastom .....	14
3.3.3	Akute myeloische Leukämie.....	15
4	Material .....	16
4.1	Chemikalien und Geräte.....	16
4.2	Verwendete Nuklide.....	17
4.2.1	Terbium-149 ( $^{149}\text{Tb}$ ).....	17
4.2.2	Actinium 225 ( $^{225}\text{Ac}$ ) .....	20
4.2.3	Bismuth-213 ( $^{213}\text{Bi}$ ).....	21
4.3	Antikörper .....	22
4.3.1	6H8 – Anti d9-E-cadherin .....	22
4.3.2	3F8 – Anti Gangliosid $\text{GD}_2$ .....	23
4.3.3	HuM-195 – Anti-CD33 .....	23
4.4	Zelllinien .....	24
4.4.1	MDA MB 435S Zellen.....	24
4.4.2	NMB7 Zellen.....	24
4.4.3	HL60 Zellen .....	24
5	Methoden.....	25
5.1	Zellkultur.....	25
5.1.1	Monolayer und Suspension .....	25
5.1.2	Spheroide.....	25
5.2	Radionuklidmarkierung der Antikörper.....	26
5.2.1	Radionuklidmarkierung mittels CHX-A-DTPA .....	26
5.2.2	Radionuklidmarkierung mittels HEHA.....	28
5.2.3	Radionuklidmarkierung mittels DOTA.....	28
5.3	Kontrolle der radiochemischen Reinheit der Radioimmunkonjugate .....	29

5.4	Kontrolle der Bindung der Radioimmunkonjugate .....	30
5.5	Bestimmung der Antigendichte und Affinität der Antikörper .....	31
5.5.1	Scatchard .....	31
5.5.2	FACS Analyse.....	32
5.6	Bestimmung der Proliferationsfähigkeit mittels $^3\text{H}$ -Thymidin inkorporierung .....	33
5.7	Klonogener Assay (96-well plate clonogenic assay) .....	34
5.8	Nachweis von Apoptose mittels Tunel Assay .....	35
5.9	Nachweis von Internalisierung der Radioimmunkonjugate .....	36
5.10	Ermittlung des Crossfire Effekts von Radioimmunkonjugaten .....	37
5.11	Toxizität von $^{213}\text{Bi}$ -6H8 und $^{149}\text{Tb}$ -6H8 an Sphroiden.....	37
5.12	Analyse chromosomaler Aberrationen.....	38
6	Ergebnisse .....	39
6.1	Radiochemische Reinheit und Bindung der Antikörper .....	39
6.1.1	Radiochemische Reinheit.....	39
6.1.2	Antikörperbindung .....	40
6.2	Internalisierung der Antikörper.....	42
6.3	Antigendichte auf den Zellen und Affinität der Antikörper.....	43
6.3.1	Scatchard Plot des Antikörpers 6H8 .....	44
6.3.2	FACS Analyse von d9 E-Cad MDA Zellen und Magenkarzinom Zelllinien ..	45
6.4	Toxizität von $^{213}\text{Bi}$ -6H8 an Zellsuspensionen, Zellpellets und Sphroiden.....	46
6.5	Toxizität von $^{149}\text{Tb}$ -6H8 an Zellsuspensionen, Zellpellets und Sphroiden .....	51
6.6	Zytotoxizität von $^{225}\text{Ac}$ -3F8 und $^{225}\text{Ac}$ -HuM195.....	54
6.7	Induktion von Apoptose .....	56
6.8	Chromosomenaberrationen .....	59
7	Diskussion .....	61
7.1	Bewertungen von Ergebnissen aus in vitro Untersuchungen.....	61
7.2	Bewertung von Strahlensensibilität, Internalisierung, Antikörper Affinität und Energie der alpha-Partikel .....	63
7.2.1	Strahlensensibilität der Zellmodelle.....	63
7.2.2	Affinität und Internalisierung.....	64
7.2.3	Reichweite.....	66
7.3	Dosimetrie .....	67
7.3.1	Mikrodosimtrie.....	68
7.3.1.1	Dosimetrie von $^{213}\text{Bi}$ und $^{149}\text{Tb}$ : Dosis und Wirkung auf Zellsuspensionen	68

7.4	Reaktion der Zelle: Apoptose und DNA Schäden .....	73
7.4.1	Apoptose.....	73
7.4.2	DNA Schäden.....	74
7.5	Erfolgsaussichten .....	75
8	Zusammenfassung.....	77
9	Abkürzungen .....	79

# 1 Einleitung

Die Applikation von Radioisotopen hat sich in der Radioiodtherapie des papillären und follikulären Schilddrüsenkarzinoms bewährt. Die hochspezifische Akkumulation von Iod und somit auch Iod-131 ( $t_{1/2} = 8\text{d}$ ) in Schilddrüsengewebe führt oft auch nach Metastasierung noch zu einer Heilung bei diesen Karzinomen. Nicht aufgenommenes Iod-131 wird innerhalb von 48 h vollständig über die Nieren ausgeschieden und im Tumor gespeichertes Iod-131 gibt seine Zerfallsenergie in Form von Betastrahlen an das Tumorgewebe ab (O'Doherty et al. 1993).

Diese Therapieform ist der Grund der hohen Heilungsrate und der damit verbundenen guten Prognose der wenig strahlen- und chemosensibeln Schilddrüsenkarzinomen.

Im Gegensatz dazu führt Chirurgie, kombiniert mit Chemo- und Strahlentherapie bei anderen malignen Erkrankungen oft nicht zu einer Heilung. Für die meisten soliden Tumoren würde man sich eine Anreicherung von Nukliden so spezifisch wie bei der Radioiodtherapie wünschen um auch disseminierte Tumoren erfolgreich behandeln zu können.

In den letzten Jahrzehnten ist das Wissen über Krebserkrankungen explosionsartig gewachsen und damit die Hoffnung auf Entdeckung von Tumoreigenschaften, die eine hochspezifische Tumorthherapie ermöglicht. Tumorgewebe unterscheidet sich von gesundem Gewebe unter anderem durch unreguliertes Wachstum und Infiltration der Zellen in umliegende Organe. Jede Zelle ist physiologischerweise in mehrere Regulationsmechanismen eingebunden. Hormone, Mediatoren und Zellkontakt zu Nachbarzellen steuern Zellproliferation und physiologische Invasion von z.B. Immunabwehrzellen oder Bindegewebszellen. Tumorzellen umgehen diese natürliche Regulation auf mehrere Arten. Bekannt ist z.B. die Überexpression von Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, so dass auch bei geringer Konzentration von Wachstumsfaktoren, Zellwachstum von außen maximal stimuliert wird (Senekowitsch-Schmidtke et al. 1996) (Yi et al. 1997). Solche Überexpressionen sind Beispiele von tumorassoziierten Antigenen, die sich durch die Anzahl der exprimierten Moleküle auf Tumorzellen von normalen Zellen unterscheiden. Aber besonders durch Mutationen verursachte Änderungen in Oberflächenantigenen sind als tumorspezifische Antigene für zielgerichtete Therapie nutzbar. Beispiele für solche tumorspezifischen Antigene sind Mutationen im Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin und die Variante EGFRvIII des epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptors (Becker et al. 1994) (Wikstrand et al. 1995). Ebenso wird die Expression von Genen, die sonst nur in einem frühen Differenzierungsstadium

nachweisbar sind, häufig in Tumoren des hämatopoetischen Systems gefunden. Bei Leukämien werden regelmäßig Oberflächenantigene auf Tumorzellen gefunden, deren Vorkommen sonst nur auf Stammzellen im Knochenmark physiologisch ist.

Dieses stetig steigende Wissen über tumorspezifische Oberflächenproteine macht das Prinzip von bindenden Antikörpern oder Peptiden, die – als Vehikel – Isotope direkt an den gewünschten Zielort transportieren, vielversprechend. Oberflächenantigene, die für zielgerichtete Tumortherapie untersucht werden sind u.a. das Prostata spezifische Membran Antigen (PMSA), CEA, CD44 und der Interleukin 4 Rezeptor (Behr et al. 1997; McDevitt et al. 2000; Stein et al. 2002) (Eliasz et al. 2001; Kawakami et al. 2001).

Schon seit 1950 wurden erste Versuche mit  $^{131}\text{I}$ -markierten polyklonalen Antikörpern durchgeführt (Pressman et al. 1957). Aber erst die Entwicklung von monoklonalen Antikörpern hat dazu geführt, dass in den letzten Jahren zu einer Reihe von Tumorerkrankungen weitere klinische Versuche mit Nukliden, gekoppelt an Antikörper, durchgeführt werden konnten (Carter 2001).

Durch Fusion von B-Lymphozyten aus der Milz von mit menschlichen Tumorantigenen immunisierten Mäusen mit Krebszellen von myeloischen Leukämien gelang es die Eigenschaften von uneingeschränkter Teilungsfähigkeit und die Produktion von spezifisch bindenden Antikörpern zu kombinieren (G.Köhler, C. Milstein, 1975). Dabei werden Mäuse z.B. mit Tumorzellen oder mit bekannten tumorspezifischen Peptiden immunisiert und dann die Antikörper produzierenden Lymphozyten der Milz gewonnen. Diese werden mit Myelomzellen zu Hybridomzellen fusioniert und die verschiedenen Hybridom Klone werden gezüchtet. Die so produzierten monoklonalen Antikörper werden dann auf Bindung an Tumorgewebe und auf Kreuzreaktionen mit gesundem Gewebe untersucht.

Erste Erfolge der Radioimmuntherapie haben die Anwendung der Radioimmunkonjugate aus  $\beta$ -Strahlern und dem CD20 Antikörper Rituximab bei der Lymphomtherapie erzielt. Besonders bei dem niedrigmalignen follikulären Non-Hodgkin-Lymphom und dem Mantelzelllymphom scheint Radioimmuntherapie mit Yttrium-90 ( $^{90}\text{Y}$ ) oder Iod-131 ( $^{131}\text{I}$ ) an Rituximab gekoppelt einer Chemotherapie überlegen zu sein. Klinische Zulassungen (Zevalin bzw. Bexxar) sind in einigen Ländern bereits erfolgt (Wagner et al. 2002).

Um einen kurativen Ansatz zu verfolgen, müssen alle teilungsfähigen Tumorzellen im Körper abgetötet werden. Bei der Anwendung von Betastrahlern mit Reichweiten der Betapartikel von 50 bis 200 Zelldurchmessern können Tumorabsiedlungen aus mehreren tausend Zellen effektiv abgetötet werden. Einzelne Zellen hingegen überleben mit hoher Wahrscheinlichkeit die Therapie, auch wenn Radioimmunkonjugate an die Zelle gebunden sind. Wenn diese

Einzelzellen nicht von dem Immunsystem erkannt werden, können sie der Ursprung von Tumorrezidiven sein. Folglich können trotz erster Erfolge dieses neuen Therapieansatzes Einzelzellen und kleine Tumorzellkluster mit beta-emittierenden Radioisotopen nicht effektiv behandelt werden. Dies ist aber eine Voraussetzung um eine Heilung zu erzielen.

Alpha-Partikel haben im Gegensatz zu beta-Partikeln eine sehr kurze Reichweite von 2 – 4 Zelldurchmessern und einen sehr viel höheren linearen Energietransfer. Das bedeutet, dass entlang der kurzen Pfadlänge eine hohe Energie auf das Gewebe übertragen wird. Damit können Zellen durch nur 3 bis 5 alpha-Partikel, die den Zellkern durchqueren, abgetötet werden (Macklis et al. 1992).

Der lineare Energietransfer von alpha-Partikeln beträgt ca. 100 keV/μm, so dass sie ihre kinetische Energie von 4 – 8 MeV auf einer Strecke von 30 bis 90 μm abgeben. Aufgrund der dicht aufeinander folgenden Ionisationen ist z.B. der Anteil an induzierten Doppelstrangbrüchen in der zellulären DNA höher als bei beta-Partikeln. Aufgrund dieses hohen Anteils an Doppelstrangbrüchen ist die Wirkung von alpha-Partikeln unabhängig vom Zellzyklus und des Sauerstoffpartialdruckes im Tumorgewebe (Hall 1994). Viele der alpha-Emitter sind schwere Isotope mit Massenzahlen über 200u und mit Halbwertszeiten von einigen Jahren (z.B.  $^{228}\text{Th}$ ) bis zu einigen Jahrtausenden (z.B.  $^{238}\text{U}$ ). Diese langen Halbwertszeiten hätte bei der Anwendung einen hohen Anteil an lange nach Behandlung bestehender Radioaktivität. Diese Restradioaktivität würde viel zu hohe Folgeschäden, sowie Umweltkontaminationen nach sich ziehen. Dagegen gibt es aber ungefähr 8 alpha-emittierende Isotope mit Halbwertszeiten zwischen 45 Minuten ( $^{213}\text{Bi}$ ) und 11 Tagen ( $^{223}\text{Ra}$ ), die für die Radioimmuntherapie in Frage kommen (Imam 2001).

Alpha-Emitter haben zur Zeit keine Routine-Anwendungsgebiete in der Medizin und ihre Anwendung ist auf die Forschung beschränkt. Erste klinische Versuche sind aber schon seit 1996 für Bismuth-213 ( $^{213}\text{Bi}$ ;  $t_{1/2} = 45$  min) in Durchführung. Versuche mit diesem sehr kurzlebigen Isotop sind mit hohem logistischen Aufwand verbunden und Fallzahlen dementsprechend klein, so dass noch kaum Aussagen zu Erfolg und Verträglichkeit gemacht werden konnten. Es haben sich aber erste Hinweise auf eine gute Verträglichkeit von  $^{213}\text{Bi}$  erwiesen und die systemische Strahlenwirkung beschränkte sich in den ersten klinischen zur Behandlung akuter Leukämien auf die Depression des Knochenmarks. Diese Knochenmarksdepression war in dieser Studie das gewünschte Therapieziel, da die meisten Zellen, die das Zielantigen CD33 exprimierten im Knochenmark lokalisiert waren (Sgouros et al. 1999).

Actinium-225 ( $^{225}\text{Ac}$ ;  $t_{1/2} = 10 \text{ d}$ ) ist das Mutternuklid von  $^{213}\text{Bi}$  und ist mit vier alpha-Emissionen, der potenteste verfügbare alpha-Emitter. Nach dem Zerfall des Mutternuklids  $^{225}\text{Ac}$  zerfallen die alpha-emittierenden Töchter Franzium-221 ( $^{221}\text{Fr}$ ), Astat-217 ( $^{217}\text{At}$ ) und Bismuth-213 ( $^{213}\text{Bi}$ ) innerhalb von 51 min (siehe Abbildung 2).

Versuche an Primaten wurden mit Radioimmunkonjugaten aus  $^{225}\text{Ac}$  gekoppelt an die monoklonalen Antikörper HuM195 und 3F8 durchgeführt. Dabei hat sich gezeigt, dass Aktivitäten bis zu 185 kBq/kg i.v. ohne Nebenwirkungen toleriert werden (McDevitt et al. 2001).

Das nicht natürlich vorkommende Terbium-149 ( $^{149}\text{Tb}$ ;  $t_{1/2} = 4,1 \text{ h}$ ) wurde bisher nur an wenigen Instituten an Zellmodellen und in in vivo Nacktmaus Modellen untersucht (Allen 1999). Alpha-Partikel die von  $^{149}\text{Tb}$  emittiert werden unterscheiden sich von allen anderen Alpha-Partikeln, die für Radioimmuntherapie in Betracht gezogen werden, durch ihre niedrige Partikel Energie von 4 MeV.

Ein weiterer alpha-Strahler, der in klinischen Studien untersucht wird ist das Halogen Astat-211 ( $^{211}\text{At}$ ;  $t_{1/2} = 7,2 \text{ h}$ ). Die stabile Kopplung dieses alpha-Emitters an Anti-Tenascin Antikörper ermöglicht die intraoperative Applikation bei Glioblastomen (Zalutsky et al. 2001). Die chemischen und biologischen Eigenschaften von Halogenen unterscheiden sich aber grundlegend von Metallen.

Über Langzeitwirkungen von alpha-Emittern liegen Untersuchungen an Patienten vor, bei denen thoriumhaltiges Kontrastmittel (Thorostrast) für diagnostische Röntgenuntersuchungen appliziert wurde. Die niedrige Aktivität hatte man als vernachlässigbar angesehen und Thorostrast bei vielen Patienten ohne maligne Grunderkrankung eingesetzt. Aufgrund einer Erhöhung der Inzidenz von akuten myeloischen Leukämien in dieser Patientengruppe auf bis zum achtfachen der Normalbevölkerung wurde Thorostrast vom Markt genommen (van Kaick et al. 1986). Bei der Behandlung von Malignomen besteht aber zur Zeit bei fast allen Therapieformen ein solches Risiko, dass zugunsten einer erfolgreichen Behandlung in Kauf genommen werden muss.

## 2 Ziele

Die in dieser Arbeit zu untersuchenden alpha-emittierenden Isotope waren  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{149}\text{Tb}$  und  $^{225}\text{Ac}$ . Die stabile Bindung dieser Metallatome an monoklonale Antikörper erfolgte mit Hilfe bifunktioneller Chelatkomplexe. Diese bestehen aus einer Thioharnstoffgruppe (SCN), die an die freie Aminogruppe ( $\text{NH}_2$ ) der Aminosäure Lysin von Proteinen bindet und dem eigentlichen Chelat, welches 3-wertige Isotope chelatiert.

Die Antigene d9 E-Cadherin, Gangliosid GD<sub>2</sub> und CD33 sind die Bindungsstellen der in dieser Arbeit untersuchten monoklonalen Antikörper. D9 E-Cadherin ist ein Antigen des diffusen Magenkarzinoms, Gangliosid GD<sub>2</sub> wird von Neuroblastomen, und CD33 von myeloischen Leukämiezellen exprimiert. Im Verlauf dieser drei unterschiedlichen Krankheiten kommt es zu Phasen bei denen Disseminierung und Bildung von Tumorzellnestern mit herkömmlichen Therapien nicht wirkungsvoll genug verhindert werden können und Radioimmuntherapie mit alpha-Emittern ein neuer vielversprechender Ansatz ist. Es besteht die Hoffnung, dass Heilungsraten durch alpha-Radioimmuntherapie, besonders bei Anwendung im Stadium der minimal residual disease erhöht werden.

Ziel der alpha-Radioimmuntherapie ist es eine ausreichend hohe Strahlendosis in allen Tumorzellen zu erreichen, so dass eine Eradikation des Tumors mit tolerierbaren Nebenwirkungen möglich wird. Die Energiedosis im Tumor im Vergleich zu Normalgewebe wird wesentlich von der Biodistribution des Radioimmunkonjugates beeinflusst. Diese ist wiederum abhängig von Perfusion des Tumors, Penetration der Radioimmunkonjugate durch Blutgefäße, Diffusion in das Tumorinterstitium und Bindung sowie Retention an den Tumorzellen. Aber auch auf zellulärer Ebene wird die Energiedosis auf Tumorgewebe von Faktoren wie Internalisierung, Affinität oder Anzahl der Bindungsstellen beeinflusst. Auch die physikalischen Eigenschaften der Nuklide wie Partikelenergie, Halbwertszeit und chemisches Verhalten beeinflussen das biologische Verhalten sowie die Toxizität der Radioimmunkonjugate.

An einfachen Zellmodellen sollten in dieser Arbeit wesentliche Eigenschaften verschiedener alpha-Radioimmunkonjugate untersucht werden. Die einzelnen Untersuchungen wurden mit folgenden Fragestellungen durchgeführt:

Einflussgrößen auf Biodistribution und Retention der Aktivität:

- Affinität der Antikörper
- Anzahl der Bindungsstellen auf den Tumorzellen
- Internalisierung der Radioimmunkonjugate

Einflussgrößen auf die Strahlendosis der Tumorzellkerne

- Reichweite der alpha-Partikel
- LET der alpha-Partikel
- Affinität der Antikörper

- Anzahl der Bindungsstellen auf den Tumorzellen
- Internalisierung der Radioimmunkonjugate
- Verteilung der Radioimmunkonjugate in Tumorzellklustern

Einflussgrößen auf die Zytotoxizität

- Apoptoseinduktion
- Chromosomenschäden
- Strahlensensibilität

Diese Faktoren sind Eigenschaften der Zellmodelle und der Radioimmunkonjugate, die sich messen aber noch nicht bewerten lassen. Die Bewertung dieser Faktoren kann z.B. nach Therapiestudien in Tiermodellen erfolgen. Um eine Bewertung auch in vitro zu erreichen sollten in vitro Zytotoxizitätsstudien durchgeführt werden. In diesen in vitro Studien sollte die Zytotoxizität der alpha-Radioimmunkonjugate an Zellen mit Antikörperbindung und an den gleichen Zellen ohne Antikörperbindung gemessen und verglichen werden.

### **3 Grundlagen bezüglich der Nuklide und Krankheitsbilder**

#### **3.1 Klinische Anwendung von beta-emittierenden Nukliden**

Beta Strahlen sind Elektronen, die beim radioaktiven Zerfall aus dem Kern emittiert werden. Aufgrund ihrer 7000 mal geringeren Masse von 0,511 MeV ( $9.1 \cdot 10^{-31}$  kg) verglichen mit alpha-Partikeln geben beta-Strahlen ihre kinetische Energie auf einer ca. 50 mal längeren Strecke ab. Zusätzlich zu dem emittierten Elektron wird ein Neutrino aus dem zerfallenden Atomkern freigesetzt. Die Zerfallsenergie verteilt sich folglich auf die kinetische Energie von zwei Partikeln. Da Neutrinos fast keine Wechselwirkung mit Materie zeigen, ist diese kinetische Energie für biologische Anwendungen verloren. Die Verteilung der kinetischen Energie zwischen beiden Partikeln erfolgt so, dass die mittlere Energie der Betapartikel bei ca. 1/3 der maximalen Energie liegt. Nur ein kleiner Teil der beta-Partikel hat folglich die maximale Energie.

Größte Erfahrungen in der Anwendung liegen mit dem beta-Emitter  $^{131}\text{I}$  vor. Natives  $^{131}\text{I}$  wird in der Therapie von Schilddrüsenautonomen und Schilddrüsenkarzinomen eingesetzt und es liegen Nachbeobachtungszeiten von über 30 Jahren vor. Langzeitschäden wie

sekundäre Karzinome oder Lymphome konnten in den klinisch verwendeten Aktivitäten (bis max. 3,7 GBq, nur in Einzelfällen mehr) bis jetzt nicht nachgewiesen werden (Schlumberger et al. 1996). Die Anwendung von Radioimmuntherapie mit den Betastrahlern  $^{131}\text{I}$  oder  $^{90}\text{Y}$  ( $^{90}\text{Y}$ ;  $t_{1/2} = 2,7 \text{ d}$ ) wird in mehreren klinischen Studien, hauptsächlich zur Therapie hämatopoetischer Malignome, untersucht (Wilder et al. 1996).  $^{90}\text{Y}$  unterscheidet sich von  $^{131}\text{I}$  vor allem durch das Fehlen von Gammaemissionen und der höheren Partikel Energie (2,3 MeV versus 0,6 MeV). Das Fehlen von Gammaemission ist aus Strahlenschutzgründen vorteilhaft und macht eine ambulante Applikation von  $^{90}\text{Y}$  Radioimmunkonjugaten möglich. Nachteilig aber ist, dass eine genaue Messung der Dosisverteilung mittels nuklearmedizinischer Diagnostik nicht möglich ist. Im Vergleich zu alpha-Emittern beruht ein Großteil der Wirkung auf Kreuzfeuereffekt von Isotopen, die an Nachbarzellen gebunden sind. Beta-Emitter eignen sich deshalb zur Therapie von größeren Tumormassen. Es ist auch nicht unbedingt erforderlich, dass alle Zellen in einem Tumor eine hohe Anzahl von Bindungsstellen exprimieren.

Am Memorial Sloan Kettering Cancer Center in New York wird zur Zeit Radioimmuntherapie mit dem in dieser Arbeit untersuchten Anti-GD<sub>2</sub> Antikörper durchgeführt. Dieser wird gekoppelt an  $^{131}\text{I}$  bei Neuroblastomen des Stadiums IV eingesetzt (Kramer et al. 2000).

Das betastrahlende Isotop Lutetium 177 ( $^{177}\text{Lu}$ ,  $t_{1/2} = 6,7\text{d}$ ) hat in letzter Zeit durch seine sehr niedrige beta-Energie Beachtung gefunden. Diese beta-Partikel haben nur eine Reichweite von 0,67 mm in Gewebe und im Tiermodell hat sich dadurch ein Vorteil, besonders bei kleinen Tumoren gezeigt (de Jong et al. 2001).

### **3.2 Alpha-Zerfall**

Alpha-Partikel sind Heliumkerne mit einer Ruhemasse von ca. 4 GeV ( $6,7 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$ ), die von einigen Isotopen hoher Massenzahl emittiert werden. Da die Coulomb'sche Anziehung zwischen einem alpha-Partikel und einem Atomkern ca. 26 MeV beträgt, kann die Emission von alpha-Partikeln mit typischen Energien von 4 – 8 MeV mit klassischer Physik nicht erklärt werden. Es besteht eine Energiebarriere von 18-22 MeV, die den alpha-Zerfall verhindert. Das Zustandekommen des alpha-Zerfalls kann durch den quantenmechanischen Tunneleffekt erklärt werden. Dieser Effekt hat zur Folge, dass mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit diese Energiebarriere überwunden werden kann und das alpha-Partikel den Kern verlässt. Dabei hat das alpha-Partikel für eine kurze Zeit eine ausreichend hohe Energie um den Kern zu verlassen (Heisenberg'sche Unschärfe Relation). Bei einer hohen

Partikelenergie ist die Energiebarriere geringer und folglich die Wahrscheinlichkeit größer dass der alpha-Zerfall zustande kommt. Diese Wahrscheinlichkeit steht im Zusammenhang mit den Halbwertszeiten der Isotope (Rohlf 1994). Bei sehr geringen alpha-Energien ( $< 4$  MeV) haben die Isotope oft Halbwertszeiten von mehreren tausend Jahren und bei alpha-Energien über 8 MeV findet man Halbwertszeiten im  $\mu\text{s}$  Bereich. Ein Element mit einer kurzen Halbwertszeit wie  $^{149}\text{Tb}$  und einer Emission von niederenergetischen alpha-Partikeln kann aus diesem Grunde keinen 100% tigen alpha-Zerfall zeigen.

### **3.3 Tumorkrankheiten, Klinik, bisherige Therapie und möglicher Stellenwert der untersuchten Radioimmunkonjugate**

#### **3.3.1 Magenkarzinom**

Magenkarzinome haben in Deutschland eine Inzidenz von 20/100000. Die Hälfte dieser Tumoren sind diffuse Magenkarzinome in der Klassifikation nach Laurén. Die andere Hälfte wird als intestinal wachsend klassifiziert und ist meist schon makroskopisch gut abgrenzbar von umliegendem gesunden Gewebe.

Das diffuse Magenkarzinom breitet sich früh in die Peritonealhöhle aus und verursacht dort eine disseminierte Karzinomatose. Diese Karzinomatose ist über den gesamten Krankheitsverlauf ein dominierendes Problem. Es kommt dadurch zu Aszites und Peritonitis, die die Lebensqualität der Patienten stark beeinflussen. Beim Auftreten von solchen Absiedlungen wird eine Resektion des Magens nur bei Passagestörungen ohne kurative Intention durchgeführt. Auch bei kurativen Magenoperationen, bei denen R0-reseziert wurde, treten bei bis zu 80% der Patienten Rezidive auf, so dass auch in der Nachbehandlung neue Therapieansätze notwendig sind (Siewert et al. 1999).

Mutationen in Zell-Zell Kontakt Genen wie dem E-Cadherin Gen kommen sowohl sporadisch als auch hereditär vor (Chun et al. 2001). In ca. 20% der Fälle findet man Mutationen im Gen für das Adhäsionsmolekül E-Cadherin, welche mit einer frühen Absiedlung von Tumorzellen assoziiert sind (Becker et al. 1995) (Handschuh et al. 1999). Eine Punktmutation, welche dazu führt, dass die splice site für das Exon9 eliminiert wird, verursacht die Nichttranslation dieses Exons. Es wird ein strukturverändertes E-Cadherin Molekül exprimiert, dem die Aminosäuresequenz des Exons9 fehlt (d9 E-Cad). Dieses d9 E-Cad wurde in ca. 10% der diffusen Magenkarzinome gefunden (Becker et al. 1999). Der monoklonale Antikörper 6H8 bindet spezifisch an dieses d9 E-Cad ohne Kreuzreaktion mit gesunden Geweben und Biodistributionsstudien in xenotransplantierten Nacktmäusen zeigte eine hochspezifische

Tumoranreicherung. Diese Tumoranreicherung konnte dazu genutzt werden um den alpha-Emitter  $^{213}\text{Bi}$  durch Kopplung an den Antikörper in disseminiertem Tumorgewebe zu akkumulieren (Senekowitsch-Schmidtke et al. 2001).

Das Konzept vor einer Operation durch Chemotherapie und/oder Bestrahlung die Tumorausdehnung so zu reduzieren, dass eine R0 Operation möglich wird, hat die Prognose von fortgeschrittenen Karzinomen schon verbessert (Siewert et al. 1999). Eine erfolgreiche Behandlungsmöglichkeit von Peritonealkarzinosen würde die Prognose wahrscheinlich weiter verbessern. Die klinischen Probleme, die in weiter fortgeschrittenem Stadium durch das Auftreten von Aszites auftreten, könnten durch eine effektive Radioimmuntherapie möglicherweise auch gelindert werden. Es bestehen folglich berechtigte Hoffnungen, dass die alpha-Radioimmuntherapie sowohl im kurativen Ansatz als auch bei palliativer Behandlung einen Beitrag leisten kann.

### 3.3.2 Neuroblastom

Neuroblastome treten meist im frühen Kindesalter auf und sind die häufigsten extrakraniellen soliden Tumoren des Kindesalters. Das Neuroblastom ist ein Tumor des sympathischen Nervengewebes, des Nebennierenmarks und der paravertebralen Ganglien. Bei Kindern unter einem Jahr differenziert sich der Tumor oft in nicht proliferierendes Gewebe und folglich ist die Prognose sehr gut (siehe Tabelle 1). Therapieresistenzen nach anfänglicher Chemosensibilität sind besonders in höherem Kindesalter häufig und ein Hauptgrund für die dann schlechte Prognose. Die fortgeschrittenen Stadien 3 und 4 haben eine sehr schlechte Prognose mit weniger als 25% Remissionen, die länger als 5 Jahre überdauern (Cheung et al. 1998). Bei einer auftretenden Manifestation des Tumors an den Leptomeningen ist oft ein lebensbedrohliches Endstadium ohne weitere Therapieoptionen erreicht. Chemotherapeutika erreichen im Liquor oft keine ausreichenden Konzentrationen und Bestrahlung ist aufgrund der Nähe zu empfindlichem Nervengewebe nicht möglich. Deshalb ist die intrathekale Applikation von Chemotherapeutika oder monoklonalen Antikörper in manchen Fällen eine weitere Therapieoption (Ruggiero et al. 2001) (Moseley et al. 1990).

**Tabelle 1** Überleben bei Neuroblastom in Abhängigkeit von Alter und Stadium. Ergebnisse der Therapiestudien NB 79-90 der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie für 615 Kinder < 1 Jahr und 1028 Kinder < 1 Jahr (Aus von Harnack Kinderheilkunde, 11. Aufl. Springer Verlag, 2000)

Alter	Stadium	Anteil der Neuroblastome in der Altersgruppe [%]	5-Jahresüberlebensrate [%]
-------	---------	--	----------------------------

< 1 Jahr	I - III	61	95
	IV	13	53
	IVS	26	79
> 1 Jahr	I - III	45	76
	IV	55	20

3F8 ist ein muriner Antikörper der an Tumorzellen des neuroektodermen Ursprungs bindet. Das Ziel Epitop ist der Zellmembranbestandteil Gangliosid GD<sub>2</sub>, welches mit bis zu mehreren Millionen Molekülen pro Zelle exprimiert ist. Phase I Versuche mit nativen Anti-GD<sub>2</sub> Antikörpern brachten bei z.B. Melanomen bei Erwachsenen keinen Erfolg (Murray et al. 1994). Trotz der Nebenwirkungen wie starke Schmerzen und Parästhesien ist aber die Behandlung des Neuroblastoms im Kindesalter mit Anti-Gangliosid GD<sub>2</sub> Antikörper eine Option, die weiterhin untersucht wird (Yu et al. 1998).

Da die Tumorzellen oft wenige Zelldurchmesser dicke Schichten auf den Leptomeningen bilden und große Moleküle wie Antikörper nicht weit in das Gehirn diffundieren, bietet sich eine intrathekal applizierte Radioimmuntherapie mit alpha-Emittern an 3F8 gekoppelt an. Da der Antikörper 3F8 dann als Transportmolekül verwendet wird, könnte mit niedrigeren Konzentrationen gearbeitet werden, was die Antikörper spezifischen Nebenwirkungen eventuell einschränkt.

### 3.3.3 Akute myeloische Leukämie

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine Erkrankung des blutbildenden Systems und hat in Deutschland eine Inzidenz von 2,3/100000 mit einem medianen Erkrankungsalter von über 60 (Lowenberg et al. 1999). Die AML ist ein sogenannter flüssiger Tumor, d.h. er manifestiert sich in Einzelzellwachstum, welches das gesamte blutbildende und –transportierende System betrifft.

Akute myeloische Leukämien sind ein häufiger Zweitumor der durch die notwendige aggressive Behandlung eines anderen Malignoms induziert wurde. Trotz gutem Ansprechen auf mehrere Chemotherapeutika können sich Resistenzen entwickeln, die neue Therapieansätze erforderlich machen.

Die MIC – Klassifikation der AML beinhaltet neben morphologischen Kriterien auch molekularbiologische Veränderungen wie z.B. Gentranslokationen. Die bekannten

genetischen Veränderungen können mittels PCR detektiert werden und es gelingt so eine Tumorzelle unter 10000 normalen Zellen im Blut bzw. Knochenmark nachzuweisen. Dabei wurde z.B. bei der t(15;17) Translokation (Translokation des Retinsäurerezeptors) eine starke Korrelation von minimal residual disease mit dem Auftreten von Rezidiven gefunden (Jurcic 2001). Eine geringe Anzahl von Tumorzellen – die meist nicht nachweisbar sind – sind die Ursache für Therapiefehlschläge. Das Ziel einer kurativen Therapie muss es sein diese wenigen Tumorzellen bei tolerierbaren Nebenwirkungen sicher abzutöten.

Der Antikörper HuM195 bindet an CD33, welches nur auf frühen Stammzellen der myeloischen Reihe physiologisch exprimiert wird, und ist damit geeignet alpha-Emitter an einzelne Tumorzellen zu transportieren. Bei einer solchen Therapie könnten auch hohe Aktivitäten von alpha-Emittern eingesetzt werden, da die Organtoxizität hauptsächlich das Knochenmark betreffen würde. Bei Zerstörung des Knochenmarks ist es dann möglich Knochenmark zu transplantieren.

HuM195 ist ein humanisierter Antikörper, der sowohl nativ als auch mit den Nukliden  $^{90}\text{Y}$  und  $^{213}\text{Bi}$  in klinischen Studien zur Behandlung der akuten myeloischen Leukämie (AML) eingesetzt wird (Sgouros et al. 1999).

## **4 Material**

### **4.1 Chemikalien und Geräte**

Skatron cell harvester, Skatron, Lierbyen, Norway

FACS BecktonDickinson , San José, Californien, USA

HPLC Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA

Gamma counter, Packard Cobra Gamma Counter, Packard Instrument Co., Inc., Meriden, CT

Gamma counter TYP 1480 Wizard TM 3, Wallac, Turku, Finnland

Ambis gas ionization detector, Ambis 4000, Ambis Inc., San Diego, CA

Capintec/ Squibb CRC-17 Radioisotope Calibrator, Squibb, Princeton, NJ

Liquid Scintillation counter 1414, Wallac, Turku, Finnland

Zellkulturbedarf, BioRad Laboratorys Hercules, CA / Greiner Labortechnik, Frickenhausen

Zellkulturmedien, Seromed Biochrom KG, Berlin

Fetales Kälberserum (FCS), Life Technologies GmbH, Karlsruhe

PBS-Puffer, Hank's Puffer, Merck, Darmstadt

Chemikalien zur Radionuklidmarkierung, Sigma-Aldich Chemical Co., Inc., Milwaukee, WI

Membranfiltrerröhrchen Millipore, Bedford, MA

Instant thin layer chromatography (ITLC), Gelman Science Inc., Ann Arbor, MI

CHX-A-DTPA Chelat, National Institute of Health, Bethesda, MD

HEHA Chelat, National Institute of Health Bethesda, MD

DOTA Chelat, ITCB-DOTA Macrocyclics, Richardson, TX

Tunel Assay, DNA fragmentation kit, Clontech Laboratories, Palo Alto, CA

Tunel Assay, In situ cell death detection kit, Fluorescein, Boehringer Mannheim

## 4.2 Verwendete Nuklide

Zur Quantifizierung der Aktivitäten kann bei den meisten Nukliden eine Gammaemission herangezogen werden. In Tabelle 2 sind Gammalinien von häufig verwendeten Isotopen, sowie die Gammalinien der in dieser Arbeit untersuchten alpha-Emitter aufgelistet.

Nuklide ohne Gammaemission, wie  $^3\text{H}$  und  $^{225}\text{Ac}$ , wurden mittels Flüssigszintillation gemessen.

**Tabelle 2** Charakteristische Gammalinien, die zur Messung der Aktivität mittels gamma-Counter herangezogen werden können

Nuklid	In-111	Bi-213	Tb-149	Fr-221
Gammalinien [keV]	174/274	444	165/352	218

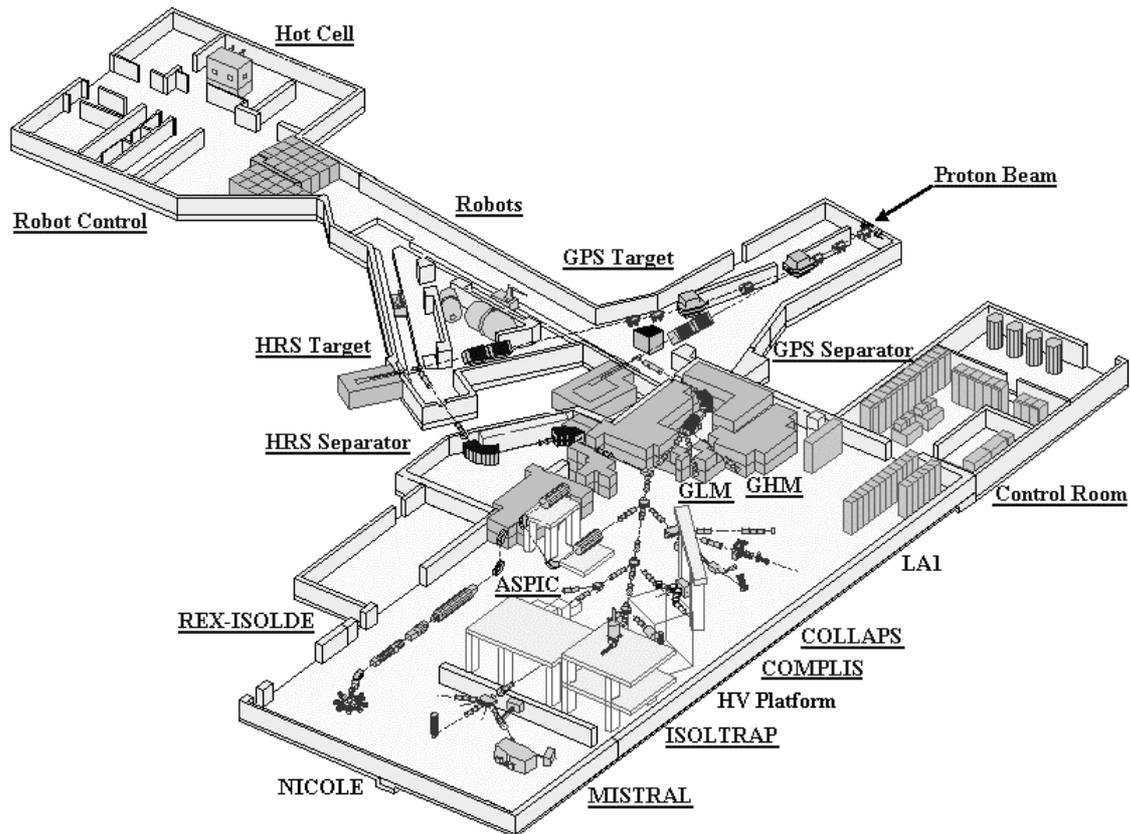
### 4.2.1 Terbium-149 ( $^{149}\text{Tb}$ )

$^{149}\text{Tb}$  ist aufgrund des geringen Anteils an alpha-Strahlung (17%) und der sehr eingeschränkten Verfügbarkeit in nur sehr wenigen Studien untersucht. Einige theoretische Arbeiten sagen jedoch signifikante Vorteile aufgrund der geringen Partikel Energie vorher (Charlton et al. 1998). Die zur Zeit einzige Möglichkeit  $^{149}\text{Tb}$  in ausreichender Aktivität herzustellen bietet die ISOLDE Einrichtung des CERN in Genf. Der Projektgruppe 'targeted radioimmunotherapy' wurden in den vergangenen Jahren Strahlzeiten von 2 bis 5 Tagen pro Jahr ermöglicht. Somit war es in dieser Arbeit nicht möglich ausführlichere Vergleiche zu anderen Nukliden anzustellen. Theoretisch besteht aber auch die Möglichkeit  $^{149}\text{Tb}$  mit modernen Anlagen, die schwere Teilchen wie  $^{12}\text{C}$  beschleunigen können, durch Reaktionen

wie  $^{141}\text{Pr}(^{12}\text{C},5\text{n})^{149}\text{Tb}$  oder  $^{142}\text{Nd}(^{12}\text{C},4\text{n})^{149}\text{Dy} \rightarrow ^{149}\text{Tb}$  herzustellen (B-J Allen, CERN-PPE/96-127).

ISOLDE steht für Isotope Separation On Line, eine Technik die es ermöglicht Kernreaktionsprodukte nach ihrer Masse zu trennen.

Bei der Herstellung von  $^{149}\text{Tb}$  an der ISOLDE Einrichtung wurde eine Spallationsreaktion von Tantal, welches mit beschleunigten Protonen beschossen wird, genutzt. Die Spallationsreaktion ist eine Kernreaktion bei der durch den Beschuss von schweren Kernen diese in mehrere Bruchstücke zerfallen und dabei ein breites Spektrum an Isotopen erzeugen. Ein Linearbeschleuniger liefert einen Protonenstrahl, der von dem Protonen Synchrotron Booster (PSB) auf eine Energie von 1.4 MeV beschleunigt wird. Der so erzeugte Protonenstrahl ist ein gepulster Strahl mit hoch intensiven Pulsen von nur 2,4  $\mu\text{s}$  Dauer, die alle 1,2 bis 2,4 s aufeinander folgen. Die Zeit zwischen den Einzelimpulsen erlaubt die entstehenden Isotope von dem Target weg zu beschleunigen. Trotzdem erreicht der Protonenstrahl eine Intensität von 2,1  $\mu\text{A}$ . Der Protonenstrahl löst beim Auftreffen auf das Tantal-Target Spallationsreaktionen aus, bei denen ein Grossteil der existierenden Lanthanide entstehen. Das Tantal-Target hat eine Temperatur von 2400  $^{\circ}\text{C}$  und die entstehenden Isotope werden sofort ionisiert. Diese Ionen werden von einer 60 keV Spannung beschleunigt und in den Massenseparator eingespeist. Zur Trennung von Isotopen nach Massenzahl ist der General Purpose Separator (GPS) ausreichend, der so eingestellt wurde, dass er alle Isotope der Massenzahl 149 am Fänger liefert (Kugler 2000).



**Abbildung 1** Layout der Isolde Anlage am CERN

Der Protonenstrahl (Proton Beam) trifft auf das GPS Target (Tantal für die Produktion von Lanthaniden) und die entstehenden Isotope werden von dem General Purpose Spectrometer (GPS) nach Massenzahl getrennt. Aus Strahlenschutzgründen ist der Protonenstrahl sowie die Targets 8 m unter der Erde und Manipulationen wie der Wechsel von Targets können ferngesteuert vorgenommen werden (Robots)

$^{149}\text{Tb}$  wurde mittels Kationenaustauschchromatographie von Verunreinigungen wie  $^{149}\text{Gd}$  oder  $^{149}\text{Eu}$  und Oxidationsprodukten ( $^{133}\text{CeO}^+$ ,  $^{133}\text{LaO}^+$ ) getrennt. Dazu wurden die Reaktionsprodukte in 1 M HCl gelöst und auf eine Aminex A5 Säule gegeben. Die verschiedenen Elemente wurden mit  $\alpha$ -Hydroxyisobutyrsäure eluiert (Beyer 2002).

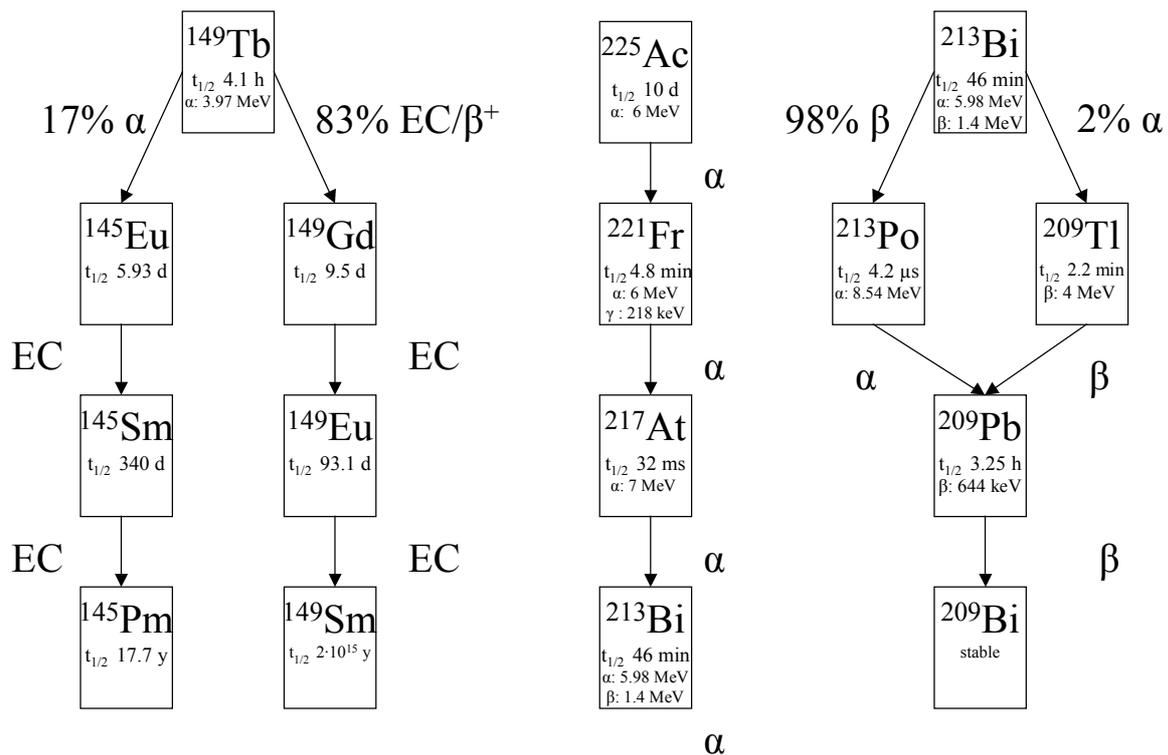
Eventuell ist mittels PET Diagnostik die Positronenemission von  $^{149}\text{Tb}$  nutzbar um die Strahlendosis bei Einsatz der  $^{149}\text{Tb}$  Therapie auf Tumorgewebe genau zu bestimmen. Die Messung der von  $^{149}\text{Tb}$  emittierten Positronen wird aber erstens durch den geringen Prozentsatz an Zerfällen mit Positronenemission und zweitens durch eine Gammalinie von 511 keV erschwert. Diese störende Gammalinie, welche die Bestimmung der Koinzidenz erschwert, kann aber eventuell durch verbesserte Detektoren und/oder genauere Bildrekonstruktionsalgorithmen bei der Auswertung berücksichtigt werden.

#### 4.2.2 Actinium 225 ( $^{225}\text{Ac}$ )

$^{225}\text{Ac}$  ist aufgrund der langen Halbwertszeiten und einer komplizierteren Chelatierung wenig untersucht. Die lange Halbwertszeit und die potentielle Toxizität bei Kontaminationen erfordert eine hohe Erfahrung mit radioaktiven Nukliden. Die in dieser Arbeit verwendete sogenannte Zweischnittmarkierung mittels DOTA erlaubt es erstmals stabile  $^{225}\text{Ac}$ -Immunkonjugate herzustellen, die auch für klinische Anwendungen geeignet sein könnten (McDevitt et al. 2001). Zur Zeit wird  $^{225}\text{Ac}$  hauptsächlich aus einem  $^{229}\text{Th}/^{225}\text{Ac}$  Generator gewonnen. Das Mutternuklid  $^{229}\text{Th}$  kann in höheren Mengen aus Kernwaffenabfall ( $^{233}\text{U}$ ) gewonnen werden. Dabei ist es zum einen schwierig mit großen Mengen  $^{233}\text{U}$  zu arbeiten, da es eine kritische Masse nicht überschreiten darf und zum anderen ist das gewonnene  $^{229}\text{Th}$  mit  $^{228}\text{Th}$  verunreinigt. Um reines  $^{229}\text{Th}$  zu erhalten, muss das Gemisch  $^{229}\text{Th}/^{228}\text{Th}$  10 bis 20 Jahre gelagert werden.  $^{228}\text{Th}$  mit einer Halbwertszeit von 2 Jahren ist dann im Gegensatz zu  $^{229}\text{Th}$  vollständig zerfallen.

Um diese Schwierigkeiten zu umgehen werden am Kernforschungszentrum in Karlsruhe Versuche zur Gewinnung von  $^{225}\text{Ac}$  mittels Bestrahlung von  $^{226}\text{Ra}$  mit Protonen im Zyklotron durchgeführt (Apostolides et al. 2001).

$^{225}\text{Ac}$  wurde vom Institut für Transurane der Europäischen Kommission in Karlsruhe oder vom Oak Ridge National Laboratory, in Oak Ridge, Tennessee zur Verfügung gestellt.  $^{225}\text{Ac}$  wird dort aus einem  $^{225}\text{Ac}$  Generator eluiert, der aus einer Titanphosphat Säule besteht an die das Mutternuklid  $^{229}\text{Th}$  Oxid adsorbiert ist. Bei jeder Elution können ca. 1,1 GBq  $^{225}\text{Ac}$  gewonnen werden. Nach der Elution mit 0,5 M  $\text{HNO}_3$  müssen die Töchter  $^{225}\text{Ra}$ ,  $^{224}\text{Ra}$  und  $^{225}\text{Ac}$  getrennt werden. Dies geschieht mittels einer Dowex 50 Wx8 Reinigungssäule (McDevitt et al. 1998; Koch 1999).



**Abbildung 2** Zerfallsschemata von Terbium-149 (links), Actinium-225 (mitte) und Bismuth-213 (rechts)

- $^{149}\text{Tb}$  ( $t_{1/2}$  4,1h) zerfällt zu 17% unter alpha-Emission zu Europium-145 und zu 83% unter Elektroneneinfang (mit 7% Positronenemission) zu Gadolinium-149; Europium-145 zerfällt über Samarium-145 zu Prometium-145 und Gadolinium-149 zerfällt über Europium-149 zu Samarium-149
- $^{225}\text{Ac}$  ( $t_{1/2}$  10d) ist das Mutternuklid der 3 alpha-Emitter Franzium-221, Astat-217 und Bismuth-213
- $^{213}\text{Bi}$  ( $t_{1/2}$  46 min) ist zu 98% ein Betastrahler dessen Tochter Polonium-213 mit 4,2  $\mu\text{s}$  Halbwertszeit unter alpha-Emission zu Blei-209 zerfällt, 2% Bismuth-213 zerfallen unter alpha-Emission zu Thallium-209 welches dann auch zu Blei-209 zerfällt, Blei-209 zerfällt unter beta-Emission zu Bismuth-209

### 4.2.3 Bismuth-213 ( $^{213}\text{Bi}$ )

$^{213}\text{Bi}$  ist durch die Verfügbarkeit eines einfach aufgebauten  $^{213}\text{Bi}$  Generators (www.pharmactinium.com, (McDevitt et al. 1999)) der am besten untersuchte alpha-Emitter. Vorteile bei der Herstellung sind die schnelle und zuverlässige Kopplung an Antikörper via CHX-A-DTPA. Die kurze Halbwertszeit verursacht aber einen erheblichen Zeitdruck bei der Anwendung dieses Nuklids und ist allenfalls bei Kontaminationen von Vorteil. Klinische Studien in am MSKCC in New York zeigten eine geringe Toxizität und erfolgreiche

Anreicherung der Radioimmunkonjugate im Tumor. Eine breitere Anwendung, besonders in kontrollierten Studien, wird aber Indikationen für Radioimmunokonjugate mit  $^{213}\text{Bi}$  noch klären müssen. Da aus dem  $^{213}\text{Bi}$  Generator innerhalb weniger Stunden nach Elution wieder die volle Aktivitätsmenge an  $^{213}\text{Bi}$  gewonnen werden kann, können durch mehrmalige Applikation auch hohe Aktivitätsmengen innerhalb eines Tages verabreicht werden. Die limitierenden Faktoren sind neben der Muttersubstanz  $^{225}\text{Ac}$  auch die aufwendige Herstellung des Generators. Unter Einhaltung von strengem Strahlenschutz können hohe Mengen von  $^{225}\text{Ac}$  nur in wenigen Labors verarbeitet werden. Eine zentrale Herstellung des Generators und eine Handhabung in nuklearmedizinischen Einrichtungen wäre aber möglich.

$^{213}\text{Bi}$  war in Form eines solchen  $^{213}\text{Bi}/^{225}\text{Ac}$  Generators verfügbar, der am Institut für Transurane der europäischen Kommission in Karlsruhe hergestellt wurde. Der  $^{213}\text{Bi}$  Generator besteht aus einem Fluoropolymer Schlauch (55 mm x 6,4 mm) in dem 185 bis 740 MBq  $^{225}\text{Ac}$  an ein AGMP50 Harz adsorbiert sind. Elution von  $^{213}\text{Bi}$  wurde mit 600 µl 0,1 M HCL/NaI durchgeführt. Diese Elutionslösung enthält dann einen  $\text{BiI}_5$  Komplex, der  $^{213}\text{Bi}$  sehr schwach bindet und aus dem  $^{213}\text{Bi}$  in anderer Chelate transchelatiert werden kann. Der Generator kann alle 3 h bis 4 h eluiert werden. (McDevitt et al. 1999).

## 4.3 Eingesetzte Antikörper

### 4.3.1 6H8 – Anti-d9-E-cadherin

Anti-d9-E-cadherin (Klon 6H8) ist ein  $\text{IgG}_{2a}$  aus der Ratte, welches an ein strukturverändertes Adhäsionsmolekül bindet, das bei einem Teil der diffusen Magenkarzinome gefunden wurde. Eine Punktmutation im Gen des E-Cadherins verursacht die komplette Deletion des Exons 9 in der Proteintranslation. Dieses mutierte Oberflächenprotein wird von dem Antikörper 6H8 erkannt.

Lou/c Ratten wurden mit einem 13 Aminosäuren Peptid, welches die Fusionsregion der Exone 8 und 10 bei der d9 Mutation umfasst, immunisiert. Die dann hergestellten Hybridomzellen produzieren Antikörper, die sowohl an das Peptid, das bei der Immunisierung verwendet wurde, als auch an Zellen, welche die Mutation d9 E-Cadherin exprimieren, binden. Der Klon 6H8 produziert monoklonale Antikörper mit einer hohen Affinität zum Antigen. Diese Antikörper wurden auf Kreuzreaktivität an mehreren Geweben getestet, ohne dass sich Hinweise auf andere Bindungsstellen ergaben, die eine Kreuzreaktion mit anderem Gewebe bedeuten würden. Somit ist 6H8 einer der ersten Antikörper, dessen

Bindungsstellen auf Tumorzellen nicht nur überexprimiert sind, sondern ausschließlich von den Tumorzellen exprimiert werden (Becker et al. 1999).

#### **4.3.2 3F8 – Anti-Gangliosid GD<sub>2</sub>**

Der murine Antikörper 3F8, der Klasse IgG<sub>3</sub>, bindet an das Membranlipid Gangliosid GD<sub>2</sub>, das bei Zellen neuroektodermen Ursprungs in der Zellmembran vorhanden ist. In dieser Arbeit wurde die zytotoxische Wirkung von <sup>225</sup>Ac-3F8 auf eine Gangliosid GD<sub>2</sub> exprimierende menschliche Neuroblastomzelllinie untersucht, aber auch das kleinzellige Bronchialkarzinom, Melanome und Prostatakarzinome zeichnen sich durch Gangliosid GD<sub>2</sub> als überexprimierten Membranbestandteil aus.

Der Antikörper 3F8 wurde von Cheung et al durch Immunisierung von BALB/C Mäusen mit menschlichen Neuroblastom Zellen entwickelt (Cheung et al. 1985). Immunfluoreszenz an Neuroblastom Biopsien und Operationspräparaten zeigte Reaktivität mit allen untersuchten Neuroblastomen (Saito et al. 1985).

Der Antiidiotyp Antikörper A1G4 (IgG<sub>1</sub>, Ratte) bindet an die Variable Region des Antikörpers 3F8. Dieser Antikörper wurde von Dr. Nai Kong Cheung, MSKCC, New York zur Verfügung gestellt. Mit diesem Antiidiotyp Antikörper wurde die Bindungsfähigkeit des Antikörpers 3F8 überprüft.

#### **4.3.3 HuM-195 – Anti-CD33**

HuM-195 (IgG 1) bindet an das Antigen CD33, auf Vorläuferzellen der myeloischen Hämatopoese. Dieses Oberflächenprotein wird von myeloischen Leukämiezellen, die Eigenschaften von normalen Stammzellen haben, exprimiert. Da Stammzellen physiologischer Weise nur im Knochenmark vorkommen, ist CD33 auf Zellen im peripheren Blut ein tumorspezifisches Antigen. HuM195 ist ein humanisierter Antikörper, der in klinischen Studien zur Behandlung der AML sowohl nativ als auch mit alpha- und beta-Emittern markiert untersucht wird.

Humanisierung und Herstellung des Antikörpers M195 wird von der Firma Protein Design Labs (Mountain View, CA) durchgeführt. M195 ist ein muriner IgG<sub>2a</sub> Antikörper dessen variable Regionen genetisch mit der konstanten Region von humanen IgG<sub>1</sub> fusioniert wurde (Co et al. 1992).

## **4.4 Zelllinien**

### **4.4.1 MDA MB 435S Zellen**

Zur Untersuchung der alpha-Immunkonjugate  $^{149}\text{Tb}$ -6H8 und  $^{213}\text{Bi}$ -6H8 stand keine Magenkarzinomzelllinie, die das d9 mutierte E-Cadherin exprimiert zu Verfügung. Aus diesem Grunde wurde die adhärent wachsende humane Mammakarzinom Zelllinie MDA MB 435S, die weder wildtyp E-Cadherin noch d9 E-Cadherin natürlicherweise exprimiert als Zellmodell verwendet. Durch Transfektion des d9 E-Cadherin Gens gelingt es die Zelllinie zur Expression von  $5 \cdot 10^4$  -  $6 \cdot 10^4$  Antikörperbindungsstellen zu bringen. Durch Transfektion des wt E-Cadherins Gens wurde eine zweite Zelllinie hergestellt, die als Kontrolle diente (Handschuh et al. 1999). Beide genetisch veränderte Zelllinien wurden mit einem Geneticin Resistenzgen co-transfiziert um die Selektion der Antigen exprimierenden Zellen sicherzustellen. Die Zellen wurden in Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM, 4,5 g/l Glucose), welches mit 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 100  $\mu\text{g/ml}$  Streptomycin und 1  $\mu\text{g/ml}$  Geneticin versetzt wurde, kultiviert. Die Generationszeit dieser Zelllinie beträgt 2 Tage.

### **4.4.2 NMB7 Zellen**

NMB7 ist eine humane Neuroblastom Zelllinie die adhärent wächst und eine Generationszeit von 3 bis 4 Tagen hat. Sie exprimiert ca.  $5 \cdot 10^6$  GD<sub>2</sub> Ganglioside pro Zelle an die der Antikörper 3F8 bindet. Als Kulturmedium wurde supplementiertes RPMI 1640 Medium (10% FCS, 100U/ml Penicillin, 100  $\mu\text{l/ml}$  Streptomycin und 2mM L-Glutamin) verwendet (Bergman et al. 1999).

### **4.4.3 HL60 Zellen**

HL60 ist eine humane Leukämie Zelllinie, die mit einer Generationszeit von ca. 24h in Suspension wächst. Die Zellen wurden in RPMI 1640 Medium, supplementiert mit 10% FCS, 2 mM L-Glutamin (die wachstumsbegrenzende Aminosäure), 100U/ml Penicillin und 100  $\mu\text{l/ml}$  Streptomycin, kultiviert. HL60 Zellen exprimieren  $1 \cdot 10^4$  -  $2 \cdot 10^4$  CD33 Moleküle an welche der Antikörper HuM195 bindet. Über die Funktion des CD33 Protein liegen zur Zeit wenig Informationen vor. Es gehört in die Familie der Sialoadhesin-Proteine und ist möglicherweise an Zell-Zell Kommunikation beteiligt (Pagliaro et al. 1998).

## **5 Methoden**

### **5.1 Zellkultur**

Alle Zelllinien wurden unter Standardbedingungen bei 37° C, 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre und 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

#### **5.1.1 Monolayer und Suspension**

Adhärenz wachsende Zellen wurden in 10 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit 30 ml Medium überschichtet kultiviert. Alle 2 Tage wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das überstehende Medium abgesaugt, die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und dann mit 1 mM EDTA in PBS (6ml) inkubiert. Nach 5 min lassen sich die Zellen durch Beklopfen der Kulturflaschen ablösen und nach einem erneuten Waschschrift mit PBS wurden je 3·10<sup>6</sup> Zellen in neue Zellkulturflaschen gesät.

Die in Suspension wachsenden HL60 Zellen wurden in einer Zellkonzentration von 0,5·10<sup>6</sup>/ml bis 2·10<sup>6</sup>/ml gehalten. Dazu wurde die Zellsuspension mit frischem Medium mindestens alle 2 Tage verdünnt.

#### **5.1.2 Spheroide**

Um Spheroide zu generieren wurden ca. 10<sup>7</sup> MDA Zellen in 30 ml Kulturmedium in der Zellkulturflasche mit Hilfe einer Schaukel in ständiger Bewegung gehalten. Dabei hat sich eine Schaukel, die die Zellen mit 5 Kippungen pro Minute bewegt bewährt (Weber et al. 1996). Die Schaukel erreichte einen maximalen Neigungswinkel von 30° und war in einem Brutschrank mit 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit platziert. Eine Erhöhung der Ausbeute wurde durch Verwendung von Zellkulturflaschen speziell für Suspensionszellen erzielt. Nach 3 bis 5 Tagen Inkubation hatten sich meist hunderte von Tumorzellspheroide mit Durchmessern von 150 µm – 200 µm gebildet. Wenn bei noch sehr kleinen Spheroide ein Teil der Zellen adhärenz wuchs, wurde der Spheroide enthaltende Überstand in eine neue Zellkulturflasche überführt. Die Spheroide waren so empfindlich dass sie bei Manipulationen recht schnell desintegrierten und eine genauere Auftrennung nach Größe und Anzahl nicht möglich war.

## 5.2 Radionuklidmarkierung der Antikörper

Die Kopplung der Nuklide an Antikörpern besteht aus zwei Reaktionen. Eine Reaktion ist die kovalente Bindung des Chelates an den Antikörper und die andere Reaktion ist die Chelatierung des Radioisotops. Bei einer sogenannten Einschrittmarkierung werden die Chelate an die Antikörper gekoppelt und erst in einem späteren Schritt die Kopplung des Isotops an den vorchelatierten Antikörper durchgeführt. Dadurch vereinfacht und verkürzt sich die Markierung des Antikörpers und das Nuklid wird nur bei einer der zwei Reaktionen eingesetzt. Bei einer Zweischnittmarkierung wird erst das Nuklid chelatiert und dann erst der Chelatkomplex an den Antikörper gebunden. Bei Isotopen mit einer Halbwertszeit von mehreren Tagen ist es nicht notwendig für jede Anwendung die Radioimmunkonjugate frisch herzustellen und der Zeitfaktor bei der Herstellung spielt deshalb eine untergeordnete Rolle.

### 5.2.1 Radionuklidmarkierung mittels CHX-A-DTPA

In vivo und in vitro Stabilitätsstudien von  $^{88}\text{Y}$  mit den Chelaten CHX-A-DTPA, CHX-B-DTPA (Cyclohexyl-Benzyl-Diethylen-Triamin-Pentaessigsäure) und DOTA an monoklonale Antikörper gebunden, ergaben vergleichbare Stabilität über 17 Tage (in vitro) bzw. 7 Tage (in vivo) für CHX-A-DTPA (<3% release im Serum) und DOTA (keine nachweisbare Freisetzung). Das DOTA Chelat zeigte die höchste Stabilität während CHX-B-DTPA über 20% des Nuklids frei setzte (Camera et al. 1994). Der große Vorteil von DTPA Derivaten aber liegt in der sehr schnellen Reaktionskinetik, so dass auch kurzlebige Isotope in wenigen Minuten mit Antikörpern konjugiert werden können. CHX-A-DTPA hat sich in vielen Arbeitsgruppen für die Chelatierung von Nukliden wie  $^{111}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{213}\text{Bi}$  bewährt. Für die Elemente  $^{149}\text{Tb}$  und  $^{213}\text{Bi}$  wurde deshalb in dieser Arbeit CHX-A-DTPA verwendet. Um einen zu hohen Aktivitätsverlust zu vermeiden wurde versucht die Zeit für die Herstellung des  $^{213}\text{Bi}$  Radioimmunkonjugates auf weniger als 20 min zu reduzieren (Ma et al. 2001).

Für die Kopplungsreaktion wurde die Einschrittmarkierung mittels CHX-A-DTPA durchgeführt. Das bifunktionelle Chelat CHX-A-DTPA, hat eine freie Thioharstoffgruppe die mit den freien  $\text{NH}_2$  Gruppen von Lysinketten eine stabile Schwefelbrückenbindung eingeht. Dieser Schritt der Radionuklidmarkierung wurde für den Antikörper 6H8 am Kernforschungszentrum in Karlsruhe durchgeführt. Die Herstellung der Radioimmunkonjugate wurde dann direkt vor jedem Versuch durchgeführt (siehe Abbildung 3).

Bei der Herstellung des Antikörper-Chelat-Konjugates wurden metallfreie Chemikalien und Gefäße verwendet. Bei allen Lösungen wurden eventuelle Metall Verunreinigungen mittels Chelex 100 (Bio Rad) entfernt und alle Reaktionen wurden in metallfreien Plastikgefäßen durchgeführt.

In einem Centriplus (YM-50, Milipore) Membranfiltrerröhrchen wurden 10 mg Antikörper in 10 ml 0,15 M NaCl, 0,05 M Hepes Puffer, 0,01 M EDTA und pH 8,4 aufgenommen. Um eine nahezu vollständige Umpufferung zu erreichen, wurde das Volumen auf 1 ml zentrifugiert und dann mit 5 ml frischer Pufferlösung verdünnt. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt und die Antikörperlösung auf ein Volumen von 1 ml gebracht. Als Reaktionskatalysator wurden dann 15 µl einer 1,5 M Triethylamin-Lösung dazugegeben. Mit nachfolgender Zugabe von 1,65 mg CHX-A-DTPA wird ein stöchiometrisches Mischungsverhältnis Antikörper/Chelat von ca. 1:40 erreicht. Die Reaktion lief dann für 4 h bei Raumtemperatur ab. Danach wurde freies Chelat unter 5 maligem Waschen mit 10 ml PBS und jeweils folgender Zentrifugation im Membranfiltrerröhrchen entfernt und der konjugierte Antikörper auf eine Konzentration von 5 mg/ml eingestellt. Das resultierende Antikörper / Chelat Verhältnis liegt bei ca. 1:7 (Pippin et al. 1992).

Zur Konjugation von  $^{213}\text{Bi}$  und  $^{149}\text{Tb}$  an den chelatierten Antikörper wurden in der Regel 50 – 100 µg Antikörper mit 37 – 111 MBq  $^{213}\text{Bi}$  bzw. mit 18,5 – 37 kBq  $^{149}\text{Tb}$  inkubiert.

Nach Eluierung des  $^{213}\text{Bi}$  Generators mit 600 µl 1 M HI (siehe 4.2.3) wurde der pH Wert des Eluats mit 100 µl 3 M  $\text{NH}_4\text{Ac}$  auf 5,5 gebracht und 100 µl 40 mg/ml Ascorbinsäure als Schutz vor Radiolyse dazugegeben. In diese Reaktionslösung wurden 50 – 100 µl Antikörper (1 – 10 mg/ml) pipettiert und für 5 min bei Raumtemperatur unter wiederholtem Mischen inkubiert.

$^{149}\text{Tb}$  liegt nach Elution aus der Kationenaustauschsäule in ca. 200 µl  $\alpha$ -Hydroxyisobutyrsäure gelöst vor. Diese Lösung wurde erhitzt bis das Volumen auf 30 – 50 µl reduziert war und dann mit 550 µl 1 M HCl verdünnt und wie für  $^{213}\text{Bi}$  beschrieben an die Antikörper gekoppelt.

Die Entfernung nicht gebundener Nuklide und eine Umpufferung in PBS/1%HSA wurde mit einer PD10 size exclusion column (BioRad) durchgeführt. Vor Gebrauch einer PD10 Säule wurde diese mit 15 ml PBS/1%HSA gespült. Dann wurde das Volumen des Reaktionsproduktes auf 2 ml ergänzt, auf die Säule gegeben und mit 2 ml PBS/1%HSA eluiert.

### 5.2.2 Radionuklidmarkierung mittels HEHA

Das HEHA Chelat, wurde in vergleichenden Untersuchungen als das in vivo stabilste von mehreren untersuchten Chelaten beschrieben (Chappell et al. 2000). Aus diesem Grund wurden viele Versuche mit diesem Chelat durchgeführt. Trotzdem fällt bei dem langlebigem  $^{225}\text{Ac}$  die Instabilität und die resultierende Freisetzung von  $^{225}\text{Ac}$  zu stark ins Gewicht und es kommt zu einer Akkumulation der Aktivität z.B. in der Leber. Die Kopplungsmethode via HEHA ist deshalb gerade bei in vivo Untersuchungen wenig geeignet. Aus diesem Grunde hat erst die Veränderung des Markierungsprotokolls und die Verwendung von DOTA der weiteren Entwicklung der  $^{225}\text{Ac}$  Radioimmunkonjugaten Vorschub geleistet.

Mittels Dialyse wurde der Antikörper HuM195 mit 0,05 M Na carbonat/bicarbonat, pH 8,6 in 0,15 M NaCl und 5 mM EDTA für 6 h bei 4°C umgepuffert. Das bifunktionelle Chelat SCN-Bz-HEHA (1,4,7,10,13,16 hexaazacyclohexadecane-N,N',N'',N''',N''''',N''''''-hexaacetic acid) wurde in einem molaren Überschuß von 1:50 dazugegeben und das Gemisch für 18 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nicht gebundenes Chelat wurde durch 6 maliges Waschen mit 1,5 ml 0,2 M  $\text{NH}_4\text{Ac}$  pH-7,0 in einem Centricon microconcentrator (Millipore) entfernt (Kennel et al. 2000).

Zur Kopplung von  $^{225}\text{Ac}$  an den Antikörper wurden 3,7 MBq  $^{225}\text{Ac}$  in 500  $\mu\text{l}$  0,2 M  $\text{NH}_4\text{Ac}$  und 5 mg/ml L-Ascorbinsäure gelöst (pH 6-7). Dann wurden 0,2 mg HuM195-HEHA dazugegeben und bei 37°C für 60 min inkubiert. Das resultierende Reaktionsprodukt wurde mittels size exclusion (PD10) in 1% HSA/PBS umgepuffert und von freiem  $^{225}\text{Ac}$  gereinigt.

### 5.2.3 Radionuklidmarkierung mittels DOTA

$^{225}\text{Ac}$  hat einen großen Ionenradius, so dass DTPA Chelate  $^{225}\text{Ac}$  nicht stabil chelatieren. Der Ionenradius von  $^{225}\text{Ac}$  beträgt 112 pm, während z.B.  $^{149}\text{Tb}$  nur einen Ionenradius von 93 pm hat (Beyer 2000). Durch die lange Halbwertszeit von 10 Tagen erfordert die Kopplung eine wesentlich höhere Stabilität im Vergleich zu kürzer lebigen Isotopen. Zur Herstellung von  $^{225}\text{Ac}$ -3F8 wurde DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid) für die Kopplung von  $^{225}\text{Ac}$  an den Antikörper verwendet. Da das DOTA Chelat mehrere Zwischenstufen bildet, läuft die Bindungsreaktion mit den Isotopen nicht so schnell wie bei DTPA oder HEHA Chelaten ab. Im Vergleich zur Chelatierungskinetik von DTPA Derivaten, ist Chelatierung mittels DOTA ca. 1600-fach langsamer (Jang et al. 1999).

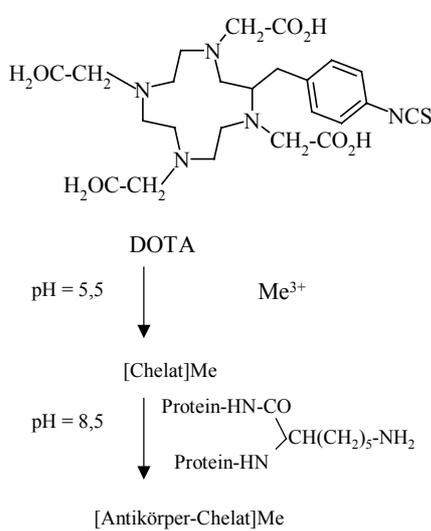
100  $\mu\text{g}$  DOTA (10 mg/ml) wurden mit 18,5 MBq  $^{225}\text{AcNO}_3$  (Oak Ridge National Labs, Oak Ridge, TN) in 0,1 M HCl (Vol.: ca. 20  $\mu\text{l}$ ) bei 50°C für 1 Stunde inkubiert. Das

Reaktionsvolumen betrug 150 µl und enthielt 5 g/l Ascorbinsäure und 20 µl 1 M TMAA (Tetramethyl-Ammonium Azetat) Puffer.

Nach Zugabe von 0,5 – 1 mg 3F8 Antikörper wurde der pH-Wert mit Carbonat/Hydrogencarbonat Puffer auf 8,5 gebracht. Die Bindungsreaktion des  $^{225}\text{Ac}$  DOTA Komplexes mit dem Antikörper erfolgte 1 h bei 35°C.

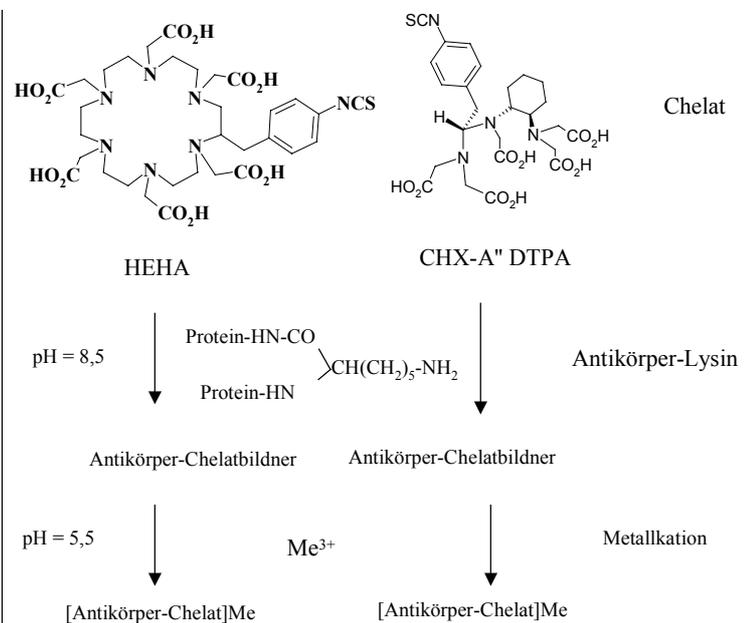
Um freies  $^{225}\text{Ac}$  zu binden wurde die Reaktion mit 20 µl EDTA (10 mM) gestoppt und dann der  $^{225}\text{Ac}$  konjugierte Antikörper von ungebundenem  $^{225}\text{Ac}$ -DOTA getrennt. Dies wurde wie in 5.2.1 beschrieben mit einer PD10 size exclusion Säule durchgeführt (McDevitt et al. 2001).

### Zweischrittmarkierung



Kopplung von Ac-225 mit DOTA  
An Antikörper

### Einschrittmarkierung



Kopplung von Ac-225 mit HEHA  
an Antikörper

Kopplung von Tb-149 und Bi-213 mit  
CHX-A-DTPA an Antikörper

### Abbildung 3 Kopplungsreaktion von Nukliden an Antikörper

Zweischrittmarkierung:  $^{225}\text{Ac}$  bildet mit DOTA einen Chelatkomplex, welcher dann mit der Thioharnstoffgruppe (NCS) an die freie Aminogruppe ( $\text{NH}_2$ ) der Aminosäure Lysin bindet.

Einschrittmarkierung: Die bifunktionellen Chelate HEHA bzw. CHX-A-DTPA werden an die freie Aminogruppe ( $\text{NH}_2$ ) der Aminosäure Lysin der Antikörper gekoppelt. In einem zweiten, zeitlich unabhängigen Schritt wird das Radionuklid in den chelatierten Antikörper gekoppelt.

## 5.3 Kontrolle der radiochemischen Reinheit der Radioimmunkonjugate

Die radiochemische Reinheit wurde mittels instant thin layer chromatography (ITLC) bestimmt. Dazu wurden 2 µl des Radioimmunkonjugates 5 mm oberhalb eines Ende eines Silikon-Gel imprägnierten Papiers (5x70 mm) pipettiert und dann das Papier mit diesem Ende nach unten in eine Laufkammer gestellt. Die Laufkammer war mit wenigen Milliliter 10 mM EDTA gefüllt, so dass das Laufmittel durch Kapillarwirkung in dem ITLC Streifen nach oben zieht. Freies Nuklid wird dabei EDTA chelatiert und wandert genau wie nicht Protein gebundene Chelatkomplexe mit der Front des Laufmittels. Nachdem das Laufmittel das gesamte Papier durchzogen hatte, wurde der Papierstreifen in der Mitte geteilt und die Aktivität der beiden Enden bestimmt. Die Isotope  $^{213}\text{Bi}$  und  $^{149}\text{Tb}$  wurden im gamma-Counter und das Isotop  $^{225}\text{Ac}$  wurde mittels Gasionisationsmessgerät für beta-Strahlung (Ambis) quantifiziert. Der Rf Wert des Radioimmunkonjugates ist 0 und der von freien Isotopen 1, so dass eine saubere Trennung mittels Dünnschichtchromatographie gelingt und in der Mitte des ITLC Streifens keine Aktivität nachweisbar sein soll.

#### **5.4 Kontrolle der Bindung der Radioimmunkonjugate**

Die Immunreaktivität wurde nach Inkubation von 2 ng radiomarkiertem Antikörper mit einem 20 bis 100 fachen Überschuss an Bindungsstellen bestimmt (modifiziert nach (Nikula et al. 1999)). Dazu wurden ca.  $5 \cdot 10^6$  lebende Zellen in einem maximalen Volumen von 100 µl 20 min mit 2 ng Radioimmunkonjugat auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden dann zweimal mit 1 ml PBS gewaschen und Überstände und Zellpellets separat gemessen. Diese Messung wurde für die Isotope  $^{149}\text{Tb}$  und  $^{213}\text{Bi}$ , die gamma-Strahlung emittieren im gamma-Counter durchgeführt. Für die  $^{225}\text{Ac}$  Immunkonjugate wurde die beta-Strahlung im Flüssigszintillationszähler bestimmt. Dazu wurden die Pellets in 1 ml PBS resuspendiert um sie auf das gleiche Volumen zu bringen. Dann wurden alle Ansätze in 10 ml Szintillationsflüssigkeit transferiert. Die Ansätze wurden gründlich durchmischt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Dies erlaubt die vollständige Homogenisierung und das Erreichen des Equilibriums von  $^{225}\text{Ac}$  mit seinen Tochternukliden.  $^{225}\text{Ac}$  wurde dann für 5 min pro Ansatz im  $^{32}\text{P}$  Fenster des beta-Counters quantifiziert.

Dieser Assay erlaubt vergleichende Aussagen über die Immunreaktivität und war zur Qualitätskontrolle ausreichend. Tatsächlich dürfte die Fraktion der bindungsfähigen Antikörper höher liegen. Die Konzentrationen von sowohl Antigen als auch Antikörper bestimmen die Höhe der Antikörperbindung. Auch in einem fast wasserfreien Pellet ist die Konzentration der Antigene durch das hohe Volumen des Zytosols wahrscheinlich

ausschlaggebend. Um die limitierte Konzentration von Antigen und Antikörper zu umgehen bietet sich z.B. die Approximation nach Lindmo an (Lindmo et al. 1984).

Für die Bestimmung der Immunreaktivität des Antikörpers 3F8 stand sein Antiidiotyp Antikörper (A1G4) zur Verfügung. Der Anti-Idiotyp bindet an die variable Region (Idiotyp) eines Antikörpers. Damit ist es möglich die Bindungsfähigkeit des Antikörpers mittels HPLC zu bestimmen. Nach Reaktion des Antikörpers mit seinem Anti-Idiotyp entstehen Dimere mit der Molmasse von 300 kDa die ca. 2 min schneller durch die size exclusion Säule (TSK-Gel, swxl3000, Supelco) wandern als Antikörper Monomere (150 kDa).

20 µl des markierten Antikörpers (7-8 µg) wurden mit 5 µl des Antiidiotyps (~20 µg) für 5 min bei RT inkubiert und dann mit einer 25 µl Hamilton Spritze in die HPLC injiziert. Dann wurde das Einspritzventil geöffnet und gleichzeitig die Detektion des gamma-Counters und der UV-Extinktion gestartet.

Zur Detektion des  $^{225}\text{Ac}$  markierten Antikörpers 3F8 hat der gamma-Detektor nicht die erforderliche Empfindlichkeit und eine Abgrenzung des Signals vor dem Hintergrund war nicht möglich. Dies liegt an der fehlenden Gammaemission von  $^{225}\text{Ac}$ . Die Gammaemission der Töchter  $^{213}\text{Bi}$  und  $^{221}\text{Fr}$  ist aufgrund der geringen Aktivitätsmenge nicht ausreichend. Aus diesem Grund wurde zur Bestimmung der Immunreaktivität mittels HPLC eine äquivalente  $^{111}\text{In}$  Markierung des Antikörpers 3F8 durchgeführt. Der  $^{111}\text{In}$  markierte Antikörper kann so nicht nur mittels UV-Spektroskopie, sondern auch mittels gamma-Messung detektiert werden. Mittels Detektion des Proteinpeaks bei 280 nm UV-Licht kann die immunreaktive Fraktion aber nicht quantifiziert werden, da diese Messung nicht zwischen markiertem Antikörper und dem nichtmarkiertem Überschuss an Anti-Idiotyp unterscheidet.

## **5.5 Bestimmung der Antigendichte und Affinität der Antikörper**

### **5.5.1 Scatchard-Analyse**

Die Affinität der radiomarkierten Antikörper und die Antigendichte auf den Zellen wurden mittels Scatchard-Analyse bestimmt. Dazu wurden in Dreifachansätzen  $10^6$  Zellen in einem Volumen von 200 µl mit Antikörperkonzentrationen von 0,1 bis 1 µg/ml für 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (400 g, 3 min) und zweimal mit 2,5 ml PBS gewaschen. Die Aktivität der Zellpellets und der Waschlösungen wurde im gamma-Counter quantifiziert und die gebundene Menge an Antikörper in Abhängigkeit der Antikörperkonzentration bestimmt. Mit der graphischen Auswertung nach Scatchard erhält

man die Assoziationskonstante  $K_a$  und die maximale Bindungskapazität  $B_{\max}$ .  $B_{\max}$  wird dann mit dem Reaktionsvolumen multipliziert und durch die Anzahl der Zellen geteilt. Die resultierende Antikörpermenge ist die Antikörpermenge pro Zelle. Diese wird durch die Molmasse von Immunglobulinen G (150 kDa) geteilt und mit der Avogadrokonstanten ( $N_A$ ) multipliziert. Die resultierende maximale Anzahl der gebundenen Antikörper entspricht der Bindungsstellen pro Zelle.

$$\text{Bindungsstellen pro Zelle}(B), B = \frac{(B_{\max} \cdot 0,2 \text{ ml}) \times N_A}{10^6 \times 1,5^{12} \frac{\text{ng}}{\text{mol}}}$$

$$B_{\max} \text{ in [ng/ml]}, N_A = 6,023 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$$

### 5.5.2 FACS Analyse

Fluorescent activated cell sorting (FACS) bietet die Möglichkeit mittels Laser-Anregung verschiedene Zellparameter wie Lichtbrechung, Lichtdurchlässigkeit und Fluoreszenz an einer großen Anzahl einzelner Zellen zu messen. Besonders mit Hilfe Fluoreszenz-markierter Proteine kann man so eine Vielzahl an Zelleigenschaften messen. Dazu wird eine Zellsuspension angesaugt und diese dann in einen schnellen Flüssigkeitsstrom (sheath fluid) injiziert, der die Zellen konzentrisch von allen Seiten umfließt. Dadurch werden die Zellen in die Mitte der Leitung gebracht (hydrodynamic focusing) bis sie sich schließlich in einem Einzelzellstrom bewegen. Jede Zelle kann dann einzeln von einem Laser angeregt werden und es können Lichtbrechung (side scatter) und Lichtdurchlässigkeit (forward scatter) sowie Fluoreszenzen bei verschiedenen Wellenlängen der Laser bestimmt werden.

Zur Bestimmung der Antigendichte wurde die Fluoreszenz von Sekundärantikörpern gemessen, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff Pycoerythrin (PE) markiert sind.

Es wurden  $5 \cdot 10^5$  d9 E-Cad und wt E-Cad transfizierte MDA Zellen mit  $5 \mu\text{g/ml}$  des Primärantikörpers 6H8 bzw. CHX-A-DTPA chelatiertem 6H8 in einem Volumen von  $500 \mu\text{l}$  inkubiert. Nach 30 min Inkubation wurden die Zellen zwei mal mit  $500 \mu\text{l}$  PBS gewaschen und dann mit  $5 \mu\text{l/ml}$  Sekundärantikörper (Ziege-anti-Ratte bei 6H8) wieder für 30 min inkubiert. Nach weiteren zwei Waschrufen wurde die Fluoreszenz der Zellen mittels FACS analysiert.

Diese Fluoreszenz kann durch das Erstellen einer Standardkurve in die absolute Anzahl der gebundenen Antikörper umgerechnet werden. Die Standardkurve wurde durch Messung der Fluoreszenz von quantitation-beads (Quantibrite, BD) generiert (Iyer et al. 1998). Die

Verstärkungsparameter des Fluoreszenzsignals wurden für die Messung der Zellen sowie für die Messung der quantitation-beads unverändert gelassen.

Zum Vergleich wurde die wildtyp E-Cadherin Dichte auf zwei Magenkarzinomzellen untersucht. Die Zelllinien HTB135 und CRL5973 (von ATCC) wurden vom Pathologischen Institut der Technischen Universität zur Verfügung gestellt. Als Primärantikörper gegen wildtyp E-Cadherin wurde der Antikörper HECD 1 (Takara Shuzo, Japan) verwendet.

## **5.6 Bestimmung der Proliferationsfähigkeit mittels <sup>3</sup>H-Thymidin inkorporierung**

Die Zytotoxizität der Radioimmunkonjugate wurde durch Bestimmung der <sup>3</sup>H-Thymidin-Inkorporierung 5 Tage nach Behandlung der Zellsuspensionen bestimmt. Die <sup>3</sup>H-Thymidininkorporierung quantifiziert den DNA Stoffwechsel von teilungsaktiven Zellen und ist damit ein Maß der Proliferationsfähigkeit von Zellen.

Die Versuche wurden an frisch ausgesäten Zellsuspensionen in 96-well Platten durchgeführt, d.h. zum Zeitpunkt der Inkubation mit den Radioimmunkonjugaten waren sowohl adhärent sowie in Suspension wachsende Zellen in Suspension. Dadurch lassen sich die Versuche erstens besser untereinander vergleichen und zweitens sind alle Bindungsstellen für die Antikörperbindung erreichbar. Die an die Ränder angrenzenden Vertiefungen wurden mit 300 µl Wasser gefüllt und verhindern somit ungleiche Verdunstung des Zellkulturmediums über Zellen in den nicht randständigen wells während der Inkubation. Innerhalb von 5 Tagen würde sich die stärkere Verdunstung des Mediums am Rand der 96-well Platten auf die Proliferationsfähigkeit auswirken. Die Anzahl der Zellen pro Vertiefung wurde so gewählt dass nach der 5-tägigen Inkubationszeit ca.  $3 \cdot 10^4$  Zellen in jeder Vertiefung gewachsen sind, d.h. es wurden 200 µl mit  $8 \cdot 10^3$  MDA Zellen,  $1 \cdot 10^4$  NMB7 bzw.  $2 \cdot 10^3$  HL60 Zellen pro Vertiefung ausgesät. Um die Zytotoxizität des gebundenen Radioimmunkonjugates von dem Effekt der ungebundenen Radioimmunkonjugate (Hintergrundaktivität) abzugrenzen, wurde bei jedem Versuch zusätzlich die gleiche Zelllinie ohne Bindungsstellen für die Antikörper untersucht. Für die MDA Zellen stand zu diesem Zweck die wt E-Cadherin transfizierte Variante zur Verfügung. Bei der Negativkontrolle der Leukämiezelllinie HL60 und der Neuroblastomzelllinie NMB7 wurden die Bindungsstellen mit 5 µg/ml unmarkiertem Antikörper blockiert.

Nach Herstellung der Radioimmunkonjugate wurden diese in einer 1:2 geometrischen Reihe verdünnt, so dass von der höchsten Aktivitätskonzentration, des unverdünnten

Markierungsproduktes, bis zur niedrigsten Aktivitätskonzentration 17 verschiedene Aktivitätskonzentrationen vorlagen. Dann wurde zu je 3 Vertiefungen mit 200 µl Zellsuspensionen 50 µl steigende Konzentrationen der Radioimmunkonjugate dazugegeben, d.h. für jede Aktivitätskonzentration lagen dann 3 Messwerte pro Versuch vor. Da besonders bei  $^{213}\text{Bi}$  für den gesamten Pipettiervorgang nicht mehr als 5 min vergehen sollen, empfahl es sich bei der niedrigsten Aktivität beginnend mit einer Multipette zu allen Vertiefungen 50 µl der Aktivität zu geben. Dies hat den Vorteil, dass die Kontamination auch ohne Wechsel der Pipettenspitze nur sehr gering ist. Die Platten wurden dann für 5 Tage bei 37°C in 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre inkubiert.

Nach der Zugabe von 18,5 kBq  $^3\text{H}$ -Thymidin pro well wurden die Zellen für weitere 5 Stunden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Den adhären wachsenden Zellen wurde 5 µl 0,1 M EDTA zugesetzt und 10 min später wurden die Platten bei -20°C gefroren. Die Kombination aus EDTA Inkubation und Einfrieren löst alle adhären Zellen zuverlässig ab. Nach dem Wiederauftauen wurden die Zellen mittels Skatron Cell Harvester auf Glasfaserfilter gebracht und dabei mit deionisiertem Wasser lysiert und gewaschen. Nach 3 Waschvorgängen verbleiben nur hochmolekulare Fraktionen wie Proteine und DNA auf dem Filter. Der Filter wurde für 12 h bei 37°C getrocknet und anschließend in eine Plastikhülle mit Szintillationsflüssigkeit oder Szintillationswachs eingeschweißt. Die Aktivität an inkorporiertem  $^3\text{H}$  in jedem Ansatz wurde in einem beta-Counter (mit der Lesegeometrie für die Filter) quantifiziert.

## **5.7 Klonogener Assay (96-well plate clonogenic assay)**

Der Goldstandard zur Bestimmung der Zytotoxizität ist der klonogene Assay. Zur Validierung der  $^3\text{H}$ -Thymidininkorporierung wurden die wt und d9 E-Cadherin transfizierten MDA MB 435S Zellen zusätzlich mit dem Klonogenen Assay untersucht. Ziel dieses Versuchs war es auszuschließen, dass es keine für alpha Bestrahlung spezifischen Mechanismen gibt und zu bestätigen, dass verminderte  $^3\text{H}$ -Thymidininkorporierung in verminderter klonogener Potenz der Zellen resultiert. Es ist z.B. vorstellbar dass Ergebnisse der  $^3\text{H}$ -Thymidininkorporierung nicht mit Ergebnissen aus klonogenen Assays übereinstimmen, wenn Zellen aufgrund von Reparaturversuchen stark erhöhten DNA Aufbau zeigen, der aber nicht zur Wiederherstellung der klonogenen Potenz führt.

Da einige Tumorzellen nicht fähig sind aus einer Zelle eine Kolonie zu bilden sondern einen Zellverbund dazu benötigen, wurde in Vorversuchen die minimale Anzahl von Zellen pro

well, die für die Ausbildung von Klonen notwendig ist, bestimmt. Dabei stellte sich heraus dass bei weniger als 100 MDA Zellen pro Vertiefung diese immer steril bleiben, so dass ein klonogener Assay im klassischen Sinne nicht möglich ist. Aus diesem Grunde wurde als Meßgröße nicht Einzelklone ausgezählt, sondern wells mit lebenden Zellen versus sterilen wells (Kulmala et al. 1995).

Genau wie bei den Zytotoxizitätsversuchen in 5.6 wurden die Zellen mit dem Radioimmunkonjugat behandelt während sie sich in Suspension befanden. Wt E-Cadherin und d9 E-Cadherin expremierende MDA Zellen wurden auf eine Konzentration von 700 Zellen/ml gebracht und dann mit Aktivitätskonzentrationen von 0,55; 0,925 und 1,48 MBq/ml  $^{213}\text{Bi}$ -6H8 behandelt. Ein Ansatz unbehandelter Zellen wurde als Wachstumskontrolle mitgeführt. In einer kurzen Inkubationszeit von ca. 20 min wurde durch wiederholtes Resuspendieren der Zellen homogene Durchmischung und Bindung der Radioimmunkonjugate erreicht. Dann wurde jeder Ansatz in ein 96-well plate überführt. Dazu wurden 300  $\mu\text{l}$  jedes Ansatzes in alle 96 wells einer Platte pipettiert, so dass pro Aktivitätskonzentration 96 wells beobachtet werden konnten. Nach einer Inkubationszeit von 2 Wochen wurde zu allen wells 50  $\mu\text{l}$  einer XTT Lösung (Roche) gegeben und nach weiteren 5 h wurden die Extinktionen im Elisa Reader gegen die Leerwerte bestimmt. Der dabei verwendete Farbstoff, ein Formazan, wird von mitochondrialen Enzymen zu einem löslichen Farbstoff umgesetzt, der durch Extinktionsmessung bei 490 nm quantifiziert werden kann. In der Auswertung wurde die prozentuale Anzahl der positiven wells in jedem Ansatz angegeben.

## **5.8 Nachweis von Apoptose mittels Tunel-Assay**

Das Auftreten von Apoptose nach Behandlung mit Radioimmunkonjugaten wurde mit Tunel-Assays für FACS Analyse untersucht. Durch die Fragmentierung der DNA während der Apoptose entsteht eine hohe Anzahl an freien DNA Enden, die mit Hilfe des Tunel-Assays quantifiziert werden. Das Enzym terminal deoxynucleotidyltransferase katalysiert die Reaktion von Fluoreszenz markierten Nukleosiden, die dann an jedes freie DNA Ende binden. Für die FACS Analyse werden ca.  $10^5$  Zellen pro Messpunkt benötigt. Aufgrund der 10 Waschschrte die mit einem erheblichen Zellverlust einhergehen wurde mit ca.  $2 \cdot 10^6$  Zellen pro Messpunkt begonnen. Das Auftreten von Apoptose wurde über 4 Tage gemessen und jeder Zeitpunkt enthielt eine positiv und eine negativ Kontrolle. Die negativ Kontrolle bestand aus einem Ansatz unbehandelter Zellen, während für die positiv Kontrolle immer HL60

Zellen verwendet wurden, die entweder mit dem Zytostatikum Daunorubicin (1,4 ng/ml) oder mit alpha-emittierenden Nukliden inkubiert wurde. Bei den adhären wachsenden MDA und NMB7 Zellen wurden 3 Zellsuspensionen á 40 ml mit  $10^5$  Zellen/ml hergestellt. Ein Ansatz wurde nicht behandelt und je einer mit Konzentrationen der Radioimmunkonjugate 1-2-fach bzw. 20-50-fach über den  $LD_{50}$  Werten. Anschließend wurden die 40 ml Zellsuspensionen in 10 ml Aliquods in Zellkulturflaschen überführt und inkubiert. Bei den in Suspension wachsenden HL60 Zellen wurden 15 ml Zellsuspension mit  $1,5 \cdot 10^5$  Zellen/ml mit Radioimmunkonjugat behandelt.

Nach 6, 24, 48 und 72 h wurden aus je einer Zellkulturflasche der adhären Zelllinien alle Zellen mit 3 ml 2 mM EDTA/PBS abgelöst, bzw. 3 ml Zellsuspension der HL60 Zellen in Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden dann zweimal mit PBS gewaschen und in 200  $\mu$ l PBS aufgenommen. Diese konzentrierte Zellsuspension wurde tropfenweise in 3 ml 1% Paraformaldehyd pipettiert und zur Fixierung 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift mit PBS wurden die Zellen in 1 ml 70% EtOH aufgenommen und bei  $-20^\circ$  bis zur Analyse aufbewahrt.

Vor der Messung mittels FACS wurden die fixierten Zellen nach dem Protokoll des Apoptose Kits vorbereitet und dann bei 10 000 Zellen die Fluoreszenz bestimmt.

## **5.9 Nachweis von Internalisierung der Radioimmunkonjugate**

Es wurde der Zeitverlauf der Internalisierung für die Radioimmunkonjugate  $^{111}\text{In}$ -6H8,  $^{225}\text{Ac}$ -HuM195 und  $^{225}\text{Ac}$ -3F8 an den Zelllinien d9-E-Cad MDA, HL60 bzw. NMB7 bestimmt.

Dazu wurden 15 ml einer Zellsuspension ( $10^6$  Zellen/ml) mit 1  $\mu$ g/ml Radioimmunkonjugat für 30 min auf Eis inkubiert. 1  $\mu$ g/ml ist die Konzentration bei der fast alle Bindungsstellen gesättigt sind und kein hoher Antikörperüberschuß besteht. Die Internalisierung wurde initiiert durch Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$ . Dabei werden die Zellen erwärmt und nehmen ihren normalen Stoffwechsel wieder auf. Zu den Zeitpunkten 0, 30, 60, 120 und 240 min wurden je 2 ml Zellsuspension entnommen und durch zweimaliges Waschen mit 3 ml PBS wurde ungebundener Antikörper entfernt. Die zellgebundene Aktivität besteht dann aus den zwei Anteilen oberflächlich gebundener und internalisierter Radioimmunkonjugate. Oberflächlich gebundener Antikörper wurde dann durch Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur mit pH 2,8 Puffer (50 mM Glyzin/150 mM NaCl) abgelöst. Nach Zentrifugation und Dekantierung des Überstandes wurden die Aktivitäten von Zellpellet und

Überstand quantifiziert (Kwa et al. 1996). Die Aktivität des Zellpellets ist die internalisierte Aktivität während sich im Überstand die vorher oberflächlich gebundene Aktivität befindet.

## **5.10 Ermittlung des Crossfire-Effekts von Radioimmunkonjugaten**

Crossfire-Effekt ist die Wirkung von alpha-Partikeln auf eine Zelle, die von ungebundenen oder von an Nachbarzellen gebundenen Radioimmunkonjugaten stammen. Die zusätzliche Strahlendosis ausgehend von Nachbarzellen kann besonders bei Zellclustern eine Steigerung des zytotoxischen Effekts bewirken. Um den Einfluss von Kreuzfeuerstrahlung zu quantifizieren, wurde der Effekt von  $^{149}\text{Tb}$  und  $^{213}\text{Bi}$  gekoppelt an 6H8 in Zellpellets untersucht und mit dem zytotoxischen Effekt an Zellen in Suspension verglichen. Es wurden dreifach Ansätze mit je 2 ml Zellsuspensionen ( $10^5/\text{ml}$ ) der d9 E-Cad und wt E-Cad exprimierenden MDA Zelllinien mit vier verschiedenen Konzentrationen (244; 492; 980; 1961 kBq/ml bei  $^{213}\text{Bi}$ -6H8 und 11; 44; 177; 703 kBq/ml bei  $^{149}\text{Tb}$ -6H8) der Radioimmunkonjugate inkubiert und nach 3 min für  $^{213}\text{Bi}$ -6H8 bzw. 15 min für  $^{149}\text{Tb}$ -6H8 wurden die Zellen zu Pellets abzentrifugiert (400g, 4 min). Dies führt zur Bildung eines Zellpellets mit  $2 \cdot 10^5$  Zellen und einer homogenen Verteilung der Radioimmunkonjugate. Die Verwendung von Zellkulturröhrchen mit spitz zulaufendem Boden hat zur Folge, dass das Pellet sehr klein ist und somit ein kompaktes Zellkuster bildet. Nach einer Halbwertszeit wurden die Zellen resuspendiert und ein Aliquot der Zellen von 200  $\mu\text{l}$  ( $10^4$  Zellen) in die Vertiefungen von 96-well plates überführt. Diese wurden dann wie bei den Suspensionsversuchen 5 Tage bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Mittels  $^3\text{H}$ -Thymidininkorporierung wurde dann die Proliferationsfähigkeit der Zellen bestimmt (siehe 5.6).

## **5.11 Toxizität von $^{213}\text{Bi}$ -6H8 und $^{149}\text{Tb}$ -6H8 an Spheroide**

Eine andere Art von Tumorzellklustern sind Spherioide. Im Gegensatz zu den Versuchen an Zellsuspensionen und an Zellpellets, können an Zellen in Spheroide die Radioimmunkonjugate nicht von allen Seiten binden, da die Radioimmunkonjugate zu langsam in das Innere der Spherioide gelangen. Für die Versuche wurden Spherioide in 30 ml Medium vorsichtig in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Innerhalb von 2 bis 5 min sinken die Spherioide auf den Boden und es kann durch vorsichtiges Resuspendieren eine

dichte Spheroid Suspension im unteren Teil des Zentrifugenröhrchen erzeugt werden. Kleinere Zellcluster und Einzelzellen verbleiben aufgrund ihrer langsamen Sedimentationsrate im oberen Teil des Überstandes. Es wurden ca. 20 Spherioide in 500 µl Medium entnommen und pro well in eine 24-well Platte pipettiert. Die Spherioide wurden mit verschiedenen Konzentrationen der Radioimmunkonjugate  $^{213}\text{Bi}$ -6H8 und  $^{149}\text{Tb}$ -6H8 inkubiert und dabei in ständiger Bewegung gehalten. Nach 24 h wurde die erste Messung der Spheroid-Vitalität mittels XTT Test (Roche) durchgeführt. Dazu wurden 50 µl der XTT Lösung in jedes well gegeben und für 3 h bei 37°C inkubiert. Dann wurden 50 µl Aliquots des Spheroidüberstandes aus jeder Vertiefung in eine 96-well Platte pipettiert und die Extinktion im ELISA Reader bestimmt. Nachfolgend wurde das XTT haltige Medium der Spherioide durch frisches ersetzt. Um eine nahezu vollständige Entfernung des XTT Farbstoffes zu erreichen wurden 4 mal je 1 ml frisches Medium in die wells gegeben und nach einer kurzen Inkubation von 15 min wieder abgesaugt. Nach 2, 4 und 6 Tagen wurde auf gleiche Weise erneut die Vitalität der Spherioide bestimmt. So ergibt sich ein Zeitverlauf der Vitalität einer gleichen Gruppe von Spheroiden und eine Beurteilung des Strahleneffekts ist möglich, ohne die Anzahl und die Spheroidgrößen genau zu kennen.

## **5.12 Analyse chromosomaler Aberrationen**

Chromosomenschäden wurden bei d9 und wt E-Cad transfizierten MDA Zellen nach Behandlung mit  $^{213}\text{Bi}$ -6H8 evaluiert. Dazu wurden je 100 000 Zellen in 4 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen gesät und nach 8h mit 0; 0,74; 1,48 und 4,81 Mbq/ml  $^{213}\text{Bi}$ -6H8 behandelt. Zum Zeitpunkt der Behandlung hatten die Zellen schon wieder Monolayer gebildet. Nach 2 h Inkubation wurde das radioaktive Medium abgesaugt und durch frisches ersetzt. Die Zellen wurden dann für weitere 3 Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Schließlich wurden die Zellen mit 1 mM EDTA/PBS abgelöst, in frisches Kulturmedium überführt und mit 0,25 µg/ml Colcemid (Ciba) versetzt. In der nachfolgenden Inkubationszeit von 3 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> werden alle Zellen in der Mitose arretiert. Colcemid hemmt die Ausbildung der Mitosespindeln, so dass die Chromosomen in der Metaphase der Mitose fixiert bleiben.

Nach einem Waschschrift mit Hank's gepufferter Salzlösung wurden die Zellen in einer hypotonen Lösung von 25% Hank's Puffer in destilliertem Wasser zum Quellen gebracht. Nach 15 min sind die Zellen stark vergrößert aber die Zellmembranen sind noch intakt. Die so vorbehandelten Zellen wurden mit 75% EtOH und 25% Eissessig fixiert. Die Fixierung wurde 2 mal für je 30 min wiederholt. Beim Auftropfen der Zellen aus 10 cm Höhe auf einen

Objektträger zerplatzen sie und die in der Metaphase fixierten Chromosomen lassen sich durch Erhitzen für 5 min auf 42°C auf dem Objektträger fixieren. Nach Färbung mit 5% Giemsa Lösung wurden Chromosomen von 100 Mitosen jeder Gruppe analysiert und die Strahlenschäden quantifiziert (Lindl 2000). Dabei wurden 3 verschiedene Schäden klassifiziert:

1. Schäden vom Chromatidtyp: Aberrationen bei Postreplikationschromosomen (S und G2 Phase)
2. Schäden vom Chromosomentyp: Aberrationen bei Präreplikationschromosomen (G1 Phase)
3. Premature Chromosomal Condensation: multiple Schäden, die die Zelle zu unvollständiger Chromosomenkondensation veranlassen

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Radiochemische Reinheit und Bindung der Antikörper

#### 6.1.1 Radiochemische Reinheit

Bei den  $^{213}\text{Bi}$ -Antikörperkonjugaten waren nach Aufreinigung mit einer PD10 Säule weniger als 5% freie Aktivität nachweisbar. Wahrscheinlich aufgrund der kleineren Atommasse von  $^{149}\text{Tb}$  und des folglich kleineren Atomdurchmessers wurden bei der Konjugation von  $^{149}\text{Tb}$  an die Antikörper schon vor der Reinigung radiochemische Reinheiten von 99 – 100% erreicht. Um vergleichbare Bedingungen zu erhalten wurde eine Reinigung trotzdem durchgeführt und somit lagen alle Radioimmunkonjugate in 1% HSA/PBS Puffer vor.

Die radiochemische Reinheit von  $^{225}\text{Ac}$ -HEHA-HuM195 lag nach Reinigung über 90 %, aber innerhalb von 4 Tagen in 1% HSA wurden ca. 50% des  $^{225}\text{Ac}$  von dem Chelatkomplex freigesetzt. Im Gegensatz dazu wurde mit der gleichen Einschrittmethode bei Verwendung von DOTA zwar nur eine Reinheit von 70% - 80% erreicht, aber 3 h bis 4 Tage nach Kopplungsreaktion erfolgte praktisch keine weitere Freisetzung des Nuklids. Dies kann mit einem unvollständigen Ablauf der Chelatierung erklärt werden. Während ein Teil des  $^{225}\text{Ac}$  stabil von DOTA chelatiert wurde liegt ein anderer Teil in einem instabilen Übergangszustand chelatiert vor. Nach der Reinigung mittels size exclusion column ist instabil chelatiertes  $^{225}\text{Ac}$  für die hohe Instabilität des Radioimmunkonjugates verantwortlich.

Durch Erhöhung der Reaktionstemperatur kann die  $^{225}\text{Ac}$  Chelatierung bis zur vollständigen Bildung des stabilen Chelatkomplexes ablaufen. Eine Erhöhung der Temperatur bei der Chelatierungsreaktion von  $37^\circ\text{C}$  auf  $60^\circ\text{C}$  macht dann aber die Umkehrung der Reaktionsreihenfolge notwendig. Da bei  $60^\circ\text{C}$  Antikörper denaturieren und somit ihre Bindungseigenschaften verlieren wurde erst die Chelatierung von  $^{225}\text{Ac}$  in DOTA durchgeführt und dann der Chelatkomplex an den Antikörper gekoppelt. Bei der Reinigung des  $^{225}\text{Ac}$ -DOTA-Immunkonjugates werden aber bis zu 80% des stabil im DOTA Komplex chelatierten  $^{225}\text{Ac}$  in der size exclusion Säule zurückgehalten da das Chelat nicht am Antikörper gebunden ist (McDevitt et al. 2001).

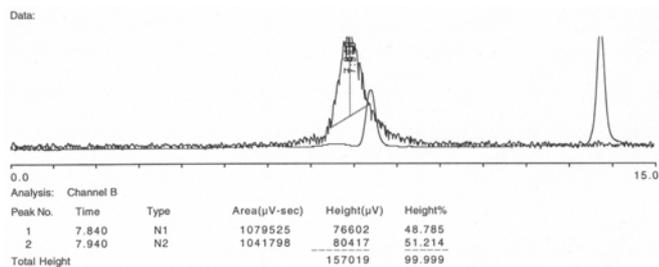
### 6.1.2 Antikörperbindung

Zur Kontrolle der Antikörperbindung nach der Radiomarkierung wurde ein vereinfachter Assay zur Bestimmung der Immunreaktivität herangezogen (siehe 5.4), (Nikula et al. 1999). Die so gemessene Immunreaktivität des Antikörpers 6H8 nach  $^{213}\text{Bi}$  oder  $^{149}\text{Tb}$  Markierung lag konstant zwischen 30% und 35%. HuM195 wies nach  $^{149}\text{Tb}$  Markierung eine Immunreaktivität von 35% und nach  $^{225}\text{Ac}$  Markierung von 80% auf. Diese Diskrepanz ist eventuell durch die ältere Charge und das wiederholte Auftauen des Antikörpers HuM195 bei der  $^{149}\text{Tb}$  Markierung zu erklären. Die Immunreaktivität des Antikörpers HuM195 lag auch bei den klinischen Studien immer über 80%, so dass die niedrige Immunreaktivität von  $^{149}\text{Tb}$ -HuM195 als Ausreißer gesehen werden muß, der nicht näher erklärt werden kann. Beim Antikörper 3F8 wurden nach  $^{225}\text{Ac}$  Konjugation mittels DOTA Immunreaktivitäten von 50% – 60% an NMB7 Zellen gemessen. Da für den Antikörper 3F8 sein Antiidiotyp zur Verfügung stand wurde die Immunreaktivität zusätzlich mittels HPLC bestimmt. Diese Methode hat den Vorteil, dass die Konzentration des Antigens viel höher liegt als in einem Zellpellet. Auch bei sehr dicht gepackten lebenden Zellen ist die Antigenkonzentration durch das Volumen der Zellen limitiert. Während  $5 \cdot 10^6$  NMB7 Zellen in  $100 \mu\text{l}$  Volumen eine Antigenkonzentration von  $2,5 \cdot 10^{14}/\text{ml}$  erreichen, liegt die Antigenkonzentration bei  $20 \mu\text{g}$  Anti-Idiotyp in  $25 \mu\text{l}$  Gesamtvolumen bei  $3,2 \cdot 10^{15}/\text{ml}$ . Nach Bindung des Anti-Idiotyps an die variable Region entsteht ein Antikörperdimer und die Molmasse verdoppelt sich. Dadurch verkürzt sich Durchlaufzeit durch eine TSK-size exclusion Säule von 8 min auf 6 min (Abbildung 4). Diese Messungen ergaben eine 100%ige Verschiebung des Antikörper Peaks nach Inkubation mit Anti-Idiotyp, d.h. eine 40% – 50% höhere Immunreaktivität im Vergleich zum Zellassay. Aus dieser Diskrepanz der beiden unterschiedlichen Methoden zur Bestimmung der Immunreaktivität folgt, dass wahrscheinlich alle im Zellassay ermittelten Immunreaktivitäten zu niedrig sind.

Date: Tue, Oct 3, 2000 1:24 PM  
 Data: 3F8-In111

Sample: TSK-Gel G3000SWxl, C3145-01B, 300mmx7.8mm, 5um  
 1ml/min; 0.15 NaCl/0.02NaAc; 640 psi  
 280 nm; 0.005AUFS, 1s 10k/1M, 1s  
 3F8-In111, 20 mikrol  
 9/19/2000

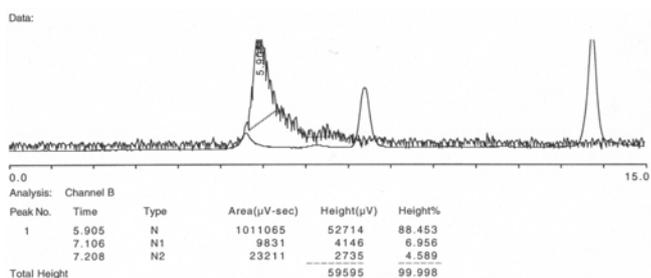
Inject Vol: 20  
 Internal Std: 3.5  
 Sampling Int: 0.1 Seconds



Date: Thu, Sep 28, 2000 2:53 PM  
 Data: 3F8-In111+Ald

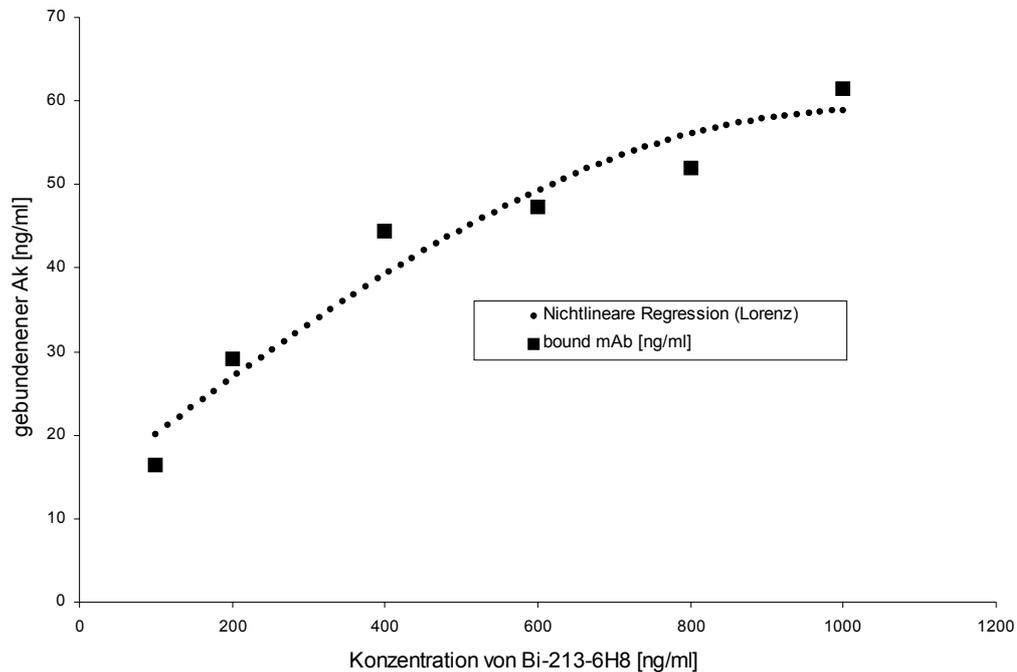
Sample: TSK-Gel G3000SWxl, C3145-01B, 300mmx7.8mm, 5um  
 1ml/min; 0.15 NaCl/0.02NaAc; 640 psi  
 280 nm; 0.005AUFS, 1s 10k/1M, 1s  
 3F8-In111, 20 mikrol + Anti Idiotyp, 5 mikrol  
 9/19/2000

Inject Vol: 20  
 Internal Std: 3.5  
 Sampling Int: 0.1 Seconds



**Abbildung 4** Bestimmung der Immunreaktivität des Antikörpers 3F8 mittels Antiidiotyp und HPLC  
 Der obere Teil der Abbildung zeigt die Passagezeit von  $^{111}\text{In}$ -3F8, der untere Teil die Passagezeit von  $^{111}\text{In}$ -3F8 nach Inkubation mit seinem Antiidiotyp. Der vom gamma Zähler gemessene Peak verschiebt sich von 8 min auf 6 min (Channel B). Eine ähnliche Verschiebung wird in der Kurve des UV-Meters erkennbar. Diese kann aber nicht quantifiziert werden, da durch den Überschuss von Antiidiotyp der ungebundene 3F8 überdeckt wird.

In Abbildung 5 ist die Bindungskurve für den  $^{213}\text{Bi}$  markierten Antikörper 6H8 gezeigt. 33% der Antigene sind schon bei einer 6H8 Konzentration von 100 ng/ml gesättigt. Ab einer Konzentration von 800 ng/ml sind über 90% der d9 E-Cadherin Bindungsstellen gesättigt und ein weitere Konzentrationserhöhung verstärkt den unspezifischen Effekt der Hintergrundstrahlung unabhängig von der Antigenexpression.



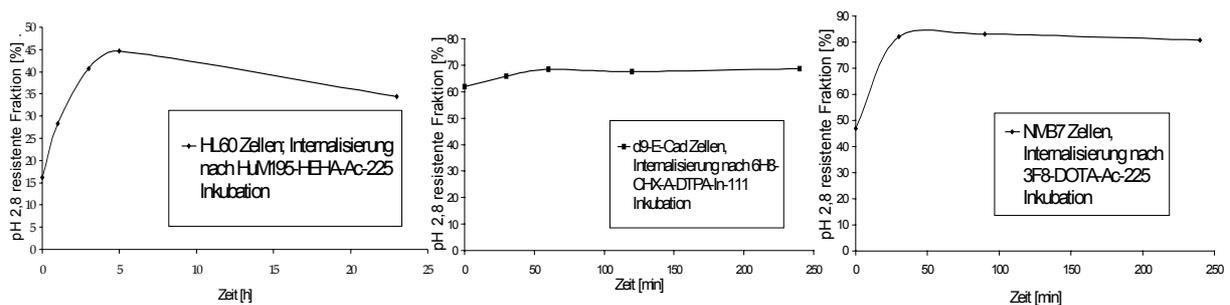
**Abbildung 5** Bindungskurve des Anti d9 E-Cad Antikörpers  $^{213}\text{Bi}$ -6H8

## 6.2 Internalisierung der Antikörper

Internalisierung des Radioimmunkonjugates in die Tumorzellen verstärkt den zytotoxischen Effekt der alpha-Strahlung. Die alpha-Emitter werden durch Internalisierung näher an den Zellkern gebracht und die Wahrscheinlichkeit, dass ein alpha-Partikel den Zellkern durchquert ist größer als bei alpha-Emittern, die an der Zelloberfläche gebunden sind. Zusätzlich erhöht bei  $^{225}\text{Ac}$ -Immunkonjugaten der Verbleib der Tochter Nuklide am Ort des  $^{225}\text{Ac}$ -Zerfalls die Strahlendosis auf die Zelle um ein vielfaches. Die Internalisierung verursacht eine Retention aller Töchter im Tumor, da die 3+ Metallionen  $^{221}\text{Fr}$  und  $^{213}\text{Bi}$  nicht aus der Zelle heraus transportiert werden können.

Nach der Inkubation mit pH 2,8 Glyzin Puffer wurde auf einen zusätzlichen Waschschriff verzichtet, der eine bessere Trennung zwischen abgelöster, d.h. gebundener Aktivität und Aktivität im Zellpellet, d.h. internalisierter Aktivität ergeben hätte. Da die Zellen durch die Behandlung mit dem Puffer zu stark geschädigt werden, erhöhte ein zusätzlicher Waschschriff die Fehlerquelle und Internalisierung ließ sich wesentlich schwerer nachweisen. Aus diesem

Grunde liegt aber auch schon beim ersten Zeitpunkt, also bei einer Zelltemperatur von 0°C eine hohe pH 2,8 resistente Fraktion vor. Ausschlaggebend für die tatsächliche Internalisierung ist folglich eher der Zeitverlauf als die prozentuale Höhe der pH 2,8 resistenten Fraktion. Der markierte Antikörper 6H8 wird nach Bindung an d9 E-Cadherin nur zu ca. 7% in die Zelle aufgenommen. HL60 Zellen internalisieren den Antikörper HuM195 zu ungefähr 30% und der GD<sub>2</sub> Antikörper 3F8 wird zu 35% in die Zelle internalisiert. Bei den 3 Antikörpern wurde neben der unterschiedlichen Internalisierungsrate auch Unterschiede in der Internalisierungsgeschwindigkeit beobachtet. 3F8 wird nach Bindung an GD<sub>2</sub> sehr schnell internalisiert und nach 30 min kann keine weitere Änderung detektiert werden. Im Gegensatz dazu erreicht die Internalisierung des Anti CD33 Antikörpers HuM195 das Maximum nach 5h. Die geringe Internalisierung des d9 E-Cadherin Antikörpers 6H8 liegt im Bereich von 1h.



**Abbildung 6** Internalisierungskurven der Antikörper HuM195 (links), 6H8 (mitte) und 3F8 (rechts) Es ist der Zeitverlauf der pH 2,8 resistenten Radioimmunkonjugate gezeigt. HuM195 hat einen Anstieg um 30% der nach 5h erreicht ist. 6H8 internalisiert nach 50 min max. 8% der gebundenen Aktivität, 3F8 internalisiert nach 30 min 35% der gebundenen Aktivität

### 6.3 Antigenichte auf den Zellen und Affinität der Antikörper

MDA Zellen exprimieren ca.  $5,5 \cdot 10^4$  d9 E-Cadherin Moleküle pro Zellen und der Antikörper 6H8 hat eine Affinität von  $5 \cdot 10^8$  l/mol. HL60 exprimieren  $1-2 \cdot 10^4$  CD33 Moleküle und HuM195 bindet mit einer Affinität von  $3 \cdot 10^9$  l/mol. NMB7 Zellen haben ca.  $5 \cdot 10^6$  GD<sub>2</sub> Gangliosid Moleküle in der Zellmembran und der Antikörper 3F8 hat eine Affinitätskonstante von  $2 \cdot 10^8$  l/mol. Der Kehrwert der Affinitätskonstante ist die Dissoziationskonstante und sie ist die Konzentration bei der die Hälfte der Bindungsstellen mit Antikörpern gesättigt sind.

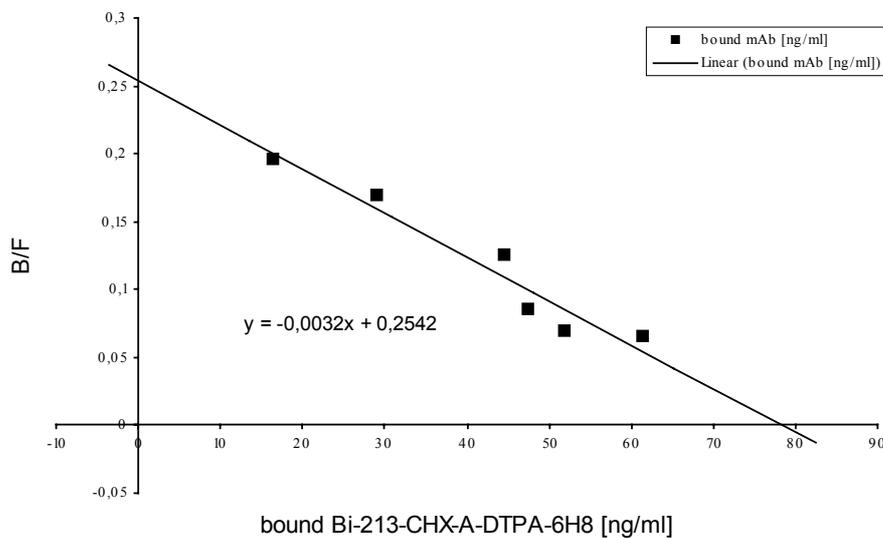
Diese Konzentrationen, umgerechnet in  $\mu\text{g/ml}$ , sind  $0,3 \mu\text{g/ml}$  für den Antikörper 6H8;  $0,045 \mu\text{g/ml}$  für den Antikörper HuM195 und  $0,75 \mu\text{g/ml}$  für den Antikörper 3F8 (Tabelle 3).

**Tabelle 3** Affinitäten der untersuchten Antikörper und Anzahl der Bindungsstellen auf den Zellen sowie die mittels Zell assay gemessenen Immunreaktivitäten

Antikörper	Immunklasse	KD [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Ka [ $\text{l/mol}$ ]	Bindungsstellen / Zelle	Immunreaktivität
<b>6H8</b>	rat IgG <sub>2a</sub>	0,3	$5 \cdot 10^8$	55 000	30%
<b>HuM195</b>	human IgG <sub>1</sub>	0,045	$3 \cdot 10^9$	15 000	65%
<b>3F8</b>	mouse IgG <sub>3</sub>	0,75	$2 \cdot 10^8$	5 000 000	55%

### 6.3.1 Scatchard Plot des Antikörpers 6H8

Die Scatchard Regression mit der in Abbildung 5 gezeigten Bindungskurve des  $^{213}\text{Bi}$ -6H8 ist in Abbildung 7 dargestellt. Daraus ergibt sich eine Affinität des Antikörpers 6H8 von  $4,8 \cdot 10^8 \text{ l/mol}$  und eine Anzahl von Bindungsstellen, also d9 E-Cadherin Molekülen pro Zelle, von  $6 \cdot 10^4$ . Im Gegensatz zur Regression der Daten nach Scatchard ist in der Bindungskurve aus Abbildung 5 eine nichtlineare Regression gezeigt. Diese nichtlineare Regression erreicht das Bindungsplateau, d.h.  $B_{\text{max}}$  bei  $60 \text{ ng/ml}$  und ergibt damit nur  $5 \cdot 10^4$  Bindungsstellen pro Zelle.



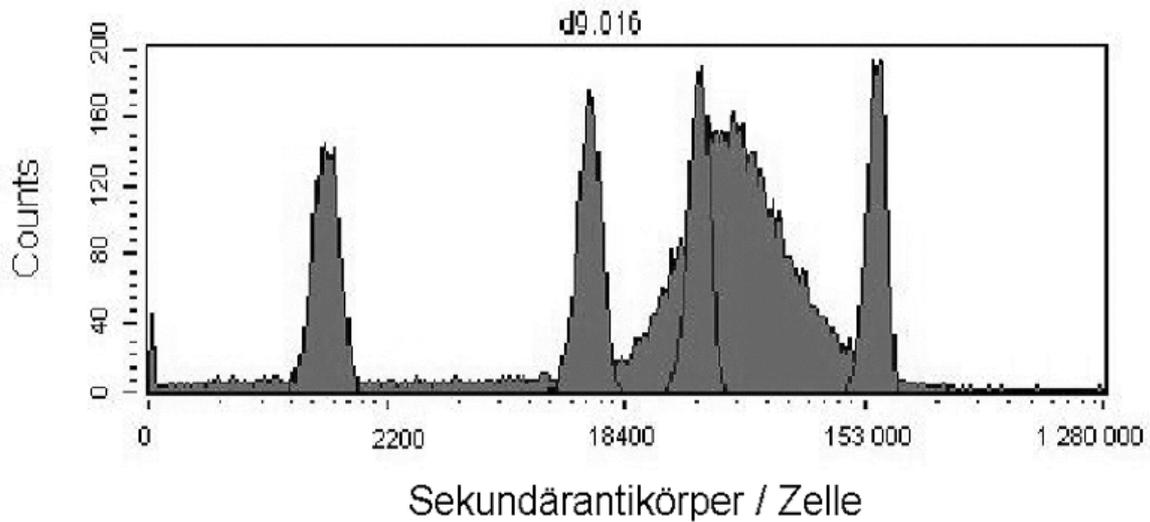
**Abbildung 7** Scatchardregression

Die Bindung des Radioimmunkonjugates  $^{213}\text{Bi}$ -6H8 an d9 E-Cad MDA Zellen ist gegen das Verhältnis von gebundenem und freien Antikörper aufgetragen (B/F). Die Steigung der linearen Regression ist die Affinität des Antikörpers. Der Wert der linearen Regression bei B/F = 0 ist die maximale Bindung aus der sich die Anzahl der d9 E-Cad Moleküle pro Zelle berechnen lässt.

### 6.3.2 FACS Analyse von d9 E-Cad MDA Zellen und Magenkarzinom Zelllinien

Der Vergleich der Zellen mit der Standardreihe ergab zwischen  $3 \cdot 10^4$  und  $5 \cdot 10^4$  gebundene native 6H8 Antikörper an den d9 E-Cad exprimierenden MDA Zellen (Abbildung 8). Mittels FACS Analyse werden alle Zellen einzeln gemessen und in Form eines Histogrammes dargestellt. Dieser Darstellung kann nicht nur die mittlere Expression der Antigene sondern auch die Verteilung dieser Expression entnommen werden. An den untersuchten MDA Zellen zeigte sich eine homogene Expression des d9 E-Cadherins mit einer geringen Streuung. Eine Zellpopulation, die d9 E-Cadherin gar nicht exprimiert wurde nicht nachgewiesen.

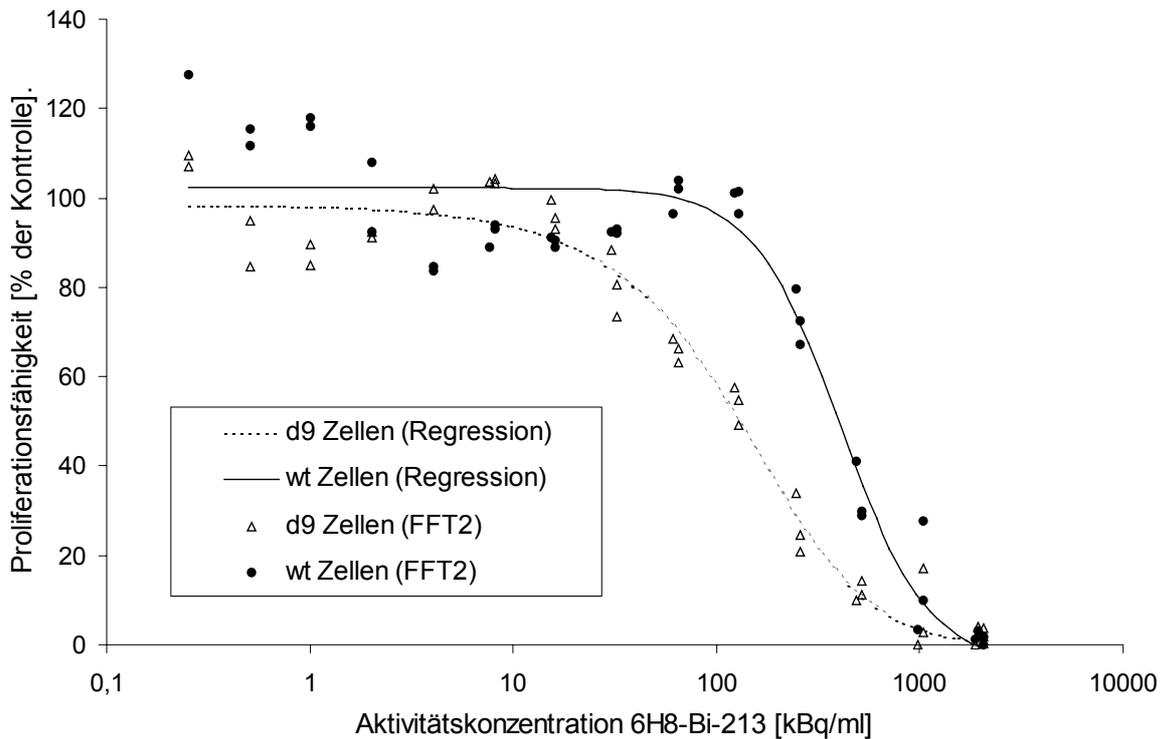
Zwei Magenkarzinomzelllinien, die zum Vergleich untersucht wurden, exprimierten wt E-Cadherin in einer Anzahl, die über dem Bereich der Standardbeads lag (über 180 000 Antigene/Zelle). Folglich ist eventuell auch die d9 E-Cadherin Expression in Magenkarzinomen, die diese Mutation zeigen höher als bei den MDA Zellen des untersuchten Tumorzellmodells.



**Abbildung 8** Vergleich der d9-E-Cadherin Expression auf transfizierten MDA Zellen mit standardisierten Beads

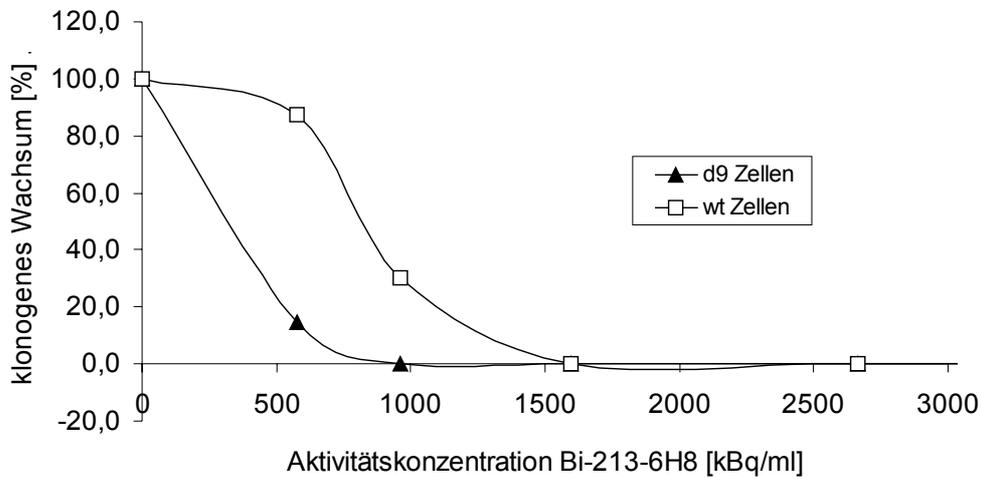
#### **6.4 Toxizität von $^{213}\text{Bi}$ -6H8 an Zellsuspensionen, Zellpellets und Spheroiden**

Ab einer Aktivitätskonzentration von 37 kBq/ml wird ein zytotoxischer Effekt auf d9 E-Cad exprimierende Zellen in Suspension nachweisbar, während die wt E-Cad Kontrolle erst ab 148 kBq/ml abnehmende  $^3\text{H}$ -Thymininkorporierung (Proliferationsfähigkeit) zeigt. Der Unterschied zwischen den beiden Zelllinien, d.h. der selektive Effekt des Radioimmunkonjugates ist deutlich zwischen 37 kBq/ml und 740 kBq/ml. Bei höheren Aktivitätskonzentrationen werden beide Zelllinien zu fast 100 % devitalisiert. 50 % der d9 E-Cad Zellen sind bei 130 kBq/ml ( $\text{LD}_{50}$ ) abgetötet, während erst bei 444 kBq/ml 50 % der wt E-Cad Zellen abgetötet wurden (Abbildung 9). Bei ca. 222 kBq/ml  $^{213}\text{Bi}$ -6H8 ist die selektive Wirkung auf d9 E-Cad Zellen am deutlichsten. Diese Aktivitätskonzentration entspricht bei der mittleren spezifischen Aktivität von 1,11 MBq/mg einer Antikörperkonzentration von 200 ng/ml.



**Abbildung 9** Proliferationsfähigkeit von wt E-Cad und d9 E-Cad transfezierten MDA MB 435 S Zellen in Suspension in Abhängigkeit der  $^{213}\text{Bi}$ -6H8 Konzentration (mittlere spezifische Aktivität: 1,11 MBq/mg) Die Datenpunkte der einzelnen Experimente wurden mittels Fast Fourier Transformation (FFT2) geglättet und eine nichtlineare Regression ( $y = y_0 + 2 \frac{A}{PI} \cdot \frac{w}{4 \cdot (x - x_c)^2 + w^2}$ ) wurde berechnet.

Die Ergebnisse des klonogenen Assays im 96 well Plate (Abbildung 10) sind in relativ guter Übereinstimmung mit den Messungen der  $^3\text{H}$ -Thymidininkorporierung. Die  $\text{LD}_{50}$  lagen bei 333 kBq/ml für d9 E-Cad exprimierende Zellen und bei 814 kBq/ml für wt E-Cad exprimierende Zellen. Damit lag der  $\text{LD}_{50}$  im Vergleich zur  $^3\text{H}$ -Thymidininkorporierung etwas höher, aber mit einem vergleichbaren Unterschied zwischen beiden Zellen.



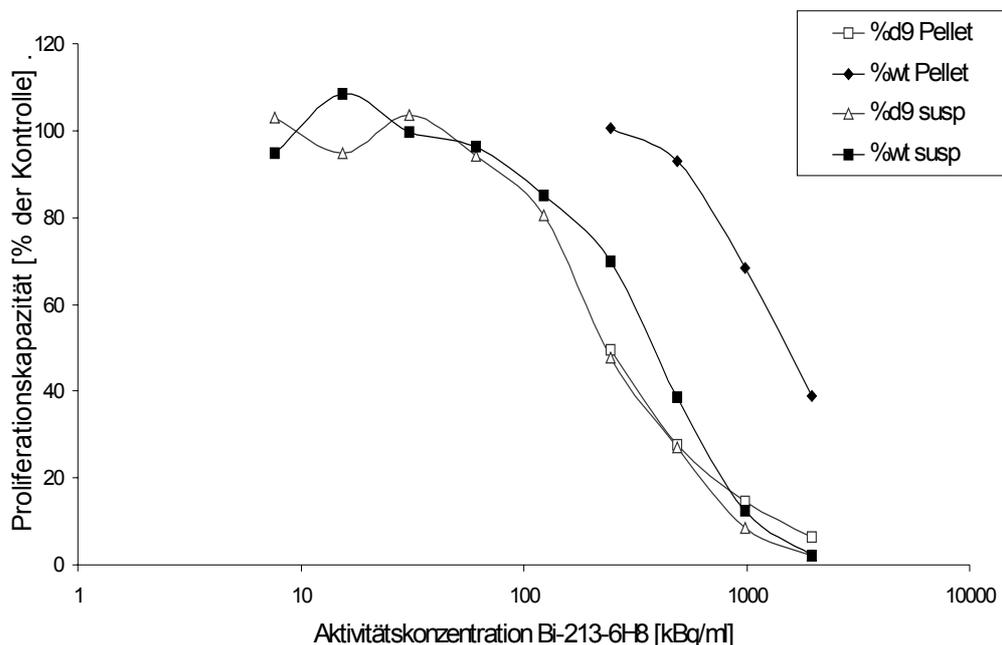
**Abbildung 10** klonogenes Wachstum der d9 E-Cad und wt E-Cad Zellen in Abhängigkeit der  $^{213}\text{Bi}$ -6H8 Konzentration. Für jeden Datenpunkt wurde 2 Wochen nach Therapie die wells mit wachsenden Klonen eines 96 well plates gezählt.

Der Crossfire Effekt von  $^{213}\text{Bi}$ -6H8, das an Nachbarzellen in einem kompakten Zellpellet zerfällt, hat die Zytotoxizität des Radioimmunkonjugates auf die Zellen im Pellet im Vergleich zu Zellen in Suspension nicht erhöht. Bei d9 E-Cad exprimierenden Zellen ist die Wirkung nahezu identisch während bei den wt E-Cad exprimierenden Zellen dagegen die Toxizität von  $^{213}\text{Bi}$ -6H8 nach Bildung eines Zellpellets im Mittel um 40% vermindert wird. Dabei kann der zytotoxische Effekt des Radionuklids auf wt E-Cad Zellen erst ab 370 kBq/ml nachgewiesen werden und bei der maximalen Aktivität von 1,96 MBq/ml überleben noch 40 % der Zellen des Pellets.

Diese Ergebnisse lassen die Wichtigkeit der Hintergrundstrahlung, d.h. der nicht gebundenen Aktivität bei den Versuchen erkennen. Die Konzentration von ungebundenem Radioimmunkonjugaten ist in Zellpellets wesentlich niedriger als in der Zellsuspension, da das Zwischenzellvolumen durch die dicht aneinanderliegenden Zellen zum Teil verdrängt ist und somit nicht gebundenes Radioimmunkonjugat durch die Zentrifugation abgetrennt wird. Um die gleiche Toxizität auf d9 E-Cad Zellen im Pellet wie bei Zellen in Suspension zu erreichen, muss der geringere Effekt der Hintergrundstrahlung durch das Kreuzfeuer der dicht

gepackten Zellen ausgeglichen werden. Folglich ist die Strahlendosis durch Crossfire Effekt von  $^{213}\text{Bi}$ -6H8 nach Bindung an die Zellen ähnlich der Strahlendosis auf Zellen in Suspension ohne Antikörperbindung.

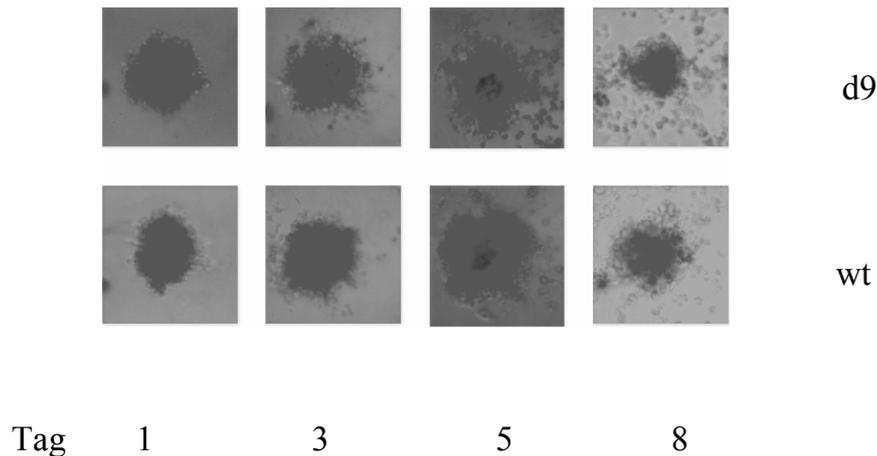
Im Gegensatz dazu ist aufgrund der fehlenden Antikörperbindung an wt E-Cad Zellen der zytotoxische Effekt durch Kreuzfeuer geringer und kann nicht die selben Schäden hervorrufen wie die Hintergrundstrahlung bei Zellen in Suspension.



**Abbildung 11** Zytotoxische Wirkung von  $^{213}\text{Bi}$ -6H8 auf Zellsuspensionen verglichen mit der Wirkung auf Zellen in Zellpellets. Es ist die Proliferationsfähigkeit, gemessen mit  $^3\text{H}$ -Thymidininkorporierung, gegen die Aktivitätskonzentration aufgetragen. ‚%d9 susp‘ sind d9 E-Cad exprimierende MDA Zellen in Suspension, ‚%wt susp‘ die wt E-Cad exprimierenden Kontrollen in Suspension. ‚%d9 Pellet‘ sind d9 exprimierende MDA Zellen, die kurz nach Behandlung pelletiert wurden und ‚%wt Pellet‘ sind die korrespondierenden wt E-Cad exprimierenden Kontrollen.

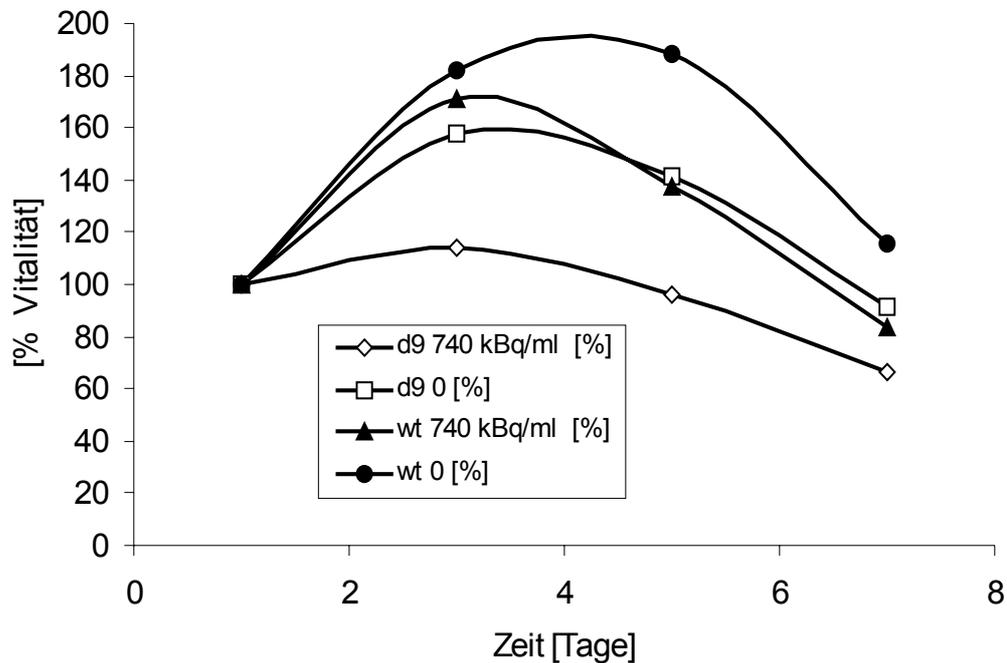
Mit einer Reichweite der  $^{213}\text{Bi}$  alpha-Partikel von 70  $\mu\text{m}$  ist eine Abtötung von Spheroiden mit Durchmessern um die 150  $\mu\text{m}$  zu erwarten, auch wenn in der kurzen Zeit eine Diffusion von großen Molekülen wie Antikörper in das Innere der Spheroide nicht möglich ist. Die Photographien von  $^{213}\text{Bi}$ -6H8 behandelten Spheroiden zeigen, dass Spheroide schon innerhalb weniger Tage zu zerfallen beginnen. Trotzdem zeigt die Sequenz der Spheroide in Abbildung 12 eine unterschiedliche Entwicklung der Größen von d9 E-Cadherin und wt E-Cadherin

tragenden Spheroiden. Die Größenzunahme bis Tag 3, ein Zerfall am Tag5 und ein kleines Restspheroid an Tag 8 entsprechen dem Zeitverlauf der gemessenen Vitalität (Abbildung 13).



**Abbildung 12** Representative Fotos von Spheroiden, die d9 E-Cad bzw. wt E-Cad exprimieren an Tag 1,3,5, und 8 nach Behandlung mit  $^{213}\text{Bi}$ -6H8.

Die Entwicklung der Spheroide zeigt auch im XTT Assay nach anfänglicher Zunahme der Vitalität eine Abnahme, wobei die Abnahme der Vitalität nicht durch  $^{213}\text{Bi}$  verursacht wurde. Lediglich die Stagnation der Vitalität in den ersten 3 Tagen wurde exklusiv bei den d9 E-Cad exprimierenden Zellen beobachtet, die mit 740 kBq/ml  $^{213}\text{Bi}$ -6H8 inkubiert wurden. Unbehandelte Kontrollen und die behandelte wt E-Cad Kontrolle zeigten über die 3 ersten Tage eine Progredienz der Vitalität (Abbildung 13). Diese spezifische Inhibition der Vitalität kann nur indirekte Hinweise auf die tatsächliche Abtötung der d9 E-Cad Spheroide durch  $^{213}\text{Bi}$ -6H8 geben. Da die Spheroide schon nach wenigen Tagen zerfallen, aber die Vitalität der Zellen erst nach wenigstens 1 oder 2 Zellgenerationen messbar abnimmt, ist die Methode der Vitalitätsmessung mittels XTT Tests wahrscheinlich nicht geeignet die Abtötung durch  $^{213}\text{Bi}$ -6H8 nachzuweisen. Der letale Effekt der alpha-Strahlung machte sich bei Zellen in Suspension erst nach 3-4 Tagen deutlich bemerkbar.

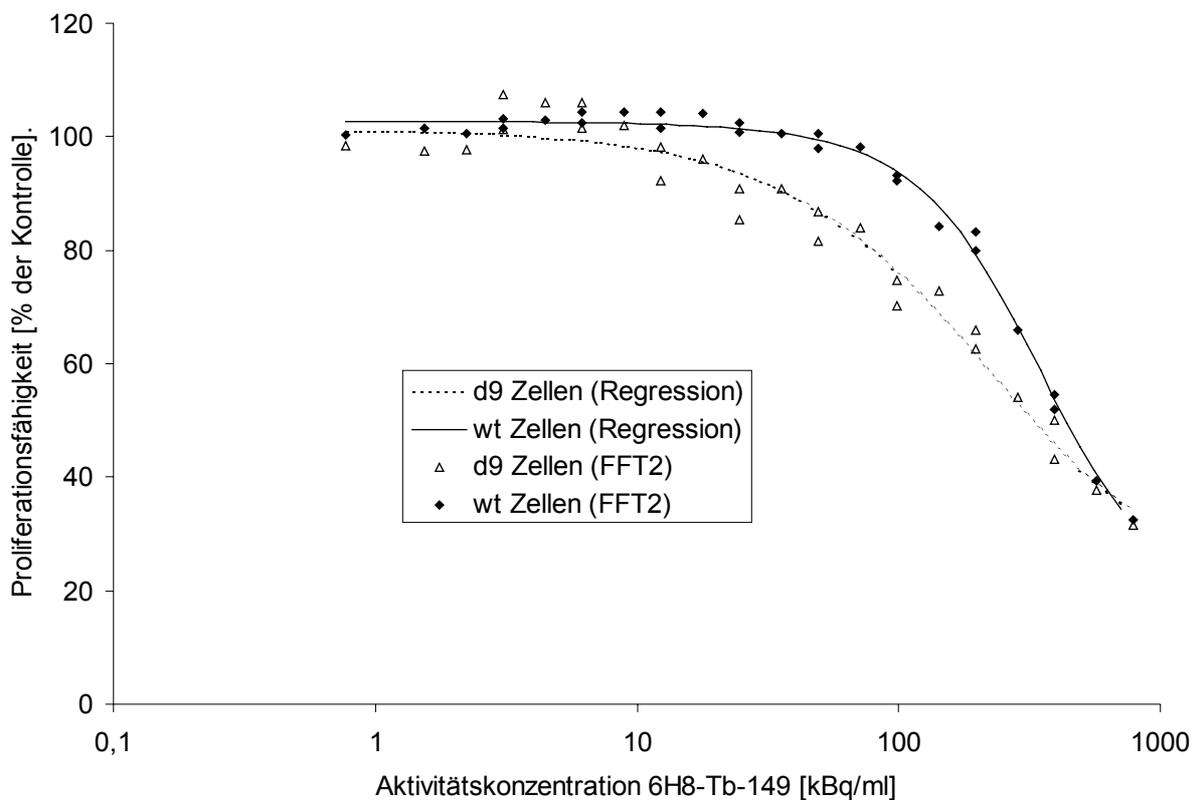


**Abbildung 13** Die Vitalität der Spheroiden nach  $^{213}\text{Bi}$ -6H8 wurde mittels XTT Assay bestimmt, die Angaben in % beziehen sich auf den ersten Messpunkt an Tag 1. Eine Aktivitätskonzentration von 740 kBq/ml  $^{213}\text{Bi}$ -6H8 hemmt ausschließlich das Wachstum der d9 E-Cad exprimierenden Spheroiden während Wachstumskontrollen und wt E-Cad Kontrolle eine Wachstumsprogression in den ersten 3 Tagen zeigen. Im weiteren Zeitverlauf nimmt die Vitalität der Spheroiden durch zunehmende Desintegration unabhängig von der Behandlung ab.

## 6.5 Toxizität von $^{149}\text{Tb}$ -6H8 an Zellsuspensionen, Zellpellets und Spheroiden

Der  $\text{LD}_{50}$  Wert für  $^{149}\text{Tb}$ -6H8 lag bei 333 kBq/ml für d9-E-Cad exprimierende Zellen und bei 444 kBq/ml für wt E-Cad Zellen in Suspension. Damit ist die Wirkung von  $^{149}\text{Tb}$  auf die MDA Zellen ohne Antikörperbindung identisch mit der von  $^{213}\text{Bi}$ . Trotz der 5 mal so langen Halbwertszeit (4,1 h für  $^{149}\text{Tb}$  versus 46 min für  $^{213}\text{Bi}$ ) ist die Anzahl der emittierten alpha-Partikel bei identischen Aktivitätskonzentrationen bei beiden Nukliden gleich. Dies liegt an dem geringen alpha-Anteil von 17% bei  $^{149}\text{Tb}$ , so dass nach vollständigem Zerfall der Nuklide die gleiche Anzahl von alpha-Partikeln emittiert wurden. Dieser geringe Anteil an alpha-Zerfällen bedingt auch einen etwas geringeren Unterschied zwischen d9 E-Cad Zellen und wt E-Cad Zellen nach  $^{149}\text{Tb}$ -6H8 Behandlung als nach Behandlung mit  $^{213}\text{Bi}$ -6H8. Bei einer

Aktivitätskonzentration von 74 kBq/ml liegt ein deutlicher spezifischer Effekt des  $^{149}\text{Tb}$  Immunokonjugates vor, bei dem zwar nur 15% der Zellen abgetötet sind, aber der Unterschied zwischen beiden Zelllinien einen Faktor 2 ergibt. Die Antikörperkonzentration liegt bei dieser Aktivitätskonzentration bei 670 ng/ml. Daraus ergibt sich im Vergleich zu  $^{213}\text{Bi}$ -6H8, dass eine höhere Anzahl von gebundenen Radioimmunkonjugaten notwendig ist um die Proliferationsfähigkeit der Zellen durch  $^{149}\text{Tb}$  Immunkonjugate zu verringern (Abbildung 14).



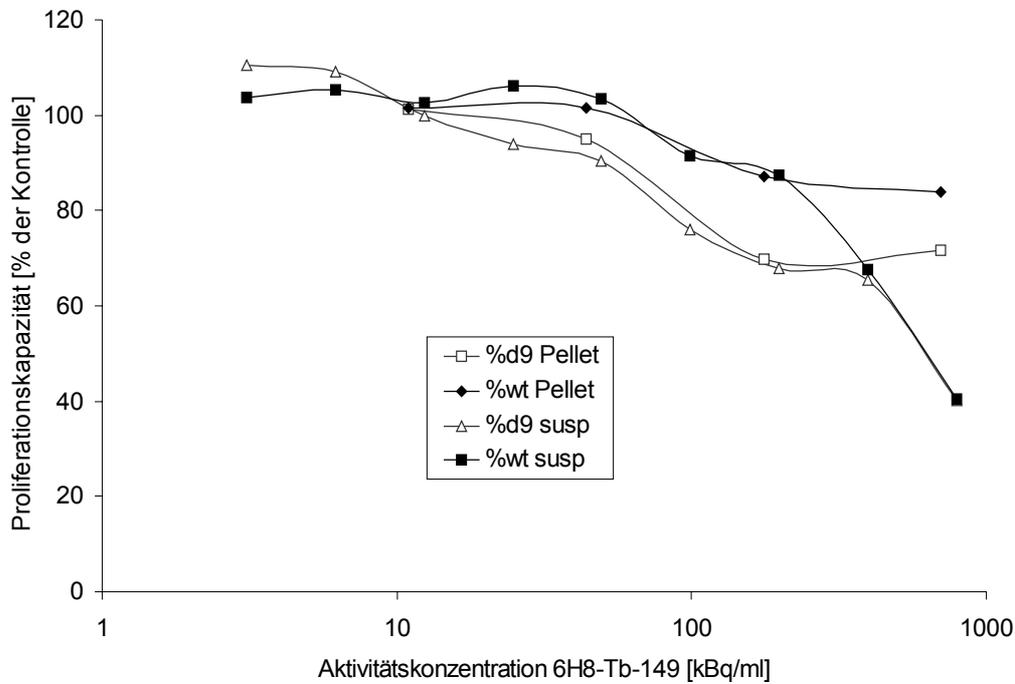
**Abbildung 14** Proliferationsfähigkeit von wt E-Cad und d9 E-Cad transfizierten MDA MB 435 S Zellen nach Inkubation in Suspension mit  $^{149}\text{Tb}$ -6H8 (mittlere spezifische Aktivität: 111 kBq/mg)

Die Datenpunkte der einzelnen Experimente wurden mittels Fast Fourier Transformation (FFT2) geglättet und

eine nichtlineare Regression ( $y = y_0 + 2 \frac{A}{PI} \cdot \frac{w}{4 \cdot (x - x_c)^2 + w^2}$ ) wurde berechnet.

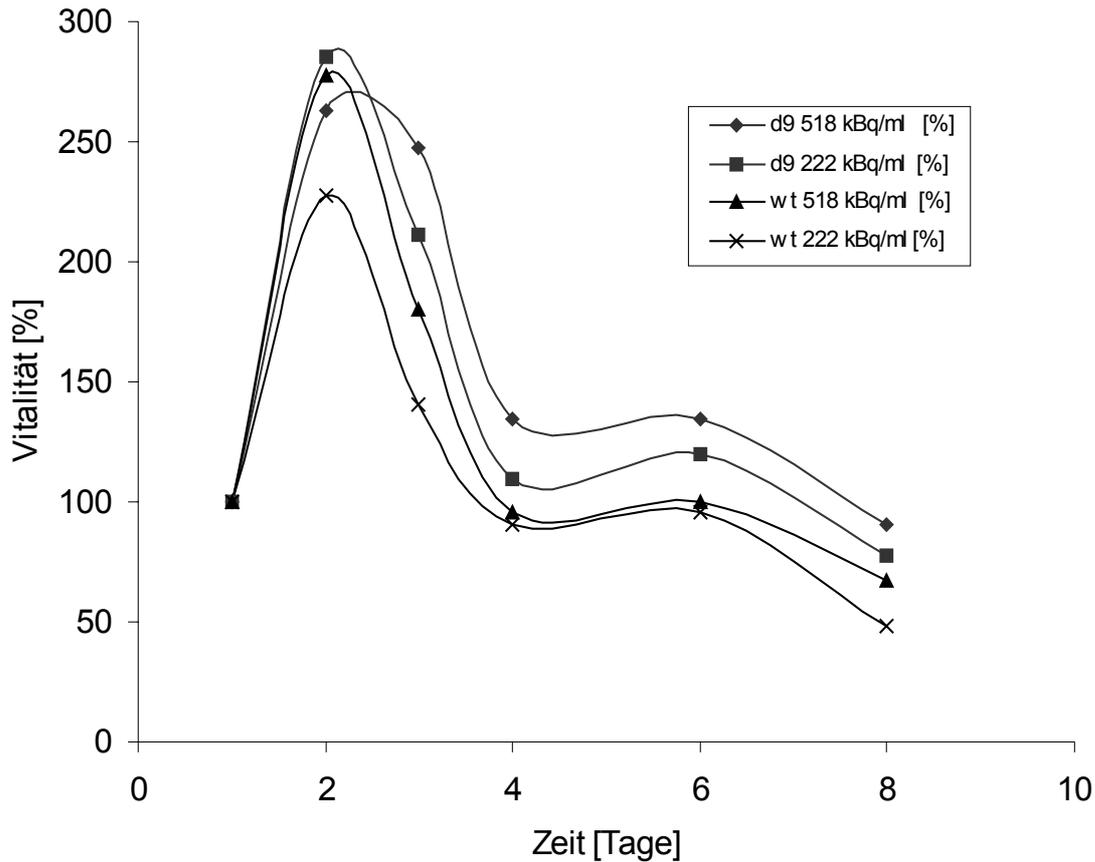
Versuche an den Zellpellets zeigen, dass bei  $^{149}\text{Tb}$  auch der Crossfire Effekt geringer ausgeprägt ist. Zum einen hat  $^{149}\text{Tb}$  bis zu einer Aktivitätskonzentration von 370 kBq/ml auf Zellen im Pellet einen gleichen Effekt wie auf Zellen in Suspension und zum anderen wird

auch bei einer Aktivitätskonzentration von 740 kBq/ml nur eine Abtötung von ca 20% der Zellen erreicht (Abbildung 15).



**Abbildung 15** Zytotoxische Wirkung von  $^{149}\text{Tb}$ -6H8 auf Zellsuspensionen verglichen mit der Wirkung auf Zellen in einem Zellpellet. Es ist die Proliferationsfähigkeit, gemessen mit  $^3\text{H}$ -Thymidininkorporierung, gegen die Aktivitätskonzentration aufgetragen. ‚%d9 susp‘ sind d9 E-Cad exprimierende MDA Zellen in Suspension, ‚%wt susp‘ die wt E-Cad exprimierenden Kontrollen in Suspension. ‚%d9 Pellet‘ sind d9 exprimierende MDA Zellen, die kurz nach Behandlung pelletiert wurden und ‚%wt Pellet‘ sind die korrespondierenden wt E-Cad exprimierenden Kontrollen.

Spheroide die mit 222 kBq/ml und 518 kBq/ml  $^{149}\text{Tb}$ -6H8 behandelt wurden zeigen unabhängig von ihrer Antigenexpression eine anfängliche Progredienz der Vitalität und dann ein Zurückgehen der Vitalität auf die Ausgangswerte. Dieser Verlauf entspricht dem Verlauf der unbehandelten Kontrollen und ein Effekt von  $^{149}\text{Tb}$  auf d9 E-Cad oder wt E-Cad MDA Zellen in Spheroide ist bei den niedrigen Aktivitätskonzentrationen nicht erkennbar (Abbildung 16).



**Abbildung 16** Die Vitalität der Spheroide nach  $^{149}\text{Tb-6H8}$  Inkubation wurde mittels XTT Assay bestimmt, die Angaben in % beziehen sich auf den ersten Messpunkt an Tag 1. Die d9 E-Cad und wt E-Cad exprimierenden Spheroide zeigen keinen zytotoxischen Effekt von  $^{149}\text{Tb-6H8}$ . Bei allen Spheroide nimmt die Vitalität anfänglich stark zu und bleibt dann zwischen 4 und 8 Tagen nach Radioimmunbehandlung nahezu konstant.

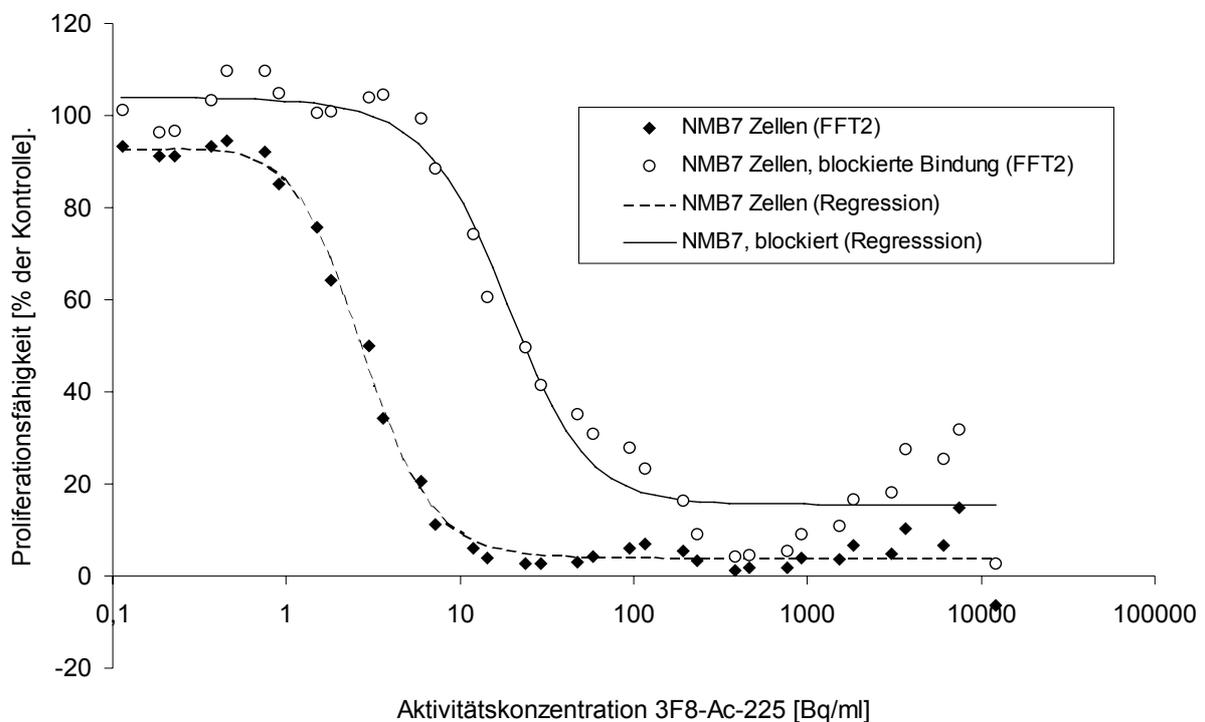
## 6.6 Zytotoxizität von $^{225}\text{Ac-3F8}$ und $^{225}\text{Ac-HuM195}$

In Abbildung 17 und Abbildung 18 sind Zytotoxizitätsversuche an Zellen in Suspension mit den Radioimmunokonjugaten  $^{225}\text{Ac-3F8}$  und  $^{225}\text{Ac-HuM195}$  dargestellt.

Im Gegensatz zur  $^{225}\text{Ac}$  Markierung des Antikörpers HuM195 wurde die Markierung des Antikörpers 3F8 mittels Zweischnittmethode und dem DOTA Chelat durchgeführt. Diese Methode liefert ein über mindestens 15 Tage (McDevitt et al. 2001) stabil an den Antikörper gekoppeltes  $^{225}\text{Ac}$ . Bei den Zytotoxizitätsversuchen des  $^{225}\text{Ac-3F8}$  ergab sich ein  $\text{LD}_{50}$  von 3,3 Bq/ml (spez. Aktivität: 1,3 MBq/mg) für native NMB7 Neuroblastom Zellen und ein  $\text{LD}_{50}$  von 30 Bq/ml für die gleiche Zelllinie, die vor Behandlung mit einem Überschuss an unmarkiertem Antikörper inkubiert wurde (Abbildung 17).

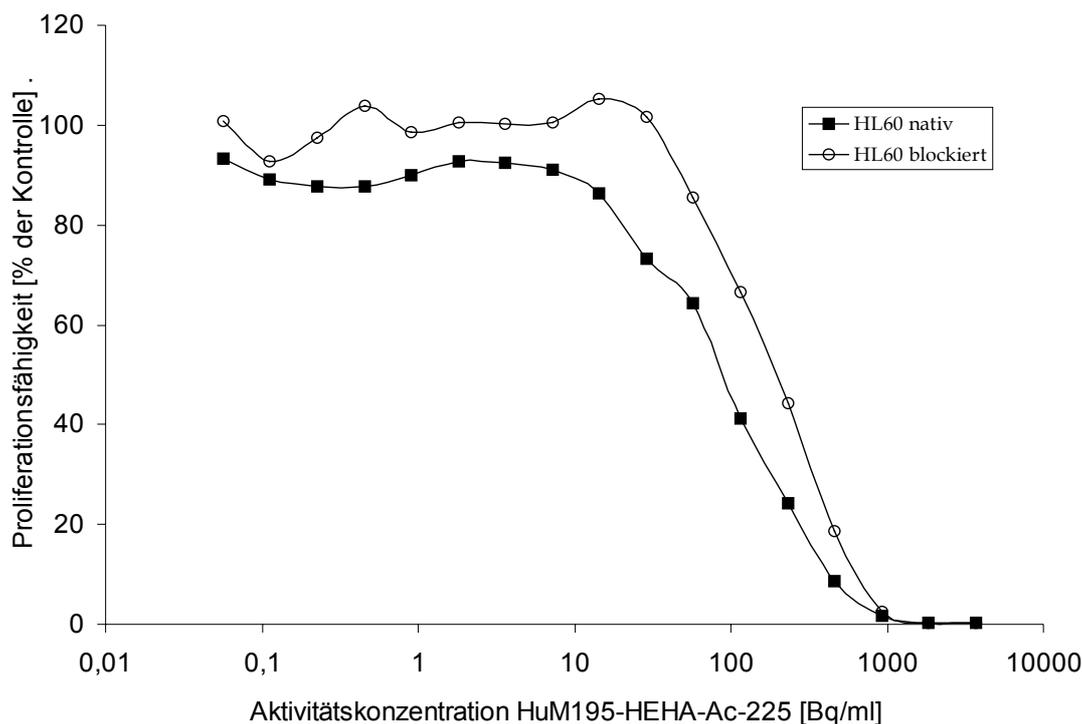
Der  $\text{LD}_{50}$  Wert der HL60 Zellen ist 148 Bq/ml nach Inkubation mit  $^{225}\text{Ac-HuM195}$ , wobei die gleiche Zelllinie einen  $\text{LD}_{50}$ -Wert von 259 Bq/ml zeigt wenn die Zellen vorher mit einem Überschuss von kaltem Antikörper inkubiert wurden (Abbildung 18). Bei diesem Versuch

wurde mit dem HEHA Chelat gearbeitet, welches ca. 50% des initial chelatierten  $^{225}\text{Ac}$  nach 3-4 Tagen freisetzt (McDevitt et al. 2000). Aufgrund dieses Verlustes geht auch ein Teil der spezifisch gebundenen aber nicht internalisierten Radioaktivität für die zielgerichtete Therapie verloren. Des weiteren wurde in diesen Versuchen mit relativ geringer spezifischer Aktivität gearbeitet (421 kBq/mg). Diese Ergebnisse lassen sich folglich nur eingeschränkt mit den Ergebnissen der Versuche mit  $^{225}\text{Ac}$ -3F8,  $^{213}\text{Bi}$ -6H8 und  $^{149}\text{Tb}$ -6H8 vergleichen. Bei DOTA Chelatierung wie in 5.2.3 beschrieben und bei höheren spezifischen Aktivitäten sind weitaus bessere Ergebnisse bezüglich des Unterschiedes zwischen Antigen positiven Zellen und Zellen mit blockierten Bindungsstellen zu erwarten.



**Abbildung 17** Proliferationsfähigkeit von NMB7 Neuroblastomzellen nach Inkubation in Suspension  $^{225}\text{Ac}$ -3F8 Die negativ Kontrolle besteht aus NMB7 Zellen, bei denen die Bindungsstellen vor der Behandlung mit unmarkiertem Antikörper 3F8 blockiert wurden. Die Datenpunkte der einzelnen Experimente wurden mittels Fast Fourier Transformation (FFT2) geglättet und eine nichtlineare Regression

$$(y = y_0 + 2 \frac{A}{PI} \cdot \frac{w}{4 \cdot (x - x_c)^2 + w^2}) \text{ wurde berechnet.}$$

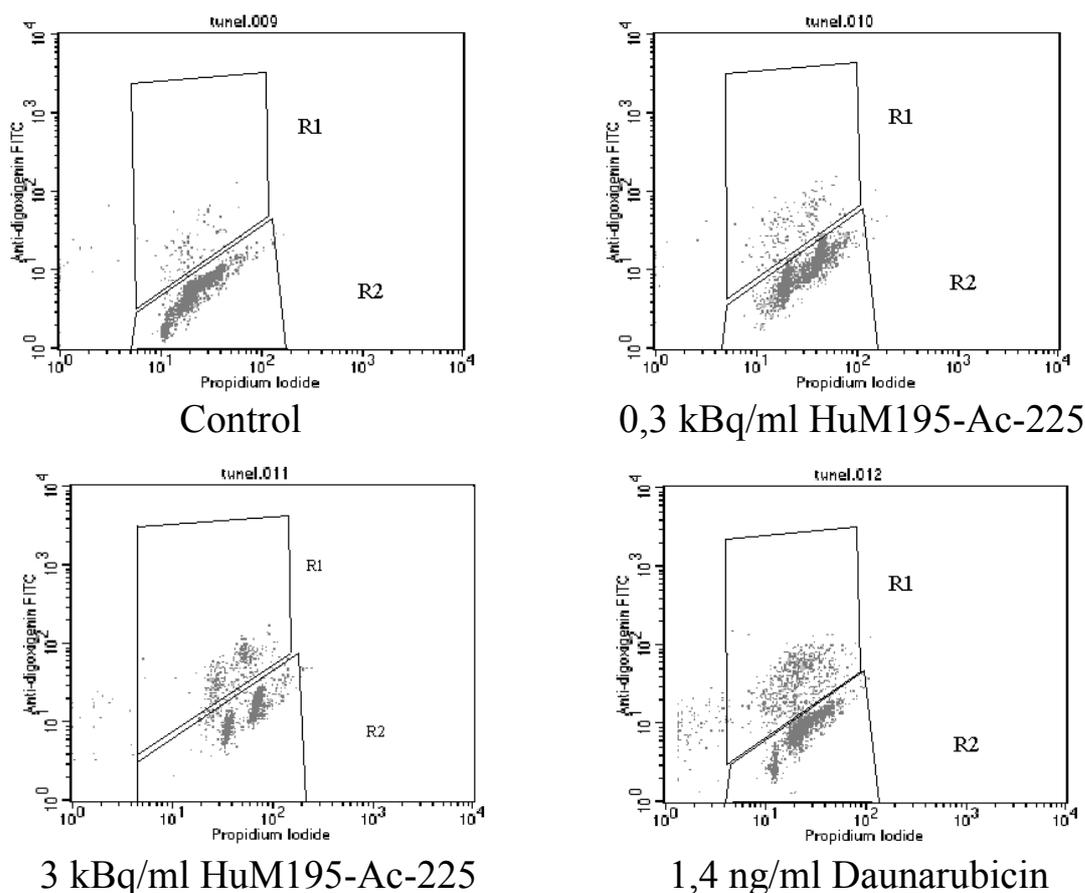


**Abbildung 18** Proliferationsfähigkeit von HL60 Zellen nach Inkubation mit  $^{225}\text{Ac}$ -HuM195. Bei diesem Versuch wurde  $^{225}\text{Ac}$  über das relativ instabile HEHA Chelat an den Antikörper gekoppelt.

## 6.7 Induktion von Apoptose

Von den untersuchten Zelllinien MDA, NMB7 und HL60 wurde nur bei den HL60 Zellen Apoptose mit dem Tunel Assay nachgewiesen. Die Mittelwerte der Fluoreszenz (siehe Tabelle 4), die proportional der mittleren Anzahl der freien DNA Enden pro Zelle sind, erhöhen sich durch apoptotische Zellen. Ein direkter Vergleich von unterschiedlichen Zellen ist dabei aber nicht möglich, da schon z.B. aufgrund unterschiedlicher Größen der Zellen die unspezifische Fluoreszenz stark variiert. Die gemessenen Fluoreszenzen sind also relativ zu den jeweiligen Kontrollen zu betrachten. In der graphischen Auswertung des Histogramms wird die Stärke der Fluoreszenz im FL1 Kanal, d.h. die Intensität des FITC Signals gegen die Anzahl der Zellen aufgetragen. Somit lässt sich die apoptotische Zellfraktion von den nicht apoptotischen Zellen quantitativ trennen. Die Anzahl der apoptotischen Zellen lässt sich so in Prozent angeben. Diese Trennung wird aber durch den unterschiedlichen DNA Gehalt der Zellen beeinflusst. Eine Zelle in der G2 Phase des Zellzyklus hat eine doppelt so hohe DNA Menge wie Zellen in der G1 Phase. Das bedingt eine Variation der freien DNA Enden auch

ohne den Einfluss von Apoptose. Durch zusätzliche Färbung der Zellen mit dem DNA Farbstoff Propidium Iodid (PE) kann die DNA Menge quantifiziert und so die relative Anzahl der freien DNA Enden bestimmt werden. Da die Farbstoffe FITC und PE unterschiedliche Wellenlängen emittieren, kann, nach Korrektur der geringen Interferenz, für jede einzelne Zelle die DNA Menge (PE Farbstoff im FL2 Kanal gemessen) und die Fluoreszenz des Tunel Assays (FITC Farbstoff im FL1 Kanal gemessen) bestimmt werden. Durch diese Methode erhöhte sich die Messgenauigkeit aber nur um ca. 10% (Abbildung 19), so dass für weitere Versuche auf die kompliziertere Zweitfärbung verzichtet wurde.



**Abbildung 19** Tunel Assay, 40h nach Inkubation von HL60 Zellen mit 0,3 bzw. 3 kBq/ml <sup>225</sup>Ac-HuM195; die negativ Kontrolle wurde nicht behandelt und die positiv Kontrolle wurde mit 1,4 ng/ml Daunorubicin versetzt. Mittels Propidium Iodid Färbung wurde der DNA Gehalt jeder Zelle quantifiziert und gegen die Menge an freier DNA Enden aufgetragen (Anit-Digoxigenin FITC). Das Gate R1 bestimmt die Anzahl der apoptotischen Zellen und das Gate R2 die Anzahl an lebenden oder nekrotischen Zellen.

Bei den negativ Kontrollen lag die apoptotische Fraktion bei allen 3 Zelllinien unter 5%. Als Apoptose positiv wurde eine Fraktion von mehr als 10% apoptotischer Zellen gewertet. Zwischen 5% und 10% apoptotischer Zellen wurden das Signal nicht gewertet und als Graubereich angesehen. Einen sicheren Hinweis für Apoptose liefert eine Verdopplung des

mittleren Fluoreszenzsignales über den ersten Messwert. Das entspricht einer Apoptoserate von ca. 20 %. Dieser Vergleich mit der Ausgangsmessung ist am sensitivsten bei der alleinigen Betrachtung der Mittelwerte. Versuche an HL60 Zellen mit dem Chemotherapeutikum Daunorubicin und dem <sup>225</sup>Ac markierten Antikörper HuM195 zeigten, dass sich auch bei genauerer Auswertung mittels zweier Fluoreszenzmarkern keine Apoptose an den Zeitpunkten 6, 16, 20 und 24 h nach Inkubationsbeginn beobachten lässt. Erst nach 40h wurden apoptotische Zellen nachgewiesen (Abbildung 19).

MDA Zellen nach Bi-213-6H8 Inkubation				NMB7 Zellen nach Ac-225-3F8 Inkubation			
Control	Zell zahl	Mean	Apoptose	Control	Zell zahl	Mean	Apoptose
1d	10000	5,97		1d			
2d	1950	17,82		2d	9390	30,72	
3d	10000	5,18		3d	10000	24,50	
4d	10000	9,58		4d	10000	8,80	
low (185 kBq/ml)				low (7,4 Bq/ml)			
1d	10000	6,06		1d			
2d	2040	11,90		2d	10000	40,30	
3d	10000	7,28		3d	10000	29,94	
4d	1515	10,90		4d	10000	31,70	
high (1,1 MBq/ml)				high (370 Bq/ml)			
1d	10000	6,79		1d			
2d	3045	21,07		2d	4125	38,91	
3d	810	21,84		3d	2595	33,90	
4d	6840	6,34		4d	3015	32,20	
daunorubicin (5 ng/ml)				HL60 (370 Bq/ml)			
1d	10000	8,44		1d	10000	6,01	
2d	285	32,38		2d	10000	8,52	
3d	270	30,62		3d	10000	12,32	
4d	10000	2,77		4d	10000	14,39	

HL 60 Zellen nach Tb-149-HuM195 Inkubation				HL 60 Zellen nach Ac-225-HuM-195 Inkubation			
Control	Zell zahl	Mean	Apoptose	control	Zell zahl	Mean	Apoptose
22h	10000	16,58		24h	10000	9,00	
30h	10000	19,40		40h	10000	6,37	
46h	10000	17,96		46h	10000	7,57	
54h	10000	14,24		low (300 Bq/ml)			
70h	10000	16,71		24h	10000	14,11	
78h	10000	14,83		40h	10000	14,34	
low (333 kBq/ml für 20 min)				46h	10000	<b>22,87</b>	6%
22h	10000	33,99		high (3 kBq/ml)			
30h	10000	27,86		24h	10000	18,16	
46h	10000	28,68		40h	10000	<b>20,85</b>	11%
54h	10000	25,59		46h	10000	<b>41,86</b>	22%
70h	10000	<b>48,14</b>	24%	daunorubicin (1,4 ng/ml)			
78h	10000	<b>48,57</b>	24%	24h	10000	9,67	
high (1,67 MBq/ml für 20 min)				40h	10000	13,01	
22h	10000	26,84		46h	10000		
30h	10000	30,53					
46h	10000	16,41					
54h	10000	37,18					
70h	10000	<b>175,02</b>	68%				
78h	10000	<b>135,94</b>	58%				

**Tabelle 4** Apoptosefähigkeiten der untersuchten Zelllinien nach Behandlung mit verschiedenen alpha - Immunokonjugaten. ‚Mean‘ bedeutet die mittlere Fluoreszenz der Zellen nach Analyse mit einem TUNEL Assay für FACS Analyse. Bei apoptotischen Zellen wurde durch Quantifizierung der verschiedenen Fluoreszenzen im Histogramm der genaue Prozentsatz angegeben.

## 6.8 Chromosomenaberrationen

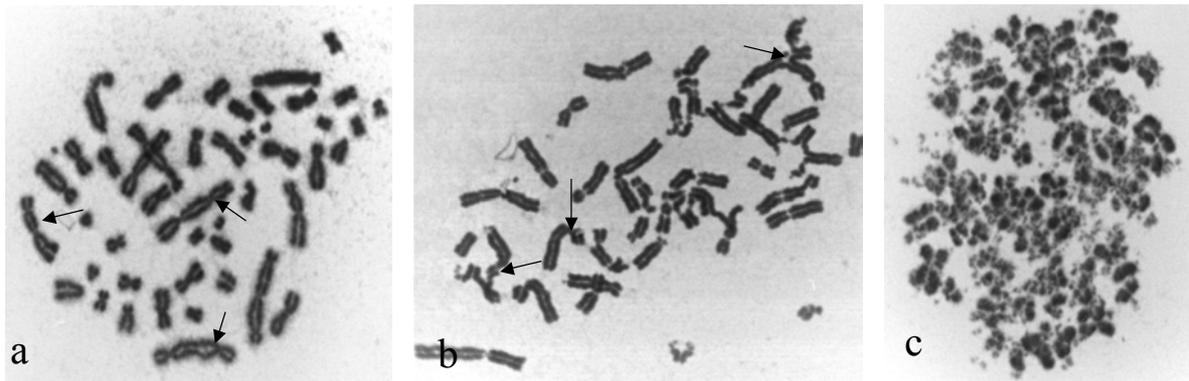
In Tabelle 5 sind die Chromosomenschäden nach Behandlung mit  $^{213}\text{Bi}$ -6H8 aufgeführt. Der Prozentsatz der Chromosomenschäden, der durch die alpha-Partikel verursacht wurde, entspricht ungefähr der Abtötung der Zellen, gemessen mit  $^3\text{H}$ -Thymidininkorporierung. Bei einer Aktivitätskonzentration von 740 kBq/ml wurden bei 50% der Zellen Chromosomen Schäden nachgewiesen. Verglichen mit dem  $\text{LD}_{50}$ -Wert nach  $^3\text{H}$ -Thymidininkorporierung von 111-444 kBq/ml liegt die erforderliche Aktivitätskonzentration etwas höher. Diese Diskrepanz lässt sich zu einem Teil mit der etwas kürzeren Inkubationszeit erklären (2h bei Chromosomenanalyse und mehr als 10 Halbwertszeiten bei  $^3\text{H}$ -Thymidininkorporierung). Der wesentliche Unterschied in den beiden Versuchen ist aber die Art der Behandlung der Zellen. Bei der  $^3\text{H}$ -Thymidininkorporierung wurden Zellsuspensionen mit Radioimmunkonjugaten inkubiert während bei den Chromosomenanalysen Monolayer der Zellen mit  $^{213}\text{Bi}$ -6H8 inkubiert wurde. Bei Zellen, die zum Zeitpunkt der Behandlung adhären sind, können alpha-Partikel von der Adhäsionsfläche her nicht in die Zelle eintreten, so dass der Strahleneffekt auf die Zellen bei gleicher Aktivität geringer sein muss. Ein Unterschied zwischen d9 E-Cad exprimierenden und wt E-Cad exprimierenden MDA Zellen ist nur bei Betrachtung der multiplen Chromatidtyp-Schäden erkennbar. D9 E-Cad MDA Zellen erfuhren bei hohen Aktivitätskonzentrationen sehr viel mehr Chromatidtyp-Schäden, oft kombiniert mit vorzeitiger DNA Kondensaton, als wt E-Cad Zellen. Die Anzahl aller Schäden unterschied sich hingegen nicht bei beiden Zelllinien.

Abbildung 20 zeigt die analysierten Chromosomenschäden von Chromosomentyp, vom Chromatidtyp sowie vorzeitige DNA Kondensation (premature chromosomal condensation, PCC). Chromosomentyp-Schäden zeichnen sich durch den Nachweis von z.B. dizentrischen Chromosomen auf während bei Chromatidtyp-Schäden z.B. Verlust von Telomeren erkennbar ist.

**Tabelle 5** Chromosomenschäden in d9 und wt transfizierten MDA MB435S Zellen 3 Tage nach Inkubation mit unterschiedlichen Aktivitäten von <sup>213</sup>Bi-6H8. S-cells: Zellen mit strukturellen Chromosomenaberrationen, PCC: premature chromosome condensation

Cell line (nuclide)	Activity (μCi/ml)	Cells scored	Normal cells (%)	S-cells (%)	Number of cells with structural chromosome aberrations							
					Chromatid type aberrations			Chromosome type aberrations				
					moderate	multiple	multiple +PCC	moderate	heavy	multiple	multiple +PCC	
Δ9 ( <sup>213</sup> Bi)	0	100	96	4	1			3				
	20	100	52	48	1	1		26	13		7	
	40	100	18	82	1	5	5	24	32	2	13	
	130	100	5	95		28	6	1	33	15	12	
WT ( <sup>213</sup> Bi)	0	100	91	9	1			8				
	20	100	49	51				32	17		2	
	40	100	19	81	1	2		36	28	2	12	
	130	100	1	99	1	14	2	3	27	26	26	
MPE ( <sup>213</sup> Bi)	0	100	99	1	1							
	20	100	54	46	2	9		27	6		2	
	40	100	35	65	3	30		8	18	1	5	
	130	50	0	100		31			2	17		





**Abbildung 20** Durch  $^{213}\text{Bi}$  verursachte Chromosomenschäden  
 Mitosen der d9 E-Cadherin positiven Zellen. Die wt E-Cadherin Zellen zeigten besonders bei schweren kombinierten Schäden bis zu 50% weniger Schäden.  
 a. Schäden vom Chromosomentyp, b. Chromatidtypschäden c. premature chromosomal condensation

## 7 Diskussion

### 7.1 Bewertungen von Ergebnissen aus in vitro Untersuchungen

Zur Untersuchung der Radioimmunkonjugate wurden in dieser Arbeit in vitro Zellmodelle herangezogen. Die gute Reproduzierbarkeit aufgrund der im Vergleich zu in vivo Experimenten geringen Streuung der biologischen Parameter erlaubt es Vergleiche anzustellen und theoretische Überlegungen zu untermauern. In vitro Experimente können mit geringem Aufwand eine Reihe von Eigenschaften der Radioimmunkonjugate darstellen. Ein erster Schritt in dieser Arbeit war es die Antigendichte auf den Zellen zu bestimmen. Mit Hilfe der Antigendichte und der spezifischen Aktivität der Radioimmunkonjugate kann dann z.B. die maximal erreichbare Anzahl an spezifisch gebundenen alpha-Partikeln pro Einzelzelle berechnet werden. Diese Anzahl liegt bei MDA MB 435S Zellen bei 9 alpha-Partikeln nach Inkubation mit  $^{149}\text{Tb}$ -6H8 (17% alpha-Emission) und bei 55 nach Inkubation mit  $^{213}\text{Bi}$ -6H8 (100% alpha-Emission). Die maximal erreichbaren alpha-Partikel bei  $^{225}\text{Ac}$ -HuM an HL60 Zellen (ca.  $1,5 \cdot 10^4$  Antigene pro Zelle) lag bei nur 1 und im Gegensatz dazu für  $^{225}\text{Ac}$ -3F8 an NMB7 Zellen (ca.  $5 \cdot 10^6$  Antigene pro Zelle) bei 260. Diese Werte gelten für die eingesetzten spezifischen Aktivitäten und erhöhen sich mit Erhöhung der spezifischen Aktivität.

Eine der wichtigsten Eigenschaften der Antikörper ist die Affinität zu ihren Bindungsstellen. Aus den verschiedenen Affinitäten von Antikörpern resultieren verschiedene hohe Hintergrundstrahlungen von ungebundenen Radioimmunkonjugaten. Um einen bestimmten Prozentsatz Bindungsstellen auf den Zellen zu besetzen ist je nach Affinität eine bestimmte Antikörperkonzentration notwendig. Aus dieser Antikörperkonzentration und der gegebenen spezifischen Aktivität resultiert die unspezifische Hintergrundstrahlung. Eine zu hohe Affinität kann sich bei soliden Tumoren aber auch nachteilig auswirken, wenn hohe Tumormassen die gesamte Aktivität abfangen, ohne dass die Antikörper an alle Tumorzellen binden können. Besonders bei in vivo Versuchen kann eine zu hohe Affinität von Antikörpern eine hohe Kreuzreaktivität mit gesundem Gewebe verursachen. Bei der Lymphomtherapie wurde dieser Effekt in die Berechnung der einzusetzenden spezifischen Aktivität mit einbezogen. Es werden in manchen Studien vor der therapeutischen Dosis Testdosen mit unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten gegeben und mittels nuklearmedizinischer Bildgebung das beste Tumor zu Hintergrund Verhältnis evaluiert (Scheidhauer, 2002, Lymphomstudie, Nuk/III.Med, Klinikum r. d. Isar, München). Auf diese Weise wird die Kreuzreaktion mit gesundem Gewebe bei jedem Patienten individuell bestimmt. Es hat sich aber deutlich gezeigt, dass eine Verabreichung von nativem Antikörper Rituximab vor der therapeutischen Applikation von  $^{131}\text{I}$ -Rituximab die Tumordosis nicht erhöht.

Internalisierung der Radioimmunkonjugate verursacht besonders bei  $^{225}\text{Ac}$  Konjugaten einen erheblichen Vorteil, da erst dann davon ausgegangen werden kann, dass der Zerfall der Töchter in der Zelle stattfindet. Auch bei  $^{149}\text{Tb}$  und  $^{213}\text{Bi}$  steigt nach Internalisierung die Wahrscheinlichkeit dass die Zelle bei Zerfall des Nuklids letale Schäden erhält. Der Einfluss der Internalisierungsfähigkeit von Antigen/Antikörper-Komplexen durch Tumorzellen auf den Therapieerfolg ist umstritten. Besonders bei Vorinkubation mit biotinierten Antikörpern und nachfolgender Applikation des avidingekoppelten Nuklids würde sich Internalisierung der Antigene sogar nachteilig auswirken (Paganelli et al. 1992).

Ein Vergleich der zytotoxischen Wirkung der verschiedenen Radioimmunkonjugate auf Antigen-positive Zellen und entsprechende Antigen-negative Kontrollzellen gibt einen Hinweis auf die Strahlensensibilität der Zellen und das Ausmaß des zytotoxischen Effekts durch zellgebundene und nicht gebundene Radioimmunkonjugate. Der Unterschied zwischen beiden Zelllinien, d.h. die Verstärkung der Zytotoxizität durch Antikörperbindung wurde hauptsächlich zur Bewertung der Ergebnisse herangezogen.

Die Reaktion der Zellen auf Bestrahlung mit alpha-Partikeln wurde durch Messung der Apoptosefähigkeit und der chromosomalen Aberrationen untersucht. Während Einigkeit

darüber besteht, dass für den Zelltod nach Bestrahlung DNA Schäden verantwortlich sind und dass Doppelstrangbrüche stärker schädigen als Einzelstrangbrüche, gibt es über die Relevanz der Apoptose keine aussagekräftigen Studien.

Dennoch sind in vitro Versuche immer nur der erste Schritt in der Entwicklung neuer Therapieansätze und einzelne Parameter können in vivo eine ganz andere Relevanz erfahren.

## **7.2 Bewertung von Strahlensensibilität, Internalisierung, Antikörper Affinität und Energie der alpha-Partikel**

Halbwertszeit, Energie der emittierten alpha-Partikel, Tochter Nuklide und Stabilität der Radioimmunkonjugate haben Einfluss auf Wirksamkeit und technische Durchführung von alpha-Radioimmuntherapie. Die Fähigkeit von alpha-Partikeln Apoptose zu erzeugen, könnte eine entscheidende Rolle in der zytotoxischen Wirkung gegenüber Tumorzellen spielen. Die Literatur über die Wirkung von alpha-Partikeln wirft auch Fragen auf wie stark DNA Doppelstrangbrüche an der Wirkung beteiligt sind und welchen Platz Einzelstrangbrüche oder Schäden in anderen Zellkompartimenten haben (Stewart 2001).

### **7.2.1 Strahlensensibilität der Zellmodelle**

Zum Vergleich der Strahlensensibilitäten der Zellen wurde der LD<sub>50</sub> Wert aller Kontrollzelllinien, die mit Radioimmunkonjugaten in Suspension behandelt worden sind betrachtet. Aufgrund der verschiedenen Halbwertszeiten wurde die Anzahl der emittierten alpha-Partikel die über die gesamte Behandlung emittiert wurden berechnet (Tabelle 6). Aus der Formel:

$$N = t_{1/2} \frac{A}{\ln 2}$$

N: Anzahl der Atome

A: Aktivität

t<sub>1/2</sub>: Halbwertszeit

ergibt sich für die verschiedenen Aktivitätskonzentrationen bei jedem Isotop die Anzahl an alpha-Partikeln pro Volumen. Bei der Berechnung der alpha-Partikel für <sup>225</sup>Ac musste ein Korrekturfaktor von 0,3 eingeführt werden, da die Messung der Zytotoxizität vor dem vollständigen Zerfall der Nuklide durchgeführt wurde. Nach 5 Tagen Inkubation sind bei der Halbwertszeit von 10 Tagen für <sup>225</sup>Ac nach der Formel:

$$A = A_0 \cdot e^{\left(\frac{-\ln 2}{t_{1/2}}\right)}$$

30 % der Aktivität zerfallen. Die Anzahl der emittierten alpha-Partikel ging mit 0,17 für Tb und mit 4 für <sup>225</sup>Ac in die Berechnung ein.

**Tabelle 6** Anzahl der alpha-Partikel pro ml bei Inkubation von Zellen ohne spezifische Bindungsstellen zum Vergleich der Strahlensensibilität. Die gemessenen Aktivitätskonzentrationen bei den LD<sub>50</sub>-Werten der Kontroll-Zellen sind in die Anzahl der alpha-Partikel pro ml, die während der gesamten Behandlung emittiert werden, umgerechnet.

Zelllinie	Nuklid	LD <sub>50</sub> [µCi/ml]	LD <sub>50</sub> [kBq/ml]	t <sub>1/2</sub> [min]	alpha-Partikel /ml
MDA MB 435S wt E-Cad	Bi-213	12	444	46	1.768.056.557
MDA MB 435S wt E-Cad	Tb-149	12	444	246	1.607.394.027
NMB7 blockiert	Ac-225	0,008	0,296	14400	442.782.859
HL60 blockiert	Ac-225	0,007	0,259	14400	387.435.002

MDA Zellen sind Tabelle 6 zufolge wesentlich strahlenresistenter als NMB7 oder HL60 Zellen. Aber erst eine Untersuchung der MDA Zellen mit <sup>225</sup>Ac könnte den Einfluss der Halbwertszeit auf die Zytotoxizität klären. Bei <sup>149</sup>Tb und <sup>213</sup>Bi wird die Strahlendosis in sehr kurzer Zeit übertragen, während bei <sup>225</sup>Ac alpha-Partikel über mehrere Zellzyklen emittiert werden. Der Vergleich zwischen <sup>149</sup>Tb und <sup>213</sup>Bi ergibt die Tatsache, dass die alpha-Partikel beider Isotope die gleiche Zytotoxizität entfalten. Dies ist bemerkenswert, da sich die Energie der alpha-Partikel beider Nuklide um den Faktor zwei unterscheidet und folglich sich die biologische Wirksamkeit ebenfalls unterscheiden muss.

Bei fast gleicher Strahlensensibilität unterscheiden sich NMB7 Neuroblastomzellen durch ihre 4 fach längere Generationszeit von den HL60 Leukämie Zellen (4 d versus 24 h). Daraus lässt sich, bezogen auf den Zellzyklus, eine höhere Strahlensensibilität der NMB7 Zellen ableiten.

## 7.2.2 Affinität und Internalisierung

Die wichtigsten Unterschiede der untersuchten Radioimmunkonjugate sind die Affinität zu den spezifischen Bindungsstellen und die Fähigkeit der Zellen die Antikörper zu internalisieren.

Mit  $2 \cdot 10^8$  l/mol hat der Antikörper HuM195 mit Abstand die höchste Affinität zu seinem entsprechenden Antigen, während der Antikörper 6H8 mit  $5 \cdot 10^8$  l/mol etwas affiner ist als der Antikörper 3F8 ( $K_a = 2 \cdot 10^8$  mol/l).

Diese unterschiedlichen Affinitäten verursachen wahrscheinlich auch die mit dem Zellassay gemessenen Immunreaktivitäten. HuM195 mit seiner sehr hohen Affinität hatte bis auf die Versuche am CERN in Genf immer Immunreaktivitäten über 80%. Da die  $^{149}\text{Tb}$  Markierung mit einer über einem Jahr alten Antikörper-Charge des chelatierten HuM195 durchgeführt wurde, wird dieser Wert als Ausreißer angesehen. Trotz mittlerer Affinität hat der Antikörper 6H8 die niedrigste Immunreaktivität. Dies erklärt sich vielleicht aus der Konzentration des zweiten Bindungspartner. Während das Antigen des Antikörpers 6H8, d9 E-Cad nur mit ca.  $5,5 \cdot 10^4$  Molekülen pro Zelle exprimiert wird, findet der Antikörper 3F8 die 100-fache Anzahl an seinen entsprechenden Antigenen pro Zelle.

Die Zytotoxizität wird von der Affinität nicht so beeinflusst, dass die hohe Affinität des Antikörpers HuM195 die mangelnde Stabilität der Radionuklidkopplung mit dem HEHA Chelat und die niedrige Anzahl von Bindungsstellen ( $1 \cdot 10^4 - 2 \cdot 10^4$ ) ausgleicht. Dies sind jedoch extrem ins Gewicht fallende Faktoren, so dass es bemerkenswert ist, dass trotzdem ein Unterschied zwischen nativen HL60 und blockierten HL60 Zellen nachweisbar ist. Bei Versuchen mit Kopplung von  $^{213}\text{Bi}$  an HuM195 wurde gezeigt dass die Bindung des Radioimmunkonjugates die Zytotoxizität um den Faktor 5-10 erhöht (Nikula et al. 1999). Dies lässt darauf schließen, dass die Affinität eine starke Rolle bei der Wirkung auf Zellsuspensionen spielt und die vergleichsweise niedrige Anzahl von Bindungsstellen auf den HL60 Zellen ausgleicht.

Besonders bei den  $^{225}\text{Ac}$ -Immunkonjugaten ist es leicht einsichtig dass eine hohe Internalisierung der Radioimmunkonjugate mit einer starken spezifischen Toxizität einhergeht. So hat auch das Radioimmunkonjugat  $^{225}\text{Ac}$ -DOTA-3F8 den stärksten spezifischen Effekt. Eine ähnlich hohe Internalisierungsrate zeigen die HL60 Zellen nach Inkubation mit  $^{213}\text{Bi}$ -HuM195 (Nikula et al. 1999). Die Diskrepanz aus erwarteter Zytotoxizität und beobachteter, erklärt sich durch die starke Instabilität des verwendeten  $^{225}\text{Ac}$ -HEHA-HuM195. Zusätzlich hat die relativ geringe spezifische Aktivität eine Rolle gespielt. Die sehr geringe Anzahl der Bindungsstellen auf den Zellen von nur ca. 15000, die Instabilität der Radionuklidbindung und die geringe spezifische Aktivität werden offensichtlich noch durch die hohe Affinität dieses Antikörpers ausgeglichen.

Der Antikörper 6H8 zeichnet sich durch eine Internalisierungsrate von nur 7% aus. Trotzdem kann eine Erhöhung der Zytotoxizität der Nuklide  $^{213}\text{Bi}$  und  $^{149}\text{Tb}$  durch spezifische Antikörperbindung bei den d9 E-Cad exprimierenden Zellen nachgewiesen werden.

Sowohl Antikörperaffinität als auch die Anzahl der Bindungsstellen auf den Tumorzellen scheinen wesentlichen Faktoren für den Erfolg einer Radioimmuntherapie zu sein. Aber auch die Internalisierung der Radioimmunkonjugate ist ein wichtiger Parameter, zumindest bei der Verwendung des Isotops  $^{225}\text{Ac}$ .

Ein Vergleich der therapeutischen Potenz der Radioimmunokonjugate  $^{90}\text{Y}$ -Anti-CD20 und  $^{90}\text{Y}$ -Anti-CD19 im Tierexperiment sollte den Einfluss von Antikörperaffinität und Anzahl von Bindungsstellen auf den Zellen evaluieren. Anti-CD19 hat eine zehnfach höhere Affinität zu seinem Antigen als Anti-CD20, aber die CD19-Dichte auf den Zielzellen war demgegenüber dreifach geringer (20 000 versus 60 000). Dabei konnten bei gleichen Aktivitätskonzentrationen keine Unterschiede im Überleben der behandelten Gruppen gezeigt (Ma et al. 2002). In diesen Experimenten scheint die schwache Affinität von Anti-CD20 durch eine höhere Anzahl an Bindungsstellen ausgeglichen worden zu sein. Aufgrund der hohen Reichweite der beta-Partikel spielt es keine Rolle ob die Isotope innerhalb oder außerhalb der Zelle zerfallen. Es ist auch bei unterschiedlichem Internalisierungsverhalten beider Antikörper kein Unterschied im resultierenden Effekt zu erwarten. Folglich wurde Internalisierung in dieser Arbeit nicht untersucht.

### 7.2.3 Reichweite

Die  $^{149}\text{Tb}$  alpha-Partikel mit einer Anfangsenergie von 3,97 MeV haben eine Reichweite von 28  $\mu\text{m}$ , die 1 bis 2 Zelldurchmessern entspricht.  $^{213}\text{Bi}$  dagegen emittiert alpha-Partikel mit 8,4 MeV Anfangsenergie, die ca. 3-4 Zelldurchmesser erreichen (72 $\mu\text{m}$ ). Der Vorteil von  $^{213}\text{Bi}$  liegt deshalb bei der Behandlung von kleinen Zellklustern. Vergleichende Untersuchungen mit beiden Radioimmunkonjugaten an Zellklustern, die kurz nach dem Start der Inkubation mit den Radioimmunkonjugaten durch Zentrifugation aus einer Zellsuspension hergestellt wurden, und Spheroiden zeigten die erwarteten Unterschiede zwischen beiden Strahlern. Bei der Wirkung des Strahlers  $^{213}\text{Bi}$  auf Zellpellets durch homogen verteilte Radioimmunkonjugate wird der Unterschied zwischen d9 E-Cadherin und wt E-Cadherin exprimierenden Zellen sehr viel größer als bei den korrespondierenden Zellen in Suspension. Dieser vergrößerte Unterschied im Zellpellet kommt aber nicht durch ein verstärktes Abtöten der d9 E-Cadherin tragenden Zellen zustande, sondern durch eine stark verminderte Wirkung auf die wt E-Cadherin Kontrolle. Durch Zentrifugation wird ein grosser Teil der umgebenden

Flüssigkeit und mit ihr nicht gebundene Radioimmunkonjugate von den Zellen abgetrennt. Dies hat die verminderte Zytotoxizität gegenüber den wt E-Cad Zellen zur Folge. Die Wirkung an den d9 E-Cadherin exprimierenden Zellen im Pellet entspricht der Wirkung des Radioimmunkonjugates auf die entsprechenden Zellsuspensionen, d.h. der Kreuzfeuer Effekt ist gleich dem Effekt der nicht gebundenen Radioimmunkonjugate in der Zellsuspension. Diese nicht gebundenen Radioimmunkonjugate töten d9 E-Cadherin und wt E-Cadherin tragende Zellen in Suspension gleichermaßen ab und vermindern den Unterschied der Strahlenwirkung gegenüber den beiden Zelllinien.

Bei  $^{149}\text{Tb}$  hingegen wird durch das Zentrifugieren und der folgenden Bestrahlung des Pellets kaum ein Unterschied zwischen Zellpellet und Zellsuspension festgestellt. Wie zu erwarten ist der Kreuzfeuer Effekt der  $^{149}\text{Tb}$  alpha-Partikel aufgrund der geringen Reichweite weniger ausgeprägt. Zusätzlich ist im Zellpellet durch die nur 17% alpha-Emission dieses Isotops auch die absolute Anzahl von emittierten alpha-Partikeln geringer. Aus diesem Grunde war ein Kreuzfeuer Effekt bei  $^{149}\text{Tb}$  nicht messbar. Nur bei hohen Aktivitätskonzentrationen machte sich bei beiden Zelllinien die Entfernung des Radioimmunkonjugates mit der umgebenden Lösung bemerkbar.

### 7.3 Dosimetrie

Dosimetrie ist die Bestimmung der Dosis auf die verschiedenen Organsysteme. Sowohl bei externer als auch interner Bestrahlung ist es bei therapeutischen Anwendungen notwendig den Unterschied zwischen Strahlendosis der Zielstruktur und den angrenzenden gesunden Geweben zu kennen. Bei diagnostischen Anwendungen offener radioaktiver Substanzen ist die Dosimetrie Grundlage des Strahlenschutzes und somit der Nutzen/Risiko Abschätzung für Patienten.

Die Dosimetrie, die in der Strahlentherapie und der nuklearmedizinischen Bildgebung Anwendung findet, beschreibt meist Strahlung mit LET Werten  $<10 \text{ keV}/\mu\text{m}$  und Reichweiten im cm bis m Bereich. Aus diesem Grund wird die Verteilung der Dosis im Gewebe als homogen betrachtet.

Bei der Radioimmuntherapie stößt dieses Konzept auf Grenzen. Es kann weder bei beta- noch bei alpha-strahlenden Isotopen im Gewebe davon ausgegangen werden dass alle Zellkerne die gleiche Anzahl an Partikeltreffer erhalten oder dass jedes Partikel überhaupt auf zelluläre Bestandteile trifft. So wird z.B. die berechnete Dosis auf die Leber von Patienten, die in Dosisfindungsstudien mit  $^{213}\text{Bi}$  gekoppelt an HuM195 behandelt wurden, mit bis zu 11 Sv angegeben (Sgouros et al. 1999). Lebertoxizität wurde in diesen Versuchen aber bei keinem

Patienten gefunden. Die berechnete Dosis resultiert eventuell aus der schnellen Akkumulation ohne Berücksichtigung der ebenso schnellen Clearance die der Antikörper erfährt (Kolbert et al. 2001). Aus diesem Grund ist eine mikrodosimetrische Betrachtungsweise unumgänglich, die außer der mittleren Dosis pro Zelle und Zellkern auch die Dosisverteilung berechnet. Letztlich ist die Fraktion an Zellen die subletale Schäden erlitten hat, entscheidend. Wenn trotz hoher Strahlendosis auf die Zellen ein hoher Anteil an Zellen gar keine Treffer erhalten hat, ist eine Kontrolle von Tumorwachstum nicht möglich.

### **7.3.1 Mikrodosimetrie**

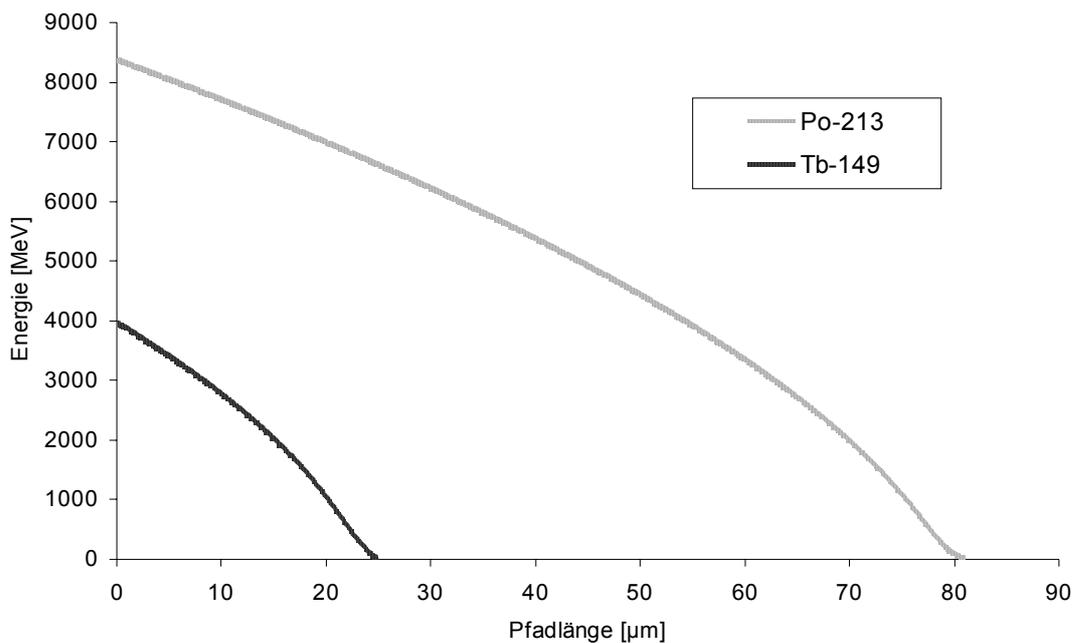
Bei mikrodosimetrischen Berechnungen werden als relevante Größen die mittlere Dosis auf den Zellkern, die Verteilung dieser Dosis und die Anzahl der Zellkerne ohne Treffer beurteilt. Diese Berechnungen können entweder durch Berechnungen analog des MIRD Schemas oder mit Monte Carlo Simulationen für die Geometrie auf zellulärer Ebene durchgeführt werden. In Roeske et al. sind S-Faktoren für bestimmte Verteilungen von alpha-Emittern in den Zellen beschrieben (Roeske et al. 1997). Diese S-Faktoren ergeben bei Multiplikation mit der Anzahl der Zerfälle die resultierende Dosis auf die Zellkerne. Für jeden Zerfall wird eine Wahrscheinlichkeit berechnet mit der eine bestimmte Pfadlänge durch den Kern zurückgelegt wird und dabei die entsprechende Dosis verursacht wird. Eine Addition aller Zerfälle ergibt dann die Verteilung der Dosis und die Anzahl der Zellen, die keinen Treffer erlitten haben.

Mit Monte Carlo Methoden berechnete Dosisverteilungen sind statistische Ergebnisse, die nur bei einer sehr hohen Anzahl von Simulationen genau genug werden. In jeder Simulation wird bei dieser Berechnung je eine Möglichkeit der Bahn der alpha-Partikel durch Zufall ausgewählt und die Dosis auf das Zielvolumen (Zellkern) berechnet (Charlton et al. 1998). Das Ergebnis ist eine genaue Verteilung der Dosis auf die verschiedenen Zellkompartimente. Diese Simulation muss einige tausendmal wiederholt werden um ein signifikantes Ergebnis zu erhalten.

#### **7.3.1.1 Dosimetrie von $^{213}\text{Bi}$ und $^{149}\text{Tb}$ : Dosis und Wirkung auf Zellsuspensionen**

In Charlton et al. wurde das Überleben von hämatopoetischen Stammzellen nach Bestrahlung mit alpha-Partikeln von  $^{149}\text{Tb}$  und  $^{221}\text{At}/^{221}\text{Po}$  mittels Monte Carlo Simulation berechnet und mit experimentellen Daten verglichen (Charlton et al. 1998). Dieser Algorithmus ist im Anhang A abgedruckt und wurde für die Dosimetrie der Zellsuspensionsexperimente mit

$^{149}\text{Tb}$  und  $^{213}\text{Bi}$  verwendet. Die Spuren der alpha-Partikel sind in  $0,1\ \mu\text{m}$  Schritte unterteilt und für jeden Schritt die entsprechende kinetische Energie des alpha-Partikels in einer Datei aufgelistet (nach Ziegler, J., 1996, SRIM96, IBM Research, Yorktown, New York, <http://www.srim.org>). Die maximale Energie-Übertragung (Kollisions-Massenbremsvermögen, engl. stopping power,  $dE/dx$ ), der sogenannte Bragg-Peak liegt bei einer alpha-Partikel Energie von  $0,75\ \text{MeV}$  (Ziegler et al. 1985 (new edition in 2003)). Dies ist der Abschnitt der maximalen Steigungen der Kurven. Daraus folgt dass für  $^{213}\text{Bi}/^{213}\text{Po}$  im letzten Viertel und für  $^{149}\text{Tb}$  in der letzte Hälfte der alpha-Bahn besonders viel Energie übertragen wird (siehe Abbildung 21). Bei  $0,75\ \text{MeV}$  liegt der LET für  $^{149}\text{Tb}$  und für  $^{213}\text{Bi}$  alpha-Partikel bei ca.  $235\ \text{keV}/\mu\text{m}$  und im Gegensatz dazu zeigt der lineare erste Teil der alpha-Bahn für  $^{149}\text{Tb}$  einen LET von  $120\ \text{keV}/\mu\text{m}$  und für  $^{213}\text{Bi}$  einen LET von  $70\ \text{keV}/\mu\text{m}$ .



**Abbildung 21** Graphische Darstellung des Energieverlustes von alpha-Partikeln entlang ihrer Bahn

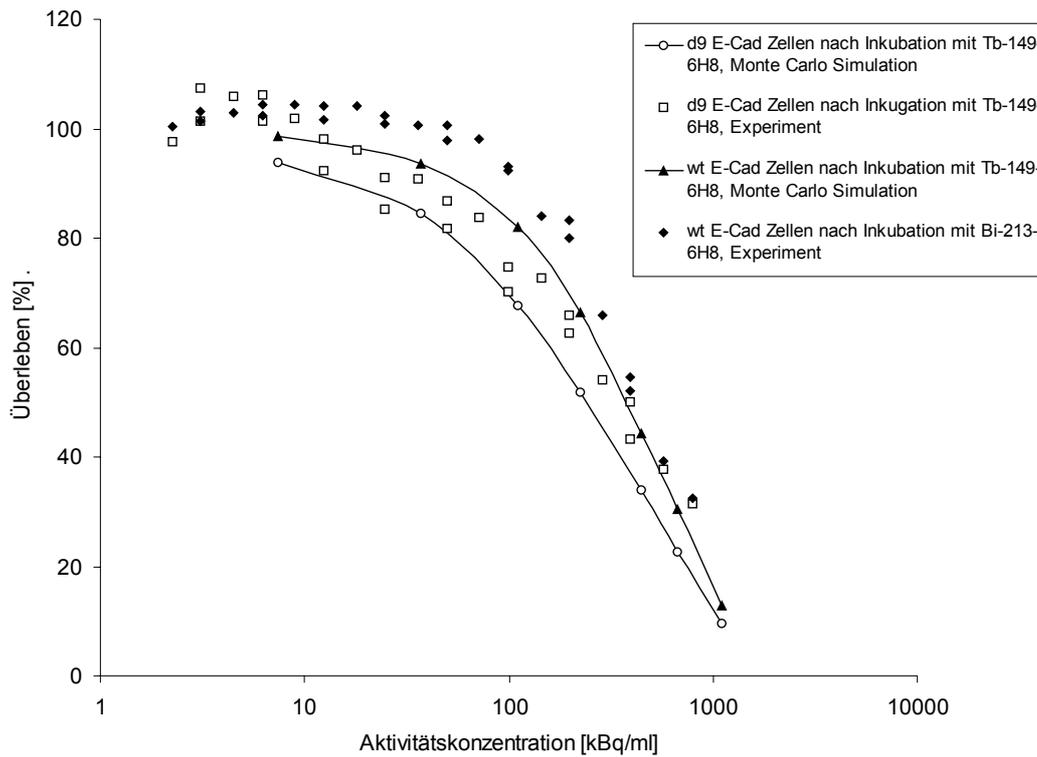
Des weiteren wurden für die Berechnungen Zell- und Kerngröße bestimmt. Dazu standen elektronenmikroskopische Aufnahmen (K-F. Becker et al, unpublished results, Anhang B) zur Verfügung. Um Fehler aufgrund von Anschnittphänomenen zu minimieren wurden bei 20

Zellen Kern- und Zellgröße gemessen und dann gemittelt. Die Zellen wurden folglich durch Sphären mit 18 µm Durchmesser, die einen Kern von 12 µm Durchmesser enthalten, approximiert. Die Eingabedaten für das Program sind in Tabelle 7 gezeigt. Der Sensibilitätsfaktor betrug 2,5 und die geringe Internalisierung wurde vernachlässigt.

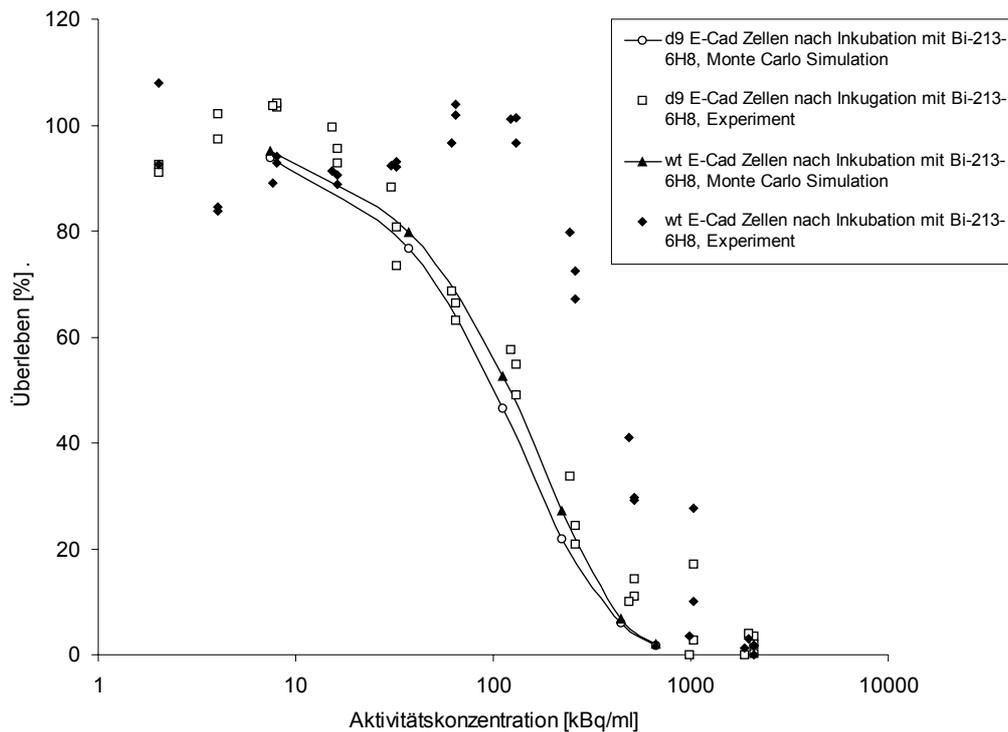
Die Monte Carlo Berechnungen zeigen kaum eine Erhöhung der zytotoxischen Wirkung gegenüber den Kontrollzellen von  $^{213}\text{Bi}$  durch die spezifische Bindung der  $^{213}\text{Bi}$ -Immunkonjugate, während sich für  $^{149}\text{Tb}$ -Immunkonjugate, trotz einer mehr als 5-fach geringeren Anzahl an gebundenen alpha-emittierenden Atomen, ein deutlicher Unterschied zwischen Zellen mit Bindungsstellen und ohne Bindungsstellen ergibt (siehe Abbildung 23).

**Tabelle 7** Eingabedaten zur mikrodosimetrischen Berechnung des Überlebens von d9 E-Cad und wt E-Cad Zellen mittels Monte Carlo Algorithmus. Die Aktivität wurde in Anzahl der alpha-Partikel pro  $\mu\text{m}^3$  umgerechnet und die Simulation für wt E-Cad Zellen ohne alpha-Zerfälle an der Oberfläche und für d9 E-Cad Zellen mit den angegebenen Anzahlen an alpha-Zerfällen an der Oberfläche (surface alpha) durchgeführt.

Aktivität [kBq/ml]	Bi-213		Tb-149	
	decay/ $\mu\text{m}^3$	surface alpha	decay/ $\mu\text{m}^3$	surface alpha
<b>7,4</b>	3,00E-05	2,5	3,00E-05	1,4
<b>37</b>	1,50E-04	5,5	1,30E-04	3
<b>111</b>	4,40E-04	11	4,00E-04	6
<b>222</b>	8,80E-05	14,7	8,00E-04	8
<b>444</b>	1,76E-03	21,3	1,61E-03	9,3
<b>666</b>	2,64E-03	27	2,41E-03	9,3
<b>1110</b>	-	-	4,02E-03	9,3



**Abbildung 22** Vergleich des mittels Monte Carlo Simulation berechneten Überlebens von Zellsuspensionen nach Inkubation mit  $^{149}\text{Tb}$ -6H8 mit dem mittels  $^3\text{H}$ -Thymininkorporierung gemessenen Überleben. Die Zellen wurden für die Monte Carlo Simulation durch Sphären von  $9\ \mu\text{m}$  Radius mit einem Zellkern von  $6\ \mu\text{m}$  Radius approximiert und die Berechnungen wurden für je 5000 Zellen durchgeführt.



**Abbildung 23** Vergleich des mittels Monte Carlo Simulation berechneten Überlebens von Zellsuspensionen nach Inkubation mit  $^{213}\text{Bi}$ -6H8 mit dem mittels  $^3\text{H}$ -Thymidininkorporierung gemessenen Überleben. Die Zellen wurden für die Monte Carlo Simulation durch Sphären von 9  $\mu\text{m}$  Radius mit einem Zellkern von 6  $\mu\text{m}$  Radius approximiert und die Berechnungen wurden für je 5000 Zellen durchgeführt.

Im Vergleich zu den in 6.4 und 6.5 beschriebenen Ergebnissen der Experimente ergibt sich eine überraschend exakte Übereinstimmung für  $^{149}\text{Tb}$  (Abbildung 22). Für  $^{213}\text{Bi}$  wird der Unterschied zwischen d9 E-Cad und wt E-Cad exprimierenden Zellen hingegen kleiner berechnet als er gemessen wird. Dabei liegen beide Kurven der Monte Carlo Berechnung für  $^{213}\text{Bi}$ -6H8 sehr nahe bei der Überlebenskurve für d9 E-Cad exprimierende Zellen. Das Überleben der wt E-Cad exprimierenden Kontrolle nach  $^{213}\text{Bi}$ -6H8 Behandlung wird geringer berechnet als die Experimente zeigen (Abbildung 23). Es wirkt aber auf beide Zelllinien der gleiche Hintergrundeffekt, nur bei d9 E-Cad exprimierenden Zellen kommt eine zusätzliche selektive zytotoxische Wirkung durch gebundenes Radioimmunkonjugat hinzu. Im Monte Carlo Modell wird also die Zytotoxizität von  $^{213}\text{Bi}$  als zu hoch angenommen. Zusätzlich wird die Wirkung des gebundenen alpha-Immunkonjugates als zu gering angesetzt. Daraus kann gefolgert werden, dass die Wirkung der alpha-Partikel im Anfangsteil der Bahn (bei einem LET von 70 keV/ $\mu\text{m}$ ) eine höhere relative biologische Wirksamkeit (RBE) hat als

angenommen und dass der hohe LET (235 keV/ $\mu\text{m}$ ) im letzten Teil der Bahn die Zellen weniger schädigt als angenommen.

## **7.4 Reaktion der Zelle: Apoptose und DNA Schäden**

### **7.4.1 Apoptose**

Der Tod einer Zelle kann durch zwei verschiedene Mechanismen eintreten. Erstens durch Nekrose, bei der die Zelle lange versucht die Integrität der DNA und des Zellkerns zu erhalten und zweitens durch Apoptose, bei der die Zelle durch die Aktivierung von Proteasen und Nukleasen sich selbst zerstört. Morphologisch unterscheiden sich beide Arten des Zelltodes unter anderem durch das Fehlen von Zellschwellung und den sehr spätem Verlust der Kern- und Zellmembranintegrität bei der Apoptose. Die Apoptose ist in vielen Geweben ein physiologischer Vorgang bei dem es nicht zu einer Entzündungsreaktion kommt, sondern einzelne Zellen signalinduziert ihren eigenen Tod verursachen. Besonders in der Embryonalentwicklung ist die Apoptose bei der Rückbildung vieler initial angelegten Strukturen beteiligt. Weiterhin ist auch bei der klonalen Selektion von Lymphozyten die regulierte Apoptose essentiell. Bei der Proliferation von B-Zellen ist z.B. das BCL-2 Gen die Ursache für die Inhibition von Apoptose wenn an den Immunglobulinrezeptor ein Antigen bindet. Eines der ersten beschriebenen Antionkogene ist das Gen p53, welches bei Aktivierung das Protein p53 exprimiert und die Zelle zur Apoptose veranlasst. Diese Expression wird z.B. durch Strahlenschäden, TNF- $\alpha$  Bindung und auch Glukokortikoide ausgelöst. Die Strahlensensibilität von Zellen nach Bestrahlung mit Gammastrahlen korreliert positiv mit der Ausprägung von Apoptose (Akimoto et al. 1999).

Während in verschiedenen Publikationen für die meisten Tumoren Apoptose beschrieben wird, wurde in dieser Arbeit nach der Bestrahlung mit alpha-Partikeln Apoptose nur bei der B-Zelllinie HL60 nachgewiesen. Die soliden Tumorzelllinien MDA-MB 435 und NMB7 zeigten keine Apoptose. Dies liegt zumindest bei den MDA-MB 435 Zellen nicht daran, dass sie die Fähigkeit zur Apoptose verloren haben (Orlandi et al. 2001). In Thomson et al. sind einige der Regulationsmechanismen für Apoptose beschrieben (Thompson 1995). Aufgrund der komplexen Regelmechanismen gibt es eventuell für jede Tumorzelle eine individuelle Apoptoseschwelle. Bei einer niedrigen Apoptoseschwelle sind Medikamente, die hauptsächlich durch Induktion von Apoptose wirken sehr vielversprechend (eventueller Wirkmechanismus von nativem Rituximab, (Maloney 2001)), während Zellen mit hoher

Apoptoseschwelle mit Medikamenten, die unabhängig von Apoptose wirken behandelt werden müssen.

Die Strahlensensibilität der Zelllinien HL60 und NMB7 unterscheidet sich nur geringfügig (Tabelle 6), während sich andere Faktoren wie Generationszeit erheblich mehr unterscheiden. Die Induktion von Apoptose kann folglich nicht für die Strahlensensibilität von Tumorzellen gegenüber alpha-Partikeln verantwortlich gemacht werden. Auch bei unterschiedlichen Schwellen bei denen Apoptose ausgelöst wird scheint das Auftreten von Apoptose keine große Bedeutung für die Wirkung von alpha-Partikeln zu haben.

#### **7.4.2 DNA Schäden**

Es gilt heute als gesichert, dass letale Zellschäden durch Strahlung fast ausschließlich Schäden des Zellkerns sind. Untersuchungen an Fibroblasten zeigten z.B., dass exklusive Bestrahlung des Zytoplasmas mit alpha-Partikeln kaum einen Effekt auf die Proliferationsfähigkeit der Zellen hat, während 1 bis 2 alpha-Partikel die durch den Zellkern gelangten, die Zelle letal schädigten.

Viele der darstellbaren DNA-Schäden sind für die Zellen prinzipiell letal. Schäden vom Chromosomen-Typ wie z.B. dizentrische oder Ring-Chromosomen können gerade von Tumorzellen nicht repariert werden, da beide Chromosomen an den korrespondierenden Stellen geschädigt sind. Tumorzellen haben meist die Fähigkeit verloren Doppelstrangbrüche anhand des korrespondierenden Schwesternchromosoms zu reparieren.

In den Experimenten an MDA MB 435 S Zellen wurden bei einer Aktivitätskonzentration von 740 kBq/ml  $^{213}\text{Bi}$ -6H8 in 50% der Zellen mikroskopische DNA Schäden gezählt. Im Vergleich dazu lag der LD<sub>50</sub> Wert, ermittelt mit  $^3\text{H}$ -Thymidininkorporierung, nur bei ca. 444 kBq/ml. Es kann sein, dass nicht alle letalen Ereignisse mit der Analyse von strukturellen Chromosomen Aberrationen erfasst werden. Der Vergleich der Zytotoxizität, die mit beiden Methoden gemessen wurde, ist aber durch den unterschiedlichen Versuchsaufbau limitiert. Die Bestrahlung der Zellen bei denen Chromosomenschäden untersucht wurden geschah erst 8h nach dem Aussäen in neue Kulturflaschen. Damit hatten die Zellen genug Zeit um adhärent zu werden und somit auch ihre Form zu ändern. Während Zellen in Suspension rund sind, haben adhärente Zellen eine flachere Form mit Zellausläufern. Antikörper, die z.B. an Antigene der Zellausläufer binden haben eine relativ größere Distanz zu dem Zellkern als Antikörper, die auf der Oberfläche von Zellen in Suspension binden. Ein weiterer geometrischer Faktor der die Zytotoxizität beeinflussen kann, ist die Möglichkeit, dass viele Bindungsstellen durch die Adhärenz maskiert sind.

Eine deutlich höhere Anzahl an Schäden der d9 E-Cadherin tragenden Zellen im Vergleich zu wt E-Cadherin Zellen konnte nur bei hohen Dosen in der Gruppe der Chromatid-Schäden nachgewiesen werden. Bei den Chromosomen-Schäden wurden im Gegensatz dazu sogar eine erhöhte DNA Schädigung in den wt E-Cadherin Zellen gefunden. Alle Schäden zusammengenommen ließen den spezifischen Effekt auf d9 E-Cadherin Zellen Radioimmunkonjugates  $^{213}\text{Bi}$ -6H8 nicht erkennen (Tabelle 5). Die Zellen bei denen Schäden vom Chromatid-Typ gefunden wurden waren zur Zeit der Bestrahlung in der späten S-Phase oder in der G2 Phase. In diesen Phasen des Zellzyklus verändert sich die Form der Zelle. Von der S-Phase bis zur Mitose rundet sich die Zelle ab und ist spätestens in der Mitose eine Kugel. Eventuell liegen die gefundenen Unterschiede der verschiedenen Chromosomenaberrationen hauptsächlich an der Geometrie der Zelle zu dem Zeitpunkt der Inkubation mit dem alpha-Immunkonjugat.

Die für alpha-Schäden typische Zellschäden korrelieren im Endeffekt sehr gut mit dem tatsächlichen Zelltod, der mit der  $^3\text{H}$ -Thymidininkorporierung gemessen wurde. Nicht mikroskopisch darstellbare Schäden, die bei Gammabestrahlung einen Grossteil der Schäden ausmachen, scheinen eine untergeordnete Bedeutung zu haben.

## **7.5 Erfolgsaussichten**

Die alpha-Radioimmuntherapie vereinigt zwei verschiedene Vorteile. Erstens werden durch die Bindung von Antikörpern tumorspezifische Strukturen ausgenutzt, die keine Angriffspunkte der konventionellen Behandlungsmodalitäten wie Chirurgie, Chemotherapie und Strahlentherapie sind. Zweitens ist der Effekt der alpha-Partikel auf die Zelle eine neue Modalität. Der hohe Anteil von Doppelstrangschäden aufgrund des hohen LETs greift ganz anderes in die Zellbiologie ein als externe Bestrahlung oder Chemotherapeutika. Die Resistenzmechanismen, die der Tumor entwickeln muss, um dieser Therapie zu entgehen, können nicht durch Chemotherapie oder Bestrahlung induziert werden.

Besonders bei der lokoregionalen Applikation in präformierten Körperhöhlen kann die wiederholte Anwendung von alpha-Radioimmunkonjugaten auch hohe Tumormassen schichtweise abtöten ohne gesundes Gewebe stark zu schädigen. Karzinome der Blase und peritoneale Metastasen sowie maligne Meningitis sind eventuelle Anwendungsgebiete der lokoregionalen alpha-Radioimmuntherapie.

Erste klinische Versuche wurden schon begonnen und die Ergebnisse von kontrollierten Studien werden eventuelle Einsatzmöglichkeiten von alpha-Emittern in der onkologischen Therapie aufzeigen. Ein Nachteil bei dieser klinischen Erforschung ist der hohe Aufwand der

Herstellung und Verfügbarkeit von alpha-emittierenden Nukliden. Die Handhabung kann wahrscheinlich in Zukunft nur an spezialisierten Zentren erfolgen. Diese Einschränkungen machen eine schnelle klinische Erforschung mit hohen Fallzahlen schwierig. Nur durchschlagende Erfolge in kleinen Studien könnten diesem Therapieansatz zu schnellem Erfolg verhelfen.

Im Vergleich zu anderen innovativen Therapieansätzen bei denen durch spezifische Bindung Toxine, Gene oder Viren in Tumorzellen geschleust werden (Kreitman et al. 1997); (Park et al. 1995); (Poncet et al. 1996); (Durrbach et al. 1999), wird sich erst in Zukunft zeigen welche Therapieformen klinische Erfolge bringen.

Risiken bei der Anwendung von Radioaktivität sind immer die Induktion von Neoplasien sowohl bei behandelten Patienten als auch bei involviertem Personal. Bei Patienten wird dieses Risiko angesichts der Schwere der Erkrankung im Hintergrund stehen. Ein Schutz des Personals kann mit den bestehenden nuklearmedizinischen Einrichtungen und der Einhaltung von Strahlenschutzbedingungen gewährleistet werden. Diese notwendigen Schutzmaßnahmen erschweren jedoch die breite Anwendung und die Erforschung dieses Therapieansatzes.

Alle drei untersuchten Antikörper sind geeignet für alpha-Radioimmuntherapie in klinischen Studien.  $^{213}\text{Bi}$ -HuM-195 war das erste Radioimmunkonjugat, das an Patienten erprobt wurde. Im Gegensatz zu  $^{213}\text{Bi}$  ist aber die Anwendung von  $^{225}\text{Ac}$  in der Radioimmuntherapie das wesentlich jüngere Forschungsgebiet. Klinische Studien mit  $^{225}\text{Ac}$ -HuM195 sind aber in Planung, während für  $^{225}\text{Ac}$ -3F8 in nächster Zeit Therapiestudien am Mausmodell durchgeführt werden um das Potential dieses Radioimmunkonjugates auch in vivo zu untersuchen.

Auch das Radioimmunkonjugat  $^{213}\text{Bi}$ -6H8 wird intensiv auf die Eignung für klinische Radioimmuntherapie untersucht.

Der vermeintliche große Nachteil von  $^{149}\text{Tb}$ , der geringe alpha-Anteil am Zerfall, konnte in dieser Arbeit relativiert werden, so dass auch für dieses Isotop weitere Untersuchungen durchgeführt worden sind. Eine erste tierexperimentelle Versuchsreihe mit  $^{149}\text{Tb}$ -Rituximab ergab Hinweise auf die Überlegenheit von  $^{149}\text{Tb}$ -Rituximab gegenüber dem nativen Antikörper Rituximab.  $^{149}\text{Tb}$  ist besonders bei Tumoren mit hoher Antigenexpression und einer Disseminierung von Einzelzellen ein vielversprechendes Isotop.

## 8 Zusammenfassung

Abtötung einzelner Tumorzellen ist eine große therapeutische Herausforderung bei minimal residual disease und der disseminierten Ausbreitung von Tumorzellen in Körperhöhlen z.B. im Peritonealraum oder auf den Leptomenigen. Ein erfolgversprechender Ansatz dafür ist die Radioimmuntherapie, bei der radioaktive Nuklide mittels monoklonaler Antikörper gezielt an Tumorgewebe transportiert werden. Für die Radioimmuntherapie einsetzbar sind sowohl beta-Emitter als auch alpha-Emitter. Letztere haben sich als besonders effizient erwiesen, da bereits wenige Partikel ausreichen um Tumorzellen abzutöten.

In dieser Arbeit wurden die alpha-Emitter  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{213}\text{Bi}$  und  $^{149}\text{Tb}$  wahlweise an die monoklonalen Antikörper 6H8, HuM195 und 3F8 gekoppelt und die zytotoxische Wirkung der Radioimmunkonjugate an Zellkulturen quantifiziert und bewertet. 6H8 ist ein tumorspezifischer Antikörper, der an eine bestimmte Mutation des E-Cadherin (d9 E-Cad) bindet, die exklusiv beim diffusen Magenkarzinomen auftritt. HuM195 erkennt das tumorassoziierte Antigen CD33 auf Zellen der akuten myeloischen Leukämie. 3F8 ist ein Antigangliosid  $\text{GD}_2$  Antikörper, dessen Bindung an neuroektodermale Gewebe bei der Behandlung von Neuroblastomen zur Therapie genutzt wird. Die alpha-Partikel emittierenden Isotope  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{213}\text{Bi}$  und  $^{149}\text{Tb}$  wurden mittels geeigneter Chelate an die Antikörper gekoppelt. Die Zytotoxizität der Radioimmunkonjugate gegenüber Zellen in Suspension, Zellpellets und Sphroiden wurde mittels  $^3\text{H}$ -Thymidininkorporierung, Tunel Assay, klonogenem Assay und Chromosomenaberrationen evaluiert. Die experimentellen Resultate bezüglich der Zytotoxizität von  $^{213}\text{Bi}$ -6H8 und  $^{149}\text{Tb}$ -6H8 gegenüber Zellsuspensionen wurde verglichen mit theoretisch ermittelten Ergebnissen, mit Hilfe eines Monte Carlo Algorithmus für Mikrodosimetrie.

Die untersuchten Zelllinien unterschieden sich in ihrer Sensibilität gegenüber alpha-Partikeln sowie hinsichtlich des Auftretens von Apoptose. Um je 50% der Zellen einer Zelllinie mittels alpha-Emitter abzutöten ( $\text{LD}_{50}$ ) bedarf es für MDA Zellen einer 4,5 fach hohen Anzahl an alpha-Partikeln verglichen zu NMB7 und HL60 Zellen. Ein positiver Apoptosenachweis mittels Tunel Assay konnte jedoch nur für die HL60 Zellen geführt werden.

Die zytotoxische Wirkung der alpha-Immunkonjugate erwies sich als abhängig von der Expression des entsprechenden Antigens, der Antigendichte auf der Zelloberfläche, der Affinität der verwendeten Antikörper zu den Antigenen, sowie der Rate der Internalisierung. So ändert sich der  $\text{LD}_{50}$ -Wert der NMB7 Zellen durch die selektive Bindung des

Radioimmunkonjugates  $^{225}\text{Ac}$ -3F8 an Zellen in Suspension von 30 Bq/ml auf 3,3 Bq/ml. Im Gegensatz dazu ist bei der Zelllinie MDA, die deutlich weniger Antigene exprimiert und diese auch fast nicht internalisieren, der  $\text{LD}_{50}$ -Wert nach selektiver Bindung von  $^{213}\text{Bi}$ -6H8 an die Einzelzellen von 444 kBq/ml auf 130 kBq/ml gesunken.

Nach Inkubation mit 740 kBq/ml  $^{213}\text{Bi}$  waren in 50% der MDA Zellen schwere Chromosomenaberrationen nachweisbar. Korrespondierend dazu lag bei 444 kBq/ml eine Verminderung der Proliferationsfähigkeit um 50% vor und bei 814 kBq eine Einschränkung der klonogenen Potenz der Zellen auf 50%.

$^{149}\text{Tb}$ -6H8 und  $^{213}\text{Bi}$ -6H8 zeigten trotz unterschiedlicher Partikelenergien (4 MeV versus 8 MeV) ähnliche Zytotoxizität gegenüber Zellsuspensionen. Gegenüber Zellpellets und Sphroiden dagegen zeigte nur  $^{213}\text{Bi}$ -6H8 einen starken zytotoxischen Effekt, aufgrund eines ausgeprägten Crossfire-Effekts.

Die mikrodosimetrische Simulation der Experimente an Zellsuspension war in guter Übereinstimmung mit der experimentell ermittelten Zytotoxizität. Nur für  $^{213}\text{Bi}$  wurde eine im Vergleich zum Experiment etwas höhere Zytotoxizität berechnet.

Die Erhöhung der Zytotoxizität der alpha-Immunkonjugate im Zellmodell durch selektive Bindung ist für die therapeutische Anwendung ein sehr vielversprechendes Ergebnis. Vor einer klinischen Untersuchung können weitere Einflussgrößen, die die Auswahl der Nuklide und der Antikörper bestimmen im Tierexperiment evaluiert werden und an individuellen Tumorzellen Antigendichte, Internalisierung und Sensibilität gegenüber alpha-Emittern bestimmt werden. Aber erst in klinischen Studien werden sich eventuelle Überlegenheiten der alpha-Radioimmuntherapie gegenüber etablierten Therapien endgültig beweisen lassen.

## 9 Abkürzungen

Bq	Bequerel
CD33	cluster of differentiation 33
Ci	Curie
DOTA	1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid
DTPA	diethylenetriamine pentaacetic acid
E-Cad	E-Cadherin
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
EGF Rezeptor	epidermal growth factor receptor
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
Gy	Gray
HEHA	hexaazacyclohexadecane-N,N',N'',N''',N''''',N''''''-hexaacetic
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSA	humanes Serum Albumin
ITLC	Papierchromatographie (instant thin layer chromatography)
Ka	Affinitätskonstante
Kd	Dissoziationskonstante
KeV	kiloelektronenvolt
LET	linearer Energietransfer
Mab	Monoklonaler Antikörper (monoclonal antibody)
PBS	Phosphatpuffer (phosphate buffered saline)
PCR	polimerase chain reaction
PE	pycoerythrin
FITC	fluorescence isothiocyanate
PEPA	pentaazacyclopentadecane-N, N', N'',N''',N''''pentaacetic acid

## 10 Literatur

- Akimoto, T., J. Seong, N. R. Hunter, L. Buchmiller, K. Mason and L. Milas (1999). "Association of increased radiocurability of murine carcinomas with low constitutive expression of p21(WAF1/CIP1) protein." Int J Radiat Oncol Biol Phys **44**(2): 413-9.
- Allen, B. J. (1999). "Targeted alpha therapy: evidence for potential efficacy of alpha-immunoconjugates in the management of micrometastatic cancer." Australas Radiol **43**(4): 480-6.
- Apostolides, C., R. Carlos-Marquez, W. Janssens, R. Molinet, T. K. Nikula and A. Ouadi (2001). "Cancer treatment using Bi-213 and Ac-225 in radioimmunotherapy." Nuclear News **44**(13): 29-33.
- Becker, K. F., M. J. Atkinson, U. Reich, I. Becker, H. Nekarda, J. R. Siewert and H. Hofler (1994). "E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas." Cancer Res **54**(14): 3845-52.
- Becker, K. F. and H. Hofler (1995). "Frequent somatic allelic inactivation of the E-cadherin gene in gastric carcinomas." J Natl Cancer Inst **87**(14): 1082-4.
- Becker, K. F., E. Kremmer, M. Eulitz, I. Becker, G. Handschuh, C. Schuhmacher, W. Muller, H. E. Gabbert, A. Ochiai, S. Hirohashi and H. Hofler (1999). "Analysis of E-cadherin in diffuse-type gastric cancer using a mutation-specific monoclonal antibody." Am J Pathol **155**(6): 1803-9.
- Behr, T. M., E. Wulst, S. Radetzky, R. D. Blumenthal, R. M. Dunn, S. Gratz, M. Rave-Frank, H. Schmidberger, F. Raue and W. Becker (1997). "Improved treatment of medullary thyroid cancer in a nude mouse model by combined radioimmunotherapy: doxorubicin potentiates the therapeutic efficacy of radiolabeled antibodies in a radioresistant tumor type." Cancer Res **57**(23): 5309-19.
- Bergman, I., M. A. Barmada, G. Heller, J. A. Griffin and N. K. Cheung (1999). "Treatment of neoplastic meningeal xenografts by intraventricular administration of an antiganglioside monoclonal antibody, 3F8." Int J Cancer **82**(4): 538-48.
- Beyer, G. J. (2000). Radioactive Ion Beams for Biomedical Research and Application. ISOLDE Laboratory Portrait. G. B. D. F.-W. (eds.), Science Publisher BV. **Hyperfine Interactions** **129** (1-4) (2000) p529-553.
- Beyer, G.-J., Comor, J.J., Dakovic, M., Soloviev, D., Tamburella, C., Hagebø, E., Allan, B., Dmitriev, S.N., Zaitseva, N.G., Starodub, G.Ya., Molokanova, L.G., Vranješ, S., Miederer M., and the ISOLDE Collaboration (2002). "Production routes of the alpha emitting 149Tb for medical application." Radiochim. Acta **90**(1).
- Camera, L., S. Kinuya, K. Garmestani, C. Wu, M. W. Brechbiel, L. H. Pai, T. J. McMurry, O. A. Gansow, I. Pastan, C. H. Paik and et al. (1994). "Evaluation of the

serum stability and in vivo biodistribution of CHX- DTPA and other ligands for yttrium labeling of monoclonal antibodies.” J Nucl Med **35**(5): 882-9.

Carter, P. (2001). “Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies.” Nature Reviews Cancer **1**(2): 118-129.

Chappell, L. L., K. A. Deal, E. Dadachova and M. W. Brechbiel (2000). “Synthesis, conjugation, and radiolabeling of a novel bifunctional chelating agent for (225)Ac radioimmunotherapy applications.” Bioconjug Chem **11**(4): 510-9.

Charlton, D. E., T. D. Uttridge and B. J. Allen (1998). “Theoretical treatment of human haemopoietic stem cell survival following irradiation by alpha particles.” Int J Radiat Biol **74**(1): 111-8.

Cheung, N. K., B. H. Kushner, S. D. Yeh and S. M. Larson (1998). “3F8 monoclonal antibody treatment of patients with stage 4 neuroblastoma: a phase II study.” Int J Oncol **12**(6): 1299-306.

Cheung, N. K., U. M. Saarinen, J. E. Neely, B. Landmeier, D. Donovan and P. F. Coccia (1985). “Monoclonal antibodies to a glycolipid antigen on human neuroblastoma cells.” Cancer Res **45**(6): 2642-9.

Chun, Y. S., N. M. Lindor, T. C. Smyrk, B. T. Petersen, L. J. Burgart, P. J. Guilford and J. H. Donohue (2001). “Germline E-cadherin gene mutations: is prophylactic total gastrectomy indicated?” Cancer **92**(1): 181-7.

Co, M. S., N. M. Avdalovic, P. C. Caron, M. V. Avdalovic, D. A. Scheinberg and C. Queen (1992). “Chimeric and humanized antibodies with specificity for the CD33 antigen.” J Immunol **148**(4): 1149-54.

de Jong, M., W. A. Breeman, B. F. Bernard, W. H. Bakker, M. Schaar, A. van Gameren, J. E. Bugaj, J. Erion, M. Schmidt, A. Srinivasan and E. P. Krenning (2001). “[177Lu-DOTA(0),Tyr3] octreotate for somatostatin receptor-targeted radionuclide therapy.” Int J Cancer **92**(5): 628-33.

Durrbach, A., E. Angevin, P. Poncet, M. Rouleau, G. Chavanel, A. Chapel, D. Thierry, A. Gorter, R. Hirsch, B. Charpentier, A. Senik and F. Hirsch (1999). “Antibody-mediated endocytosis of G250 tumor-associated antigen allows targeted gene transfer to human renal cell carcinoma in vitro.” Cancer Gene Ther **6**(6): 564-71.

Eliaz, R. E. and F. C. Szoka, Jr. (2001). “Liposome-encapsulated doxorubicin targeted to CD44: a strategy to kill CD44-overexpressing tumor cells.” Cancer Res **61**(6): 2592-601.

Hall, E. (1994). Radiobiology for the radiologist, Philadelphia: Lippincott.

Handschuh, G., S. Candidus, B. Lubber, U. Reich, C. Schott, S. Oswald, H. Becke, P. Hutzler, W. Birchmeier, H. Hofler and K. F. Becker (1999). “Tumour-associated E-cadherin mutations alter cellular morphology, decrease cellular adhesion and increase cellular motility.” Oncogene **18**(30): 4301-12.

- Imam, S. K. (2001). "Advancements in cancer therapy with alpha-emitters: a review." Int J Radiat Oncol Biol Phys **51**(1): 271-8.
- Iyer, S. B., L. E. Hultin, J. A. Zawadzki, K. A. Davis and J. V. Giorgi (1998). "Quantitation of CD38 expression using QuantiBRITE beads." Cytometry **33**(2): 206-12.
- Jang, Y. J., M. Blanco, S. Dagupta, D. A. Keire, J. E. Shively and W. A. Gaddard III (1999). "Mechanism and Energetics for Complexation of <sup>90</sup>Y with 1,4,7,10-Tetraacetylododecane-1,4,7,10-tetraacetic Acid (DOTA), a Model for Cancer Radioimmunotherapy." J. Am. Chem. Soc. **121**: 6142-6151.
- Jurcic, J. G. (2001). "Antibody therapy for residual disease in acute myelogenous leukemia." Crit Rev Oncol Hematol **38**(1): 37-45.
- Kasalicky, J. and V. Krajska (1998). "The effect of repeated strontium-89 chloride therapy on bone pain palliation in patients with skeletal cancer metastases." Eur J Nucl Med **25**(10): 1362-7.
- Kawakami, K., M. Kawakami and R. K. Puri (2001). "Overexpressed cell surface interleukin-4 receptor molecules can be successfully targeted for antitumor cytotoxin therapy." Crit Rev Immunol **21**(1-3): 299-310.
- Kennel, S. J., L. L. Chappell, K. Dadachova, M. W. Brechbiel, T. K. Lankford, I. A. Davis, M. Stabin and S. Mirzadeh (2000). "Evaluation of <sup>225</sup>Ac for vascular targeted radioimmunotherapy of lung tumors." Cancer Biother Radiopharm **15**(3): 235-44.
- Koch, I., Apostolides, C., Janssens, W., Molinet, R., van Geel, J. (1999). "Production of Ac-225 and application of the Bi-213 daughter in cancer therapy." Czech.J.Phys. **40**: 817-822.
- Kolbert, K. S., K. A. Hamacher, J. G. Jurcic, D. A. Scheinberg, S. M. Larson and G. Sgouros (2001). "Parametric images of antibody pharmacokinetics in Bi213-HuM195 therapy of leukemia." J Nucl Med **42**(1): 27-32.
- Kramer, K., N. K. Cheung, J. L. Humm, E. Dantis, R. Finn, S. J. Yeh, N. L. Antunes, I. J. Dunkel, M. Souwedaie and S. M. Larson (2000). "Targeted radioimmunotherapy for leptomeningeal cancer using (131)I-3F8." Med Pediatr Oncol **35**(6): 716-8.
- Kreitman, R. J. and I. Pastan (1997). "Recombinant toxins containing human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and either pseudomonas exotoxin or diphtheria toxin kill gastrointestinal cancer and leukemia cells." Blood **90**(1): 252-9.
- Kugler, E. (2000). The ISOLDE facility. ISOLDE Laboratory Portrait. G. B. D. F.-W. (eds.), Science Publisher BV. **Hyperfine Interactions** **129 (1-4) (2000) p23-42**.
- Kulmala, J., V. Rantanen, K. Pekkola-Heino, J. Tuominen and R. Grenman (1995). "Dosimetry of irradiation models. The 96-well clonogenic assay for testing radiosensitivity of cell lines." Acta Oncol **34**(1): 105-9.

- Kwa, H. B., J. Wesseling, A. H. Verhoeven, N. van Zandwijk and J. Hilkens (1996). "Immunoscintigraphy of small-cell lung cancer xenografts with anti neural cell adhesion molecule monoclonal antibody, 123C3: improvement of tumour uptake by internalisation." Br J Cancer **73**(4): 439-46.
- Lindl, T. (2000). Zell- und Gewebekultur, Spektrum Verlag.
- Lindmo, T., E. Boven, F. Cuttitta, J. Fedorko and P. A. Bunn, Jr. (1984). "Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess." J Immunol Methods **72**(1): 77-89.
- Lowenberg, B., J. R. Downing and A. Burnett (1999). "Acute myeloid leukemia." N Engl J Med **341**(14): 1051-62.
- Ma, D., M. R. McDevitt, E. Barendswaard, L. Lai, M. J. Curcio, V. Pellegrini, M. W. Brechbiel and D. A. Scheinberg (2002). "Radioimmunotherapy for model B cell malignancies using 90Y-labeled anti- CD19 and anti-CD20 monoclonal antibodies." Leukemia **16**(1): 60-6.
- Ma, D., M. R. McDevitt, R. D. Finn and D. A. Scheinberg (2001). "Rapid preparation of short-lived alpha particle emitting radioimmunopharmaceuticals." Appl Radiat Isot **55**(4): 463-70.
- Macklis, R. M., J. Y. Lin, B. Beresford, R. W. Atcher, J. J. Hines and J. L. Humm (1992). "Cellular kinetics, dosimetry, and radiobiology of alpha-particle radioimmunotherapy: induction of apoptosis." Radiat Res **130**(2): 220-6.
- Maloney, D. G. (2001). "Mechanism of action of rituximab." Anticancer Drugs **12 Suppl 2**: S1-4.
- McDevitt, M. R., E. Barendswaard, D. Ma, L. Lai, M. J. Curcio, G. Sgouros, A. M. Ballangrud, W. H. Yang, R. D. Finn, V. Pellegrini, M. W. Geerlings, Jr., M. Lee, M. W. Brechbiel, N. H. Bander, C. Cordon-Cardo and D. A. Scheinberg (2000). "An alpha-particle emitting antibody ([<sup>213</sup>Bi]J591) for radioimmunotherapy of prostate cancer." Cancer Res **60**(21): 6095-100.
- McDevitt, M. R., R. D. Finn, G. Sgouros, D. Ma and D. A. Scheinberg (1999). "An <sup>225</sup>Ac/<sup>213</sup>Bi generator system for therapeutic clinical applications: construction and operation." Appl Radiat Isot **50**(5): 895-904.
- McDevitt, M. R., D. Ma, L. T. Lai, J. Simon, P. Borchardt, R. K. Frank, K. Wu, V. Pellegrini, M. J. Curcio, M. Miederer, N. H. Bander and D. A. Scheinberg (2001). "Tumor therapy with targeted atomic nanogenerators." Science **294**(5546): 1537-40.
- McDevitt, M. R., M. Miederer, D. Ma, M. J. Curcio, L. T. Lai, V. Pellegrini, M. W. Brechbiel and D. A. Scheinberg (2000). Novel alpha particle emitting actinium-225 labeled anti-CD33 antibody constructs: synthesis and evaluation of biochemistry, potency, specificity and mechanism of cell death. 47th SNM Annual Meeting of Society of Nuclear Medicine, St. Louis, MO, USA.

- McDevitt, M. R., G. Sgouros, R. D. Finn, J. L. Humm, J. G. Jurcic, S. M. Larson and D. A. Scheinberg (1998). "Radioimmunotherapy with alpha-emitting nuclides." Eur J Nucl Med **25**(9): 1341-51.
- Moseley, R. P., A. G. Davies, R. B. Richardson, M. Zalutsky, S. Carrell, J. Fabre, N. Slack, J. Bullimore, B. Pizer, V. Papanastassiou and et al. (1990). "Intrathecal administration of <sup>131</sup>I radiolabelled monoclonal antibody as a treatment for neoplastic meningitis." Br J Cancer **62**(4): 637-42.
- Murray, J. L., J. E. Cunningham, H. Brewer, K. Mujoo, A. A. Zukiwski, D. A. Podoloff, L. P. Kasi, V. Bhadkamkar, H. A. Fritsche, R. S. Benjamin and et al. (1994). "Phase I trial of murine monoclonal antibody 14G2a administered by prolonged intravenous infusion in patients with neuroectodermal tumors." J Clin Oncol **12**(1): 184-93.
- Nikula, T. K., M. R. McDevitt, R. D. Finn, C. Wu, R. W. Kozak, K. Garmestani, M. W. Brechbiel, M. J. Curcio, C. G. Pippin, L. Tiffany-Jones, M. W. Geerlings, Sr., C. Apostolidis, R. Molinet, M. W. Geerlings, Jr., O. A. Gansow and D. A. Scheinberg (1999). "Alpha-emitting bismuth cyclohexylbenzyl DTPA constructs of recombinant humanized anti-CD33 antibodies: pharmacokinetics, bioactivity, toxicity and chemistry." J Nucl Med **40**(1): 166-76.
- O'Doherty, M. J., T. O. Nunan and D. N. Croft (1993). "Radionuclides and therapy of thyroid cancer." Nucl Med Commun **14**(9): 736-55.
- Orlandi, L., G. Bertoli, G. Abolafio, M. G. Daidone and N. Zaffaroni (2001). "Effects of liposome-entrapped anamycin in human breast cancer cells: interference with cell cycle progression and induction of apoptosis." J Cell Biochem **81**(1): 9-22.
- Paganelli, G., C. Belloni, P. Magnani, F. Zito, A. Pasini, I. Sassi, M. Meroni, M. Mariani, M. Vignali, A. G. Siccardi and et al. (1992). "Two-step tumour targeting in ovarian cancer patients using biotinylated monoclonal antibodies and radioactive streptavidin." Eur J Nucl Med **19**(5): 322-9.
- Pagliaro, L. C., B. Liu, R. Munker, M. Andreeff, E. J. Freireich, D. A. Scheinberg and M. G. Rosenblum (1998). "Humanized M195 monoclonal antibody conjugated to recombinant gelonin: an anti-CD33 immunotoxin with antileukemic activity." Clin Cancer Res **4**(8): 1971-6.
- Park, J. W., K. Hong, P. Carter, H. Asgari, L. Y. Guo, G. A. Keller, C. Wirth, R. Shalaby, C. Kotts, W. I. Wood and et al. (1995). "Development of anti-p185HER2 immunoliposomes for cancer therapy." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(5): 1327-31.
- Pippin, C. G., T. A. Parker, T. J. McMurry and M. W. Brechbiel (1992). "Spectrophotometric method for the determination of a bifunctional DTPA ligand in DTPA-monoclonal antibody conjugates." Bioconjug Chem **3**(4): 342-5.
- Poncet, P., A. Panczak, C. Goupy, K. Gustafsson, C. Blanpied, G. Chavanel, R. Hirsch and F. Hirsch (1996). "Antifection: an antibody-mediated method to introduce genes into lymphoid cells in vitro and in vivo." Gene Ther **3**(8): 731-8.

- Pressman, D., E. Day and M. Blau (1957). "The use of paired labeling in the determination of tumor-localising antibodies." Cancer Res **17**: 845-850.
- Roeske, J. C. and T. G. Stinchcomb (1997). "Dosimetric framework for therapeutic alpha-particle emitters." J Nucl Med **38**(12): 1923-9.
- Rohlf, J. W. (1994). Modern Physics from a to Z0, Wiley.
- Ruggiero, A., V. Conter, M. Milani, E. Biagi, I. Lazzareschi, P. Sparano and R. Riccardi (2001). "Intrathecal chemotherapy with antineoplastic agents in children." Paediatr Drugs **3**(4): 237-46.
- Saito, M., R. K. Yu and N. K. Cheung (1985). "Ganglioside GD2 specificity of monoclonal antibodies to human neuroblastoma cell." Biochem Biophys Res Commun **127**(1): 1-7.
- Schlumberger, M. and F. De Vathaire (1996). "[131 iodine: medical use. Carcinogenic and genetic effects]." Ann Endocrinol **57**(3): 166-76.
- Senekowitsch-Schmidtke, R., C. Schuhmacher, K. F. Becker, T. K. Nikula, C. Seidl, I. Becker, M. Miederer, C. Apostolidis, C. Adam, R. Huber, E. Kremmer, K. Fischer and M. Schwaiger (2001). "Highly specific tumor binding of a 213Bi-labeled monoclonal antibody against mutant E-cadherin suggests its usefulness for locoregional alpha-radioimmunotherapy of diffuse-type gastric cancer." Cancer Res **61**(7): 2804-8.
- Senekowitsch-Schmidtke, R., K. Steiner, J. Haunschild, S. Mollenstadt and R. Truckenbrodt (1996). "In vivo evaluation of epidermal growth factor (EGF) receptor density on human tumor xenografts using radiolabeled EGF and anti-(EGF receptor) mAb 425." Cancer Immunol Immunother **42**(2): 108-14.
- Sgouros, G., A. M. Ballangrud, J. G. Jurcic, M. R. McDevitt, J. L. Humm, Y. E. Erdi, B. M. Mehta, R. D. Finn, S. M. Larson and D. A. Scheinberg (1999). "Pharmacokinetics and dosimetry of an alpha-particle emitter labeled antibody: 213Bi-HuM195 (anti-CD33) in patients with leukemia." J Nucl Med **40**(11): 1935-46.
- Siewert, J. R. and A. Sandler (1999). "The current management of gastric cancer." Adv Surg **33**: 69-93.
- Stein, R., S. Chen, L. Reed, H. Richel and D. M. Goldenberg (2002). "Combining radioimmunotherapy and chemotherapy for treatment of medullary thyroid carcinoma: effectiveness of dacarbazine." Cancer **94**(1): 51-61.
- Stewart, R. D. (2001). "Two-lesion kinetic model of double-strand break rejoining and cell killing." Radiat Res **156**(4): 365-78.
- Thompson, C. B. (1995). "Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease." Science **267**(5203): 1456-62.
- van Kaick, G., H. Wesch, H. Luhrs and D. Liebermann (1986). "Radiation-induced primary liver tumors in "Thorotrast patients"." Recent Results Cancer Res **100**: 16-22.

- Wagner, H. N., Jr., G. A. Wiseman, C. S. Marcus, H. A. Nabi, C. E. Nagle, D. M. Fink-Bennett, D. M. Lamonica and P. S. Conti (2002). "Administration Guidelines for Radioimmunotherapy of Non-Hodgkin's Lymphoma with (90)Y-Labeled Anti-CD20 Monoclonal Antibody." J Nucl Med **43**(2): 267-272.
- Weber, W., J. Weber and R. Senekowitsch-Schmidtke (1996). "Therapeutic effect of m-[131I]- and m-[125I]iodobenzylguanidine on neuroblastoma multicellular tumor spheroids of different sizes." Cancer Res **56**(23): 5428-34.
- Wikstrand, C. J., L. P. Hale, S. K. Batra, M. L. Hill, P. A. Humphrey, S. N. Kurpad, R. E. McLendon, D. Moscatello, C. N. Pegram, C. J. Reist and et al. (1995). "Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas." Cancer Res **55**(14): 3140-8.
- Wilder, R. B., G. L. DeNardo and S. J. DeNardo (1996). "Radioimmunotherapy: recent results and future directions." J Clin Oncol **14**(4): 1383-400.
- Yi, E. S., D. Harclerode, M. Gondo, M. Stephenson, R. W. Brown, M. Younes and P. T. Cagle (1997). "High c-erbB-3 protein expression is associated with shorter survival in advanced non-small cell lung carcinomas." Mod Pathol **10**(2): 142-8.
- Yu, A. L., M. M. Uttenreuther-Fischer, C. S. Huang, C. C. Tsui, S. D. Gillies, R. A. Reisfeld and F. H. Kung (1998). "Phase I trial of a human-mouse chimeric anti-disialoganglioside monoclonal antibody ch14.18 in patients with refractory neuroblastoma and osteosarcoma." J Clin Oncol **16**(6): 2169-80.
- Zalutsky, M. R., X. G. Zhao, K. L. Alston and D. Bigner (2001). "High-level production of alpha-particle-emitting (211)At and preparation of (211)At-labeled antibodies for clinical use." J Nucl Med **42**(10): 1508-15.
- Ziegler, J. F., J. P. Biersack and U. Littmark (1985 (new edition in 2003)). The Stopping and Range of Ions in Solids, Pergamon Press, New York.

## 11 Anhang A, Monte Carlo Algorithmus für die Mikrodosimetrie

```
C  VERSION 21 FEBRUARY 1997
C  TO SCORE HITS FROM ALPHA TRACKS FROM A VOLUME AROUND CELLS OF ANY RADIUS
    DIMENSION DOSDIS(100),HITDIS(100),EINT(2),RAN(2)
    INTEGER PATHD(300),ST
    REAL NSUR,NNUC,NBOX
    DOUBLEPRECISION X,Y,Z
    DOUBLEPRECISION CX,CY,CZ
    COMMON /ALPHA/ E(2,900)
    COMMON /POSIT/X,Y,Z
    COMMON /COSINE/CX,CY,CZ
    COMMON/RADII/RA,RB,RC
    COMMON /TRACK/ LET,PASS,SINDOS(100)
    COMMON /POIS/P(100)
    COMMON /POISNC/PN(100)
    INTEGER XN,SINMX,SINDOS,STOP,START,FLAG,DEAD
    REAL LET
    CHARACTER *30 TEXT
    CHARACTER *13 TRACK
    DO 148 J=1,100
        HITDIS(J)=0.
        DOSDIS(J)=0.
        P(J)=0.
        PN(J)=0.
148  SINDOS(J)=0.
C  SINDOS IS DOSE DISTRIBUTION FOR SINGLE PASSAGES
    DO 149 J=1,300
149  PATHD(J)=0.
C
    OPEN(15,FILE='C:SEED1.DAT')
C      SEED NUMBER FOR RANDOM # GENERATOR
    OPEN(20,FILE='C:OUTHIT.DAT')
C      OUTPUT FOR THIS PROGRAMME
    OPEN(30,FILE='C:INHIT.DAT')
C      INPUT FOR THIS PROGRAMME
    WRITE(20,*)
    WRITE(20,*)
    WRITE(20,*) 'OUTPUT FROM HIT.FOR'
C  READ IN SEED
    READ(15,*) XN
    CLOSE(15)
    R=URAND(XN)
C
    READ(30,*)
    READ(30,444) TRACK
444  FORMAT(33X,A13)
    WRITE(*,*) 'NAME OF 1ST TRACK FILE  ',TRACK
    OPEN(25,FILE=TRACK)
    READ(25,108) TEXT
    READ(25,*) EINT(1)
    WRITE(20,108) TEXT
108  FORMAT(1X,A30)
    WRITE(20,*) 'Initial particle energy 1 ',EINT(1),' keV'
    DO 771 KK=1,1000
    READ(25,*) I,E(1,I)
    IF(E(1,I).LT.0) GO TO 772
771  CONTINUE
772  RAN(1)=(KK-1.)/10.
    WRITE(20,*) 'Range of alpha 1 ',RAN(1),' micrometer'
    READ(30,444) TRACK
```

```

WRITE(*,*) 'NAME OF 2ND TRACK FILE  ',TRACK
OPEN(26,FILE=TRACK)
READ(26,108) TEXT
READ(26,*) EINT(2)
WRITE(20,108) TEXT
WRITE(20,*) 'Initial particle energy 2 ',EINT(2),' keV'
DO 773 KK=1,1000
READ(26,*) I,E(2,I)
IF(E(2,I).LT.0) GO TO 774
773 CONTINUE
774 RAN(2)=(KK-1.)/10.
WRITE(20,*) 'Range of alpha 2 ',RAN(2),' micrometer'
WRITE(20,*)
C
MXRAN=AMAX1(RAN(1),RAN(2))
C*****
C
READ(30,421) PROB1,NCEL,NBOX,NSUR,NNUC,RA,RB,RC,CRA,CRB,CRC,STIVE
421 FORMAT(33X,F5.3/,33X,I8/,33X,E8.2/,33X,F6.2/,33X,F6.2/
+,33X,F5.1,F5.1,F5.1/,33X,F5.1,F5.1,F5.1/,33X,F5.2)
WRITE(*,*) 'Number of cells ',NCEL
WRITE(*,*) 'Number of decays/um3 in box ',NBOX
WRITE(*,*) 'Average number of decays on surface',NSUR
WRITE(*,*) 'Average number of decays in nucleus',NNUC
WRITE(*,*) 'Nuclear radii ',RA,RB,RC,' micrometer'
WRITE(*,*) 'Cell radii ',CRA,CRB,CRC,' micrometer'
WRITE(*,*) 'Sensitivity relative to CHO',STIVE
IF(NSUR.LT.30) CALL POISS(NSUR,JJ)
CALL POISN(NNUC,JK)
RADS=AMAX1(RA,RB,RC)
VOLCEL=4.*3.142*RA*RB*RC/3.
MAXHT=0
MXPTH=0
MAXDOS=0
TOTD=0.
C TOTD=TOTAL DOSE
TOTDS=0.
C TOTDS TOTAL DOSE FOR SINGLE HITS
TOTH=0.
C TOTH IS TOTAL NUMBER OF HITS
TOTP=0.
LET=0.
C LET IS THE SUM OF LETS FOR SINGLE PASSAGES:USED TO FIND
C TRACK AVERAGED LET REFERS TO PARTICLE
PASS=0.
C PASS IS NUMBER OF PASSAGES THROUGH STEM CELLS OF IONS
SINMX=0
C SINMX IS MAXIMUM DOSE FOR SINGLE PASSAGES: USED IN WRITE
C
EDGE=MXRAN+RADS+2.
C EDGE - DEFINE SIZE OF BOX
BOXV=8.*EDGE*EDGE*EDGE
NBOX=NBOX*BOXV
STOP=0
START=0
DEAD=0
DO 638 LL=1,NCEL
IF(LL/100.EQ.LL/100) WRITE(*,*) 'I AM AT ',LL
DOSES=0.
HITS=0.
C HITS IS NUMBER OF HITS IN ONE CELL
FLAG=0

```

```

C FLAG GT 0 IS DEAD CELL
C
  IF(NSUR.LT.30) THEN
    CALL EXACTS(JJ,IS,XN)
    ELSE
    IS=NSUR
    ENDIF
  CALL EXACTN(JK,IN,XN)
C IN=0
DO 210 K=1,NBOX+IS+IN
ST=0
C ST IS A FLAG FOR STARTERS OR STOPPERS
C CHOOSE ALPHA
  IF(URAND(XN),LT.PROB1) THEN
    MM=1
    ELSE
    MM=2
    ENDIF
  IF(K.LE.NBOX) THEN
203 X=EDGE*(2.0*URAND(XN)-1.)
    Y=EDGE*(2.0*URAND(XN)-1.)
    Z=EDGE*(2.0*URAND(XN)-1.)
    RADI=SQRT(X*X+Y*Y+Z*Z)
    T=(X*X)/(CRA*CRA)+(Y*Y)/(CRB*CRB)+(Z*Z)/(CRC*CRC)
C T IS A TEST FOR STARTERS IN CELL. T LT 1 IS A STARTER
C
    IF(T.LE.1.) GOTO 203
    GOTO 309
    ENDIF
C CHOOSE SURFACE POSITION
  IF(K.GE.NBOX.AND.K.LE.(NBOX+IS)) THEN
C 233 X=(CRA+1.)*(2.*URAND(XN)-1.)
C Y=(CRB+1.)*(2.*URAND(XN)-1.)
C Z=(CRC+1.)*(2.*URAND(XN)-1.)
C TEST=(X*X)/(CRA*CRA)+(Y*Y)/(CRB*CRB)+(Z*Z)/(CRC*CRC)
C IF(TEST.LT.0.96.OR.TEST.GT.1.04) GO TO 233
X=0.0
Y=0.0
Z=CRA
T=2.
GOTO 309
ENDIF
  IF(K.GT.(NBOX+IS)) THEN
C DECAYS IN NUCLEUS
234 X=(RA)*(2.*URAND(XN)-1.)
    Y=(RB)*(2.*URAND(XN)-1.)
    Z=(RC)*(2.*URAND(XN)-1.)
    TEST=(X*X)/(RA*RA)+(Y*Y)/(RB*RB)+(Z*Z)/(RC*RC)
    IF(TEST.GT.1.0) GO TO 234
    T=TEST
    ENDIF
    GOTO 311
C IF(ABS(X).LT.0.2) WRITE(40,*) Y,Z
C DISPLAY LABELS ON SURFACE
309 IF(URAND(XN).LT.0.5) GOTO 210
C REJECT HALF OF ALPHAS OUTSIDE NUCLEUS THEY GO THE WRONG WAY
311 CALL ISO(XN)
    CALL HIT1(XN,TO,EXIT,T,*210,*310)
    IF(RAN(MM).LT.TO) GOTO 210
    CALL SCORE(TO,EXIT,DOSE,SINMX,TOTDS,RAN(MM),EINT(MM),STOP,
+PATH,ALET,VOLCEL,ST,MM,*312)
310 START=START+1

```

```

CALL SCOREI(EXIT,DOSE,SINMX,TOTDS,RAN(MM),EINT(MM),PATH,ALET,
+VOLCEL,ST,MM)
312 DOSES=DOSES+DOSE
TOTD=TOTD+DOSE
TOTH=TOTH+1.
HITS=HITS+1.
IF(FLAG.EQ.0)CALL SURV(TO,PATH,DEAD,XN,FLAG,ALET,STIVE,RAN(MM))
    I=PATH*10+1
    PATHD(I)=PATHD(I)+1
    MXPTH=AMAX0(MXPTH,I)
    TOTP=TOTP+PATH
210 CONTINUE
C
I=HITS+1
HITDIS(I)=HITDIS(I)+1.
MAXHT=AMAX0(MAXHT,I)
IF(DOSES.GT.0.0)THEN
    I=(DOSES*10.) +1.
    IF(I.GT.100) I=100
    MAXDOS=AMAX0(MAXDOS,I)
    DOSDIS(I)=DOSDIS(I)+1
    ELSE
    GOTO 638
ENDIF
638 CONTINUE
WRITE(20,*) 'NUMBER OF CELLS = ',NCEL
WRITE(20,99) RA,RB,RC
99 FORMAT('Radii of nuclei ',3(F4.1,2X),' micrometer')
WRITE(20,98) CRA,CRB,CRC
98 FORMAT('Radii of cells ',3(F4.1,2X),' micrometer')
WRITE(20,*) 'Sensitivity relative to CHO ',STIVE
WRITE(20,*)
WRITE(20,*) 'Average number of decays in box= ',NBOX
WRITE(20,*) 'Average number of decays on cell surface= ',NSUR
WRITE(20,*) 'Average number of decays in cell nucleus= ',NNUC
WRITE(20,*)
WRITE(20,*) 'Edge of box ',2.*EDGE,' micrometer'
WRITE(20,*)
VOL=2.*EDGE*2.*EDGE*2.*EDGE
WRITE(20,*) 'Decays per micrometer**3 = ',NBOX/VOL
WRITE(20,*)
WRITE(20,*) 'Total number of hits ',TOTH
WRITE(20,*) 'Total number of cells ',NCEL
WRITE(20,*) 'Total number of cells hit ',NCEL-HITDIS(1)
WRITE(20,*) 'Number of dead cells ',DEAD
IF(DEAD.EQ.NCEL) GOTO 457
SUR=1.-FLOAT(DEAD)/FLOAT(NCEL)
AVE=EINT(1)*PROB1+EINT(2)*(1.-PROB1)
DD=TOTD/NCEL
AA=TOTH/NCEL
BB=AA/(-ALOG(SUR))
WRITE(20,*) 'Fraction surviving ', SUR
WRITE(20,*)
WRITE(20,*) 'Do ',DD/(-ALOG(SUR)),' Gy',' (Average nuclear dose)'
WRITE(20,*) 'Number of hits at Do ',BB
WRITE(20,*) 'Surface decays at Do ', NSUR/(-ALOG(SUR))
WRITE(20,*)
457 CONTINUE
WRITE(20,*) 'Fraction of cells hit = ', (NCEL-HITDIS(1))/NCEL
WRITE(20,*) 'Average dose to target cell = ',TOTD/NCEL,'Gy'
DBAR=0.16*(EINT(1)*PROB1+EINT(2)*(1.-PROB1))*(NBOX+NSUR+NNUC)/VOL
WRITE(20,*) 'Average dose in box = ',DBAR,'Gy'

```

```

WRITE(20,*)
WRITE(20,*) 'Average dose to hit cells =',TOTD/(NCEL-HITDIS(1))
WRITE(20,*)
WRITE(20,*)
ANUM=TOTH/NCEL
WRITE(20,*) 'AVERAGE # OF PASSAGES PER CELL = ',ANUM
WRITE(20,*) 'Fraction of cells hit from above ',1.-EXP(-ANUM)
WRITE(20,*)
WRITE(20,*) 'Number of stoppers ',STOP
WRITE(20,*) 'Number of starters ',START
WRITE(20,*)
WRITE(20,*) 'Average path length per hit',TOTP/TOTH
WRITE(20,*) 'Average total path length through hit cells',TOTP/(NC
+EL-HITDIS(1))
WRITE(20,*)
WRITE(20,*) 'TOTAL DOSE DISTRIBUTION IN 10 RAD INTERVALS'
WRITE(20,*) '(Does not include zero dose)'
WRITE(20,*)
DO 333 I=1,MAXDOS,5
333 WRITE(20,334) (DOSDIS(J),J=I,I+4)
334 FORMAT(2X,5(F7.0,2X))
WRITE(20,*)
WRITE(20,*) 'HIT DISTRIBUTION '
WRITE(20,*)
DO 335 I=1,MAXHT
335 WRITE(20,336) I-1,HITDIS(I)
336 FORMAT(2X,I3,3X,F9.0)
WRITE(20,*)
WRITE(20,*) 'PATH LENGTH DISTRIBUTION'
WRITE(20,*) '0.1 micrometer intervals'
WRITE(20,*)
DO 338 I=1,MXPHT,10
338 WRITE(20,339) (PATHD(JJ),JJ=I,I+9)
339 FORMAT(1X,10(I4,2X))
SUM=PASS
WRITE(20,*)
WRITE(20,*) ' LET averaged from passages',LET/SUM,' keV/æm'
WRITE(20,*)
WRITE(20,*) 'Dose distribution in 5 rad intervals for single passa
+ges'
DO 855 J=1,SINMX,5
855 WRITE(20,*) (SINDOS(JJ),JJ=J,J+4)
SUM1=0.
SUM2=0.
DO 186 J=1,SINMX
SUM1=SUM1+(J-0.5)*SINDOS(J)
186 SUM2=SUM2+SINDOS(J)
WRITE(20,*)
AD=TOTDS/TOTH
WRITE(20,*) 'Average dose for single hit = ',AD,' Gy'
C*****
OPEN(15,FILE='C:SEED1.DAT')
WRITE(15,*) -XN
CLOSE(15)
STOP
END
C*****
C REAL FUNCTION URAND(XN)
C INTEGER XN,A,C,M
C A=2147437301
C C=453816693
C M=2**31

```

```

C  XN=XN*A+C
C  IF(XN.LT.0)XN=XN+M
C  URAND=(XN)/(2.**31)
C  RETURN
C  END
C*****
REAL FUNCTION SHUF(XN)
C  SELECTS RANDOM NUMBER FROM AN ARRAY OF 100 (SHUFFLES)
INTEGER XN
COMMON /RANDOM/R(100)
J=URAND(XN)*100.+1
SHUF=R(J)
R(J)=URAND(XN)
RETURN
END
C*****
SUBROUTINE ISO(XN)
C  GENERATION OF ISTROPIC DIRECTION COSINES
INTEGER XN
DOUBLEPRECISION CX,CY,CZ
COMMON /COSINE/CX,CY,CZ
1  ALPH=2.*3.1415926542*URAND(XN)
   BETA=ACOS(2.*URAND(XN)-1.)
C
CX=SIN(BETA)*COS(ALPH)
CY=SIN(BETA)*SIN(ALPH)
CZ=COS(BETA)
IF(CX.LT.1E-6) GOTO 1
RETURN
END
C*****
SUBROUTINE CHECK(X,Y,Z,RADIUS)
C  TO CHECK THAT INDEED THE ALPHA LINE GOES THROUGH THE STEM CELL
C  RADIUS OF STEM CELL WRITTEN TO SCREEN IF CORRECT
RADIUS=SQRT(X*X+Y*Y+Z*Z)
C  WRITE(*,*) RADIUS
RETURN
END
C*****
SUBROUTINE SCORE(TO,EXIT,DOSE,SINMX,TOTDS,RAN,EINT,STOP,PATH,
+ALET,VOL,ST,MM,*)
C  TO CALCULATE ENERGY DEPOSITED IN TARGET CELL
INTEGER ST
COMMON /ALPHA/ E(2,900)
COMMON /TRACK/ LET,PASS,SINDOS(100)
REAL LET
INTEGER SINMX,SINDOS,STOP
C  EIN IS ENERGY ON ARRIVAL: EOUT IS ENERGY AT EXIT
LIN=TO*10.
IF(LIN.LT.1) THEN
   EIN=EINT-(EINT-E(MM,1))*TO*10.
ELSE
   EIN=(E(MM,LIN)-E(MM,LIN+1))*(LIN-TO*10.)+E(MM,LIN)
ENDIF
LOUT=EXIT*10.
IF(EXIT.GE.RAN) THEN
   EOUT=0.0
   EXIT=RAN
   STOP=STOP+1
   ST=1
   GOTO 1
ENDIF

```

```

IF(LOUT.LT.1) THEN
    EOUT=EINT-(EINT-E(MM,1))*EXIT*10.
    GOTO 1
ENDIF
EOUT=E(MM,LOUT)-(E(MM,LOUT)-E(MM,LOUT+1))*(EXIT*10.-LOUT)
C
1 ENERGY =EIN-EOUT
IF(ENERGY.LT.0.) THEN
    WRITE(*,*) EIN,EOUT
    WRITE(*,*) TO,EXIT
ENDIF
DOSE=0.16*ENERGY/VOL
TOTDS=TOTDS+DOSE
ALET=ENERGY/(EXIT-TO)
LET=LET+ENERGY/(EXIT-TO)
PASS=PASS+1.
C IF(PASS.LT.1000.) WRITE(35,*) DOSE,ENERGY/(EXIT-TO)
KK=(DOSE*20.)+1
IF(KK.GT.100) KK=100
SINMX=AMAX0(KK,SINMX)
SINDOS(KK)=SINDOS(KK)+1
PATH=EXIT-TO
RETURN 1
END
C*****
SUBROUTINE SCOREI(EXIT,DOSE,SINMX,TOTDS,RAN,EINT,PATH,ALET,
+VOL,ST,MM)
C TO CALCULATE ENERGY DEPOSITED IN TARGET CELL FOR STARTERS
COMMON /ALPHA/ E(2,900)
COMMON /TRACK/ LET,PASS,SINDOS(100)
REAL LET
INTEGER SINMX,SINDOS,ST
ST=1
C EIN INITIAL ALPHA ENERGY: EOUT IS ENERGY AT EXIT
EIN=EINT
C
LOUT=EXIT*10.
IF(EXIT.GE.RAN) THEN
    EOUT=0.0
    EXIT=RAN
    GOTO 1
ENDIF
IF(LOUT.LT.1) THEN
    EOUT=EINT-(EINT-E(MM,1))*EXIT*10.
    GOTO 1
ENDIF
EOUT=E(MM,LOUT)-(E(MM,LOUT)-E(MM,LOUT+1))*(EXIT*10.-LOUT)
C
1 ENERGY =EIN-EOUT
DOSE=0.16*ENERGY/VOL
TOTDS=TOTDS+DOSE
PASS=PASS+1.
LET=LET+ENERGY/EXIT
ALET=ENERGY/EXIT
C IF(PASS.LT.1000.) WRITE(35,*) DOSE,ENERGY/EXIT
KK=DOSE*20.+1
IF(KK.GT.100) KK=100
SINMX=AMAX0(KK,SINMX)
SINDOS(KK)=SINDOS(KK)+1
PATH=EXIT
RETURN
END

```

```

C*****
SUBROUTINE TESTHT(XN,TO,EXIT,RADS,RADI,*,*)
C TO SEE IF LINE FROM DECAY PASSES THROUGH TARGET CELL
INTEGER XN
DOUBLEPRECISION CX,CY,CZ
DOUBLEPRECISION X,Y,Z
DOUBLEPRECISION GG,BB,TEST,A,B,C
COMMON /COSINE/CX,CY,CZ
COMMON /POSIT/X,Y,Z
GG=CZ/CX
BB=CY/CX
C A B AND C ARE THE TERMS IN QUADRATIC
A=1.+GG*GG+BB*BB
B=2.*(BB*Y+GG*Z)-2.*X*(BB*BB+GG*GG)
C=X*X*(BB*BB+GG*GG)-2.*X*(GG*Z+BB*Y)+Z*Z+Y*Y-RADS*RADS
TEST=B*B-4.*A*C
IF(TEST.GT.0.) THEN
    X1=(-B+SQRT(TEST))/(2.*A)
    Y1=BB*(X1-X)+Y
    Z1=GG*(X1-X)+Z
C    CALL CHECK(X1,Y1,Z1,RADIUS)
    DIST1=SQRT((X1-X)**2+(Y1-Y)**2+(Z1-Z)**2)
    X2=(-B-SQRT(TEST))/(2.*A)
    Y2=BB*(X2-X)+Y
    Z2=GG*(X2-X)+Z
C    CALL CHECK(X2,Y2,Z2,RADIUS)
    DIST2=SQRT((X2-X)**2+(Y2-Y)**2+(Z2-Z)**2)
    ELSE
    RETURN 1
ENDIF
C FIND SHORTER OF DIST1 AND DIST2
C TO IS DISTANCE TO ENTRY
C EXIT IS DISTANCE TO EXIT
C
    TO=AMIN1(DIST1,DIST2)
    EXIT=AMAX1(DIST1,DIST2)
    IF(RADI.LT.RADS) THEN
        IF(URAND(XN).LT.0.5) THEN
            EXIT=TO
            RETURN 2
        ELSE
            EXIT=EXIT
            RETURN 2
        ENDIF
    ENDIF
C
RETURN
END
C*****
SUBROUTINE SURV(TO,PATH,DEAD,XN,FLAG,ALET,STIVE,RAN)
C TO CALCULATE SURVIVAL - SUMMING DEADS
INTEGER DEAD,XN,FLAG
REAL LAM
C WRITE(*,*) ALET,TO
77 LAM=10.7
IF(ALET.LT.100..AND.TO/RAN.LT.0.5) LAM=108.-0.97*ALET
LAM=LAM*STIVE
2 R=URAND(XN)
IF(R.LT.0.0000001) R=0.0000001
DEL=-LAM*ALOG(R)
C WRITE(*,*) DEL,PATH
IF(DEL.LT.PATH) THEN

```

```

        DEAD=DEAD+1
        FLAG=1
    ENDIF
RETURN
END
C*****
SUBROUTINE HIT1(XN,TO,EXIT,T,*,*)
C   TO CHECK IF LINE FROM DECAY SITE PASSES THROUGH NUCLEUS
C   REMINDER:ABC NUCLEAR RADII;XYZ ORIGIN OF TRACK;CX,CY,CZ DIRECTIONS
INTEGER XN
DOUBLEPRECISION CX2,AA,FIRST1,CC,B2,XX2,SECND,FIRST
DOUBLEPRECISION CX,CY,CZ
DOUBLEPRECISION XA,YA,ZA
COMMON /COSINE/CX,CY,CZ
COMMON /POSIT/XA,YA,ZA
COMMON/RADII/RA,RB,RC
C   XA,YA,ZA IS POSITION OF DECAY
C
C   USING  $A*X^2+B*X+C=0$ 
C   CHECK IF  $B^2-4AC$  IS POSITIVE
C   ROOTS ARE THEN REAL
C
C   EVALUATION OF  $4AC$ 
C
    B2=RB*RB
    CX2=CX*CX
    C2=RC*RC
    XX2=XA*XA
    CC=(CY*CY*XX2)/(CX2*B2)-2.*(CY*XA*YA)/(CX*B2)+
+   (YA*YA)/(B2)+(CZ*CZ*XX2)/(CX2*C2)-
+   2.*(CZ*XA*ZA)/(CX*C2)+(ZA*ZA)/(C2)-1.
C
    AA=1/(RA*RA)+(CY*CY)/(CX2*B2)+
+   (CZ*CZ)/(CX2*C2)
C
    SECND=4.*AA*CC
C
C   EVALUATION OF  $B^2$ 
C
    FIRST=2.*(-(CY*CY*XA)/(CX2*B2)+
+   (CY*YA)/(CX*B2)-(CZ*CZ*XA)/(CX2*C2)+
+   (CZ*ZA)/(CX*C2))
C
    FIRST1=FIRST*FIRST
C
    TEST=FIRST1-SECND
    IF(TEST.LT.0.00000001) RETURN1
C
C   SCORE A POSSIBLE HIT
C   CALCULATE CO-ORDINATES OF INTERSECTION OF TRACK
C   WITH ELLIPSOID SURFACE
C
    X1=(-FIRST+SQRT(FIRST1-SECND))/(2.*AA)
    X2=(-FIRST-SQRT(FIRST1-SECND))/(2.*AA)
    Y1=(CY*(X1-XA)/CX)+YA
    Y2=(CY*(X2-XA)/CX)+YA
    Z1=(CZ*(X1-XA)/CX)+ZA
    Z2=(CZ*(X2-XA)/CX)+ZA
        DIST1=SQRT((X1-XA)**2+(Y1-YA)**2+(Z1-ZA)**2)
        DIST2=SQRT((X2-XA)**2+(Y2-YA)**2+(Z2-ZA)**2)
C   FIND SHORTER OF DIST1 AND DIST2
C   TO IS DISTANCE TO ENTRY

```

```

C   EXIT IS DISTANCE TO EXIT
C
      TO=AMIN1(DIST1,DIST2)
      EXIT=AMAX1(DIST1,DIST2)
C
C   THE SUBROUTINE BELOW CHECKS IF CO-ORDINATES
C   OF INTERSECTION CUT SURFACE OF ELLIPSOID
C
      IF(T.LE.1.) THEN
          IF(URAND(XN).LE.0.5) THEN
              EXIT=TO
              RETURN2
          ELSE
              EXIT=EXIT
              RETURN2
          ENDIF
      ENDIF
      RETURN
      END
C*****
      REAL FUNCTION URAND(XN)
C   32 BIT RANDOM NUMBER GENERATOR
      PARAMETER (M=259200,IA=7141,IC=54773,RM=1./M)
      DIMENSION IR(97)
      INTEGER XN
      DATA IFF/0/
      IF(XN.LT.0.OR.IFF.EQ.0) THEN
          IFF=1
          XN=MOD(IC-XN,M)
          DO 11 J=1,97
              XN=MOD(IA*XN+IC,M)
              IR(J)=XN
          11      CONTINUE
          XN=MOD(IA*XN+IC,M)
          IY=XN
          ENDIF
          J=1+(97*IY)/M
          IF(J.GT.97.OR.J.LT.1) THEN
              WRITE(*,*) 'TROUBLE IN RANDOM'
              STOP
          ENDIF
          IY=IR(J)
          URAND=IY*RM
          XN=MOD(IA*XN+IC,M)
          IR(J)=XN
          RETURN
      END
C*****
      SUBROUTINE POISS(NSUR,I)
C   SURFACE DISTRIBUTION
C   TO GENERATE A POISSON DISTRIBUTION FROM NSUR:I IS NUMBER OF TERMS
      COMMON /POIS/P(100)
      REAL NSUR
      P(1)=EXP(-NSUR)
      P(2)=P(1)*NSUR
      SUM=P(1)+P(2)
      DO 100 I=3,100
          P(I)=P(I-1)*NSUR/(I-1)
          SUM=SUM+P(I)
          IF(SUM.GT.0.999) GOTO 200
      100 CONTINUE
C   NORMALISE SUM TO ONE

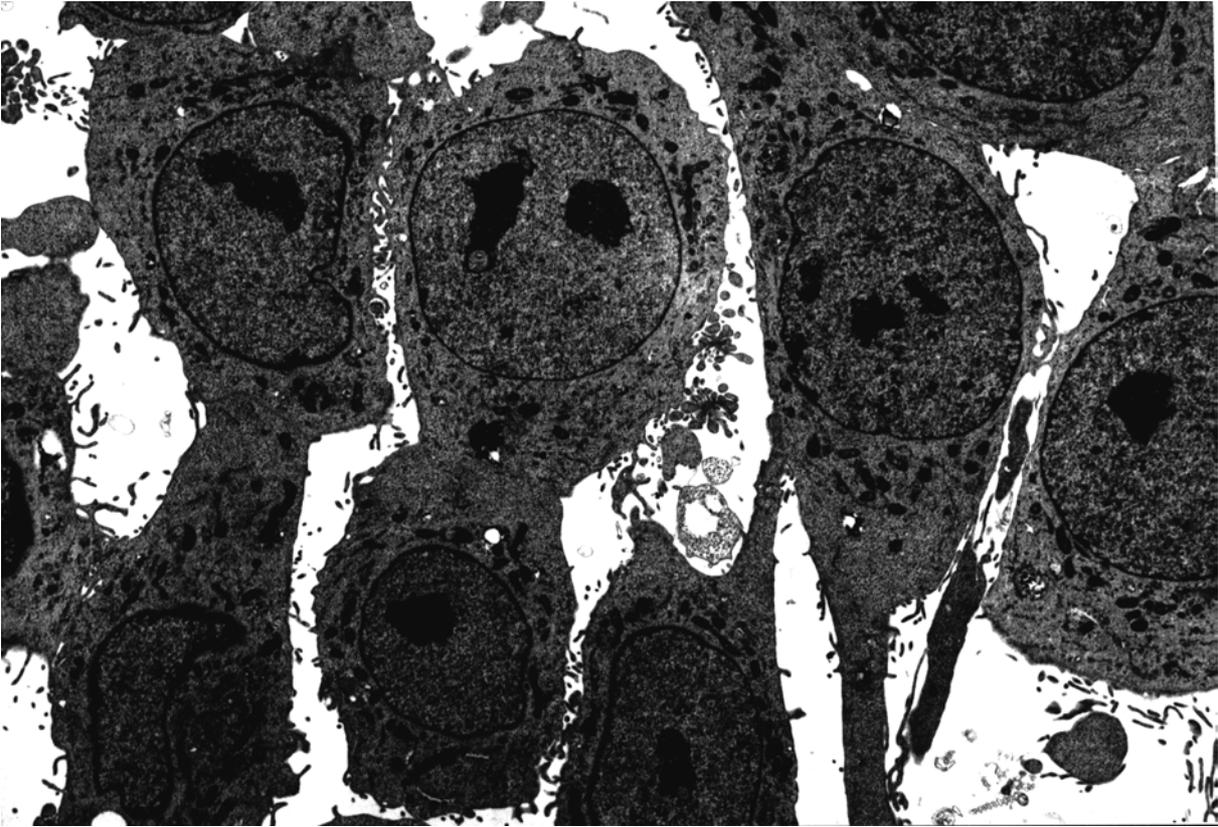
```

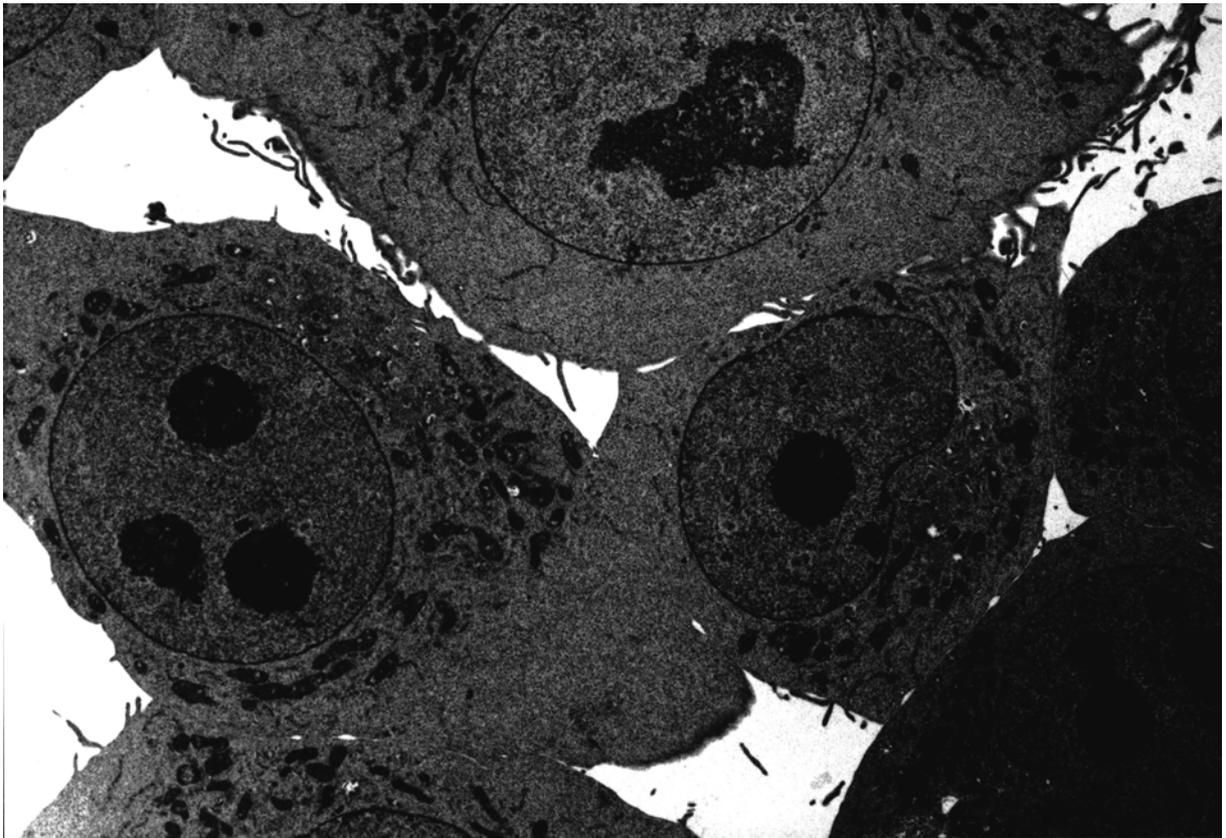
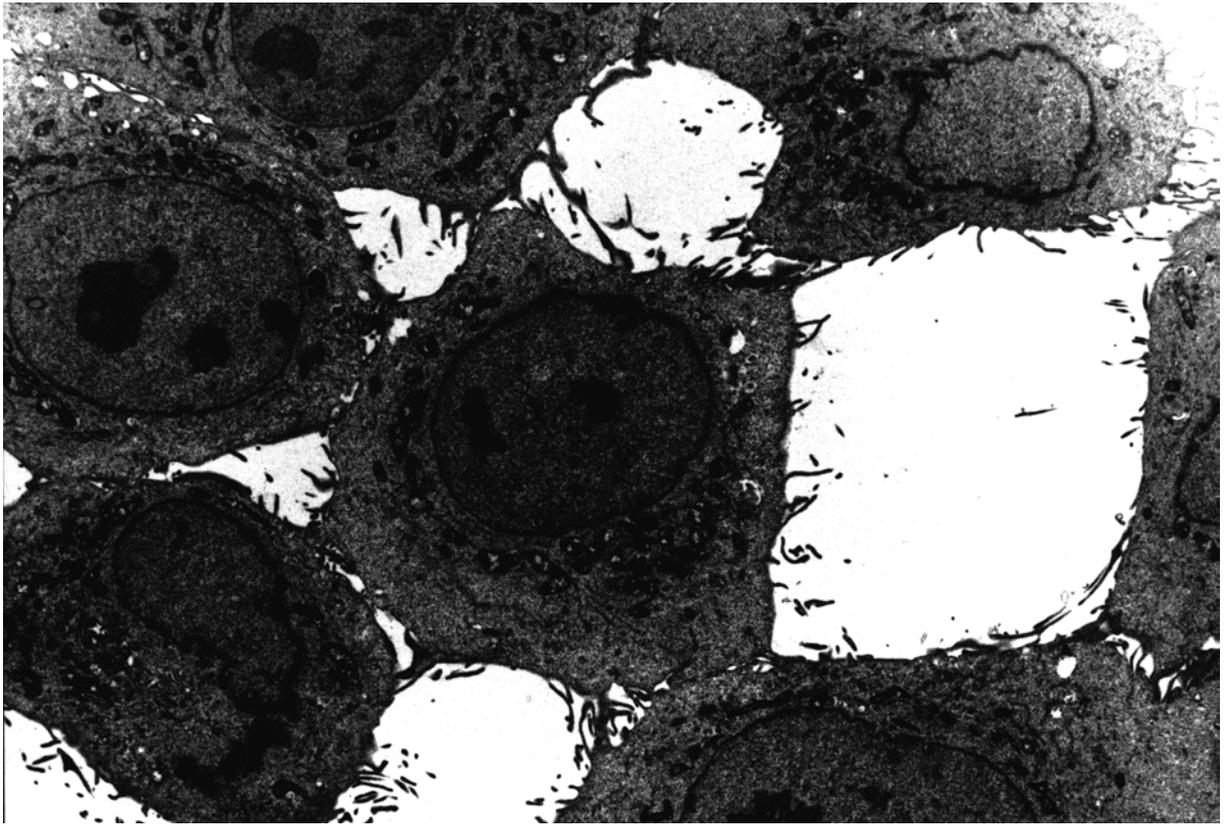
```

200 DO 300 K=1,I
300 P(K)=P(K)/SUM
C
  RETURN
  END
C*****
  SUBROUTINE POISN(NNUC,I)
C NUCLEAR DISTRIBUTION
C TO GENERATE A POISSON DISTRIBUTION FROM NNUC:I IS NUMBER OF TERMS
COMMON /POISNC/ PN(100)
REAL NNUC
PN(1)=EXP(-NNUC)
PN(2)=PN(1)*NNUC
SUM=PN(1)+PN(2)
DO 100 I=3,100
PN(I)=PN(I-1)*NNUC/(I-1)
SUM=SUM+PN(I)
IF(SUM.GT.0.999) GOTO 200
100 CONTINUE
C NORMALISE SUM TO ONE
200 DO 300 K=1,I
300 PN(K)=PN(K)/SUM
C
  RETURN
  END
C*****
  SUBROUTINE EXACTS(KK,NODEC,XN)
C TO FIND EXACT NUMBER OF DECAYS ON SURFACE FROM AVERAGE
C KK NUMBER OF TERMS,NODEC=NUMBER OF DECAYS
COMMON /POIS/P(100)
INTEGER XN
SUM=0.
R=URAND(XN)
DO 3 J=1,KK
SUM=SUM+P(J)
IF(SUM.GT.R) THEN
  NODEC=J-1
  RETURN
ENDIF
3 CONTINUE
RETURN
END
C*****
  SUBROUTINE EXACTN(KK,NODEC,XN)
C TO FIND EXACT NUMBER OF DECAYS IN NUCLEUS FROM AVERAGE
C KK NUMBER OF TERMS,NODEC=NUMBER OF DECAYS
COMMON /POISNC/PN(100)
INTEGER XN
SUM=0.
R=URAND(XN)
DO 3 J=1,KK
SUM=SUM+PN(J)
IF(SUM.GT.R) THEN
  NODEC=J-1
  RETURN
ENDIF
3 CONTINUE
RETURN
END
C*****

```

**12 Anhang B, elektronenmikroskopische Aufnahmen der MDA MB 435S Zellen**





## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Dr. Reingard Senekowitsch-Schmidtke für die intensive Betreuung. Vor allem die geduldige Unterstützung beim Erlernen wissenschaftlichen Arbeitens haben maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Herrn David A. Scheinberg, MD, PhD danke ich herzlich für die Betreuung in seinem Labor am Memorial Sloan Kettering Cancer Center in New York.

Ebenso möchte ich Herrn Prof. Dr. Gerd J. Beyer für die interessante Zusammenarbeit mit dem CERN in Genf danken.

Herrn Dr. Christof Seidl gilt mein Dank für die Durchsicht meiner Arbeit und die unzähligen Verbesserungsvorschläge.

Herrn Prof. E Schmid möchte ich für die Auswertung der Chromosomenaberrationen danken.

Herrn Dr. K.F. Becker danke ich für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der MDA Zellen und Herrn Dave Charlton, PhD danke ich für die freundliche Überlassung des Monte Carlo Algorithmus zur mikrodosimetrischen Simulation.

Außerdem danke ich den Mitarbeitern an der ISOLDE Collaboration am CERN, am Institut für Transurane in Karlsruhe, am MSKCC in New York und in der nuklearmedizinischen Klinik in München für die außerordentlich gute Zusammenarbeit.

# Lebenslauf

---

## Schulbildung/Wehrdienst

- 1987 - 1995 Käthe-Kollwitz Gymnasium Neustadt a.d. Weinstraße
- 1995-96 Wehrdienst im Sanitätsdienst der Luftwaffe

## Studium

- 1996-1998 Medizinstudium an der Universität Hamburg
- 1998 – 2002 Medizinstudium an der Technischen Universität München
- WS 2000/2001 ‘4<sup>th</sup> year medical student’ an der Cornell University in NY

## Forschungstätigkeit

- 1998 – 2001 Doktorand im Radioimmunologischen Labor der Nuklearmedizinischen Klinik bei Prof. Dr. Dr. Senekowitsch-Schmidtke
- Sommer 1999 Forschungsaufenthalt am Memorial Sloan-Kettering Cancer Center in New York unter der Leitung von Prof. Dr. Scheinberg
- Mai 2000 Forschungsaufenthalt am CERN in Genf bei Prof. Dr. GJ Beyer  
In vitro Versuche zur Zytotoxizität der alpha-Strahler Bismuth-213 und Terbium-149
- Sommer 2000 ‘graduate research assistant’ im Department of Molecular Pharmacology and Therapeutics, Sloan Kettering Institute, NY  
Untersuchung der pharmakologischen Eigenschaften eines Actinium-225 markierten Anti-Gangliosid GD<sub>2</sub> Antikörperes in vitro und in vivo
- Mai 2001 Forschungsaufenthalt am CERN in Genf bei Prof. Dr. GJ Beyer  
Untersuchung der therapeutischen Wirksamkeit von Terbium-149 gekoppelt an den CD20 Antikörper Rituximab am xenotransplantierten SCID-Mausmodell