

**Bewertung der lokoregionalen Radioimmuntherapie  
disseminierter Tumorzellen des diffusen Magenkarzinoms mit  
tumorspezifischen  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugaten im Mausmodell**

Christine Anne Zöckler

Nuklearmedizinische Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München

**Bewertung der lokoregionalen Radioimmuntherapie  
disseminierter Tumorzellen des diffusen Magenkarzinoms mit  
tumorspezifischen  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugaten im Mausmodell**

Christine Anne Zöckler

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. apl. Prof. Dr. B. J. Krause

Die Dissertation wurde am 18.09.2006 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 13.12.2006 angenommen.

*Für Ulrich*

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>ZIELSETZUNG</b> .....	<b>7</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>8</b>
<b>3.1</b>	<b>Chemikalien</b> .....	<b>8</b>
<b>3.2</b>	<b>Medikamente</b> .....	<b>8</b>
<b>3.3</b>	<b>Verbrauchsmaterialien</b> .....	<b>9</b>
<b>3.4</b>	<b>Lösungen</b> .....	<b>9</b>
<b>3.5</b>	<b>Geräte</b> .....	<b>9</b>
<b>3.6</b>	<b>Radioimmunkonjugate</b> .....	<b>10</b>
3.6.1	Antikörper .....	10
3.6.2	Radionuklid .....	11
3.6.2.1	Chelatierung der Antikörper .....	11
3.6.2.2	<sup>177</sup> Lu-Markierung der Antikörper .....	12
<b>3.7</b>	<b>Zellen und Zellkultivierung</b> .....	<b>13</b>
3.7.1	Humane Siegelringkarzinomzellen HSC45-M2 .....	13
3.7.1.1	Kultivierung .....	13
<b>3.8</b>	<b>Versuchstiere und Versuchstierhaltung</b> .....	<b>14</b>
3.8.1	Anästhesie und Tötung .....	15
<b>3.9</b>	<b>In vitro Versuche</b> .....	<b>15</b>
3.9.1	Stabilität der <sup>177</sup> Lu-Immunkonjugate .....	15
3.9.2	Bindung der <sup>177</sup> Lu-Immunkonjugate an Tumorzellen.....	15
3.9.3	Klonogener Test .....	16
<b>3.10</b>	<b>In vivo Versuche</b> .....	<b>16</b>
3.10.1	Tumormodell.....	16
3.10.2	Verteilung von <sup>177</sup> Lu-Immunkonjugaten.....	17
3.10.2.1	Darstellung der Verteilung mittels Szintigraphie.....	17
3.10.2.2	Biodistribution .....	18
3.10.2.3	Dosimetrie .....	19
3.10.2.4	Gesamtkörperretention von <sup>177</sup> Lu-d9MAk Konjugaten .....	20
3.10.3	Radioimmuntherapie mit <sup>177</sup> Lu-Immunkonjugaten.....	20
3.10.4	Toxizitätsstudien .....	22
3.10.4.1	Bestimmung der Leukozyten und Erythrozyten .....	22
3.10.4.2	Toxizitätsbeurteilung anhand histologischer Präparate .....	23
<b>3.11</b>	<b>Statistische Auswertung</b> .....	<b>23</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>24</b>
<b>4.1</b>	<b><sup>177</sup>Lu-Markierung von d9MAk bzw. d8MAk</b> .....	<b>24</b>
<b>4.2</b>	<b>Stabilität der <sup>177</sup>Lu-Immunkonjugate</b> .....	<b>24</b>

---

<b>4.3</b>	<b>Bindung der <sup>177</sup>Lu-Immunkonjugate an Tumorzellen .....</b>	<b>25</b>
<b>4.4</b>	<b>Klonogener Test .....</b>	<b>27</b>
<b>4.5</b>	<b>Biodistributionsstudien.....</b>	<b>28</b>
4.5.1	Verteilung von <sup>177</sup> Lu-d9MAk bzw. <sup>177</sup> Lu-d8MAk in Mäusen mit Peritonealkarzinose nach i.p. Applikation .....	28
4.5.1.1	Verteilung 1 h nach i.p. Applikation.....	29
4.5.1.2	Verteilung 3 h nach i.p. Applikation.....	30
4.5.1.3	Verteilung 2 d bzw. 7 d nach i.p. Applikation.....	32
4.5.2	Verteilung von <sup>177</sup> Lu-d9MAk bzw. <sup>177</sup> Lu-d8MAk in Mäusen mit Peritonealkarzinose 1 h nach i.v. Applikation .....	34
4.5.3	Verteilung i.p. bzw. i.v. applizierter <sup>177</sup> Lu-d9MAk Konjugate in Mäusen ohne Peritonealkarzinose .....	36
4.5.3.1	Verteilung 1 h, 3 h, 1 d, 3 d und 7 d nach i.p. Applikation.....	36
4.5.3.2	Verteilung 1 h, 1 d und 2 d nach i.v. Applikation.....	38
4.5.4	Zeitlicher Verlauf i.p. applizierter <sup>177</sup> Lu-d9MAk Konjugate im Knochenmark .....	38
<b>4.6</b>	<b>Dosimetrie .....</b>	<b>40</b>
<b>4.7</b>	<b>Darstellung i.p. applizierter <sup>177</sup>Lu-Immunkonjugate mittels Szintigraphie</b>	<b>42</b>
<b>4.8</b>	<b>Ganzkörperretention von <sup>177</sup>Lu-Immunkonjugaten.....</b>	<b>44</b>
<b>4.9</b>	<b>Therapiestudien I .....</b>	<b>45</b>
<b>4.10</b>	<b>Therapiestudie II.....</b>	<b>53</b>
<b>4.11</b>	<b>Toxizitätsstudien .....</b>	<b>54</b>
4.11.1	Verlauf der weißen Blutkörperchen.....	54
4.11.2	Verlauf der roten Blutkörperchen .....	56
<b>4.12</b>	<b>Körperliche Auffälligkeiten und histopathologische Untersuchung.....</b>	<b>56</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>62</b>
<b>5.1</b>	<b>RIT von Mikrometastasen bzw. disseminierten Tumorzellen mittels <math>\alpha</math>- Emitter bzw. <math>\beta</math>-Emitter gekoppelten Immunkonjugaten .....</b>	<b>62</b>
<b>5.2</b>	<b>Bewertung der tumorspezifischen Bindung von <sup>177</sup>Lu-d9MAk im Vergleich zu <sup>177</sup>Lu-d8MAk in vitro .....</b>	<b>64</b>
<b>5.3</b>	<b>Bewertung der tumorspezifischen Bindung von <sup>177</sup>Lu-d9MAk im Vergleich zu <sup>177</sup>Lu-d8MAk in vivo .....</b>	<b>65</b>
5.3.1	Biodistribution von <sup>177</sup> Lu-d9MAk im Vergleich zu <sup>177</sup> Lu-d8MAk bei fortgeschrittener Peritonealkarzinose.....	65
5.3.2	Biodistribution von <sup>177</sup> Lu-d9MAk im Vergleich zu <sup>177</sup> Lu-d8MAk bei früher Peritonealkarzinose .....	69
5.3.3	Biodistribution und Dosimetrie von <sup>177</sup> Lu-d9MAk bei tumorfreien Mäusen .	71
5.3.4	Biodistribution i.p. applizierter <sup>177</sup> Lu-d9MAk Konjugate im Vergleich zu <sup>213</sup> Bi-d9MAk Konjugaten.....	74
<b>5.4</b>	<b>Bewertung der Therapiestudien .....</b>	<b>74</b>
<b>5.5</b>	<b>Bewertung der Toxizitätsstudien .....</b>	<b>81</b>
<b>5.6</b>	<b>Therapeutische Effizienz und Toxizität von <sup>177</sup>Lu-d9MAk im Vergleich zu <sup>213</sup>Bi-d9MAk.....</b>	<b>85</b>

<b>5.7</b>	<b>Schlussfolgerung.....</b>	<b>87</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>89</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>91</b>

## Abkürzungsverzeichnis

% ID/g	Prozent der injizierten Aktivität pro Gramm Gewebe
μCi	Mikrocurie
μm	Mikrometer
<sup>131</sup> I	Iod-131
<sup>177</sup> Lu	Lutetium-177
<sup>186</sup> Re	Rhenium-186
<sup>211</sup> At	Astat-211
<sup>213</sup> Bi	Wismut-213
<sup>225</sup> Ac	Actinium-225
<sup>90</sup> Y	Yttrium-90
Ak	Antikörper
CC49	Monoklonaler Antikörper gegen Antigen TAG-72
cG250	Monoklonaler Antikörper gegen Antigen G250
cpm	counts per minute
d	Tage
d8MAk	Monoklonaler Antikörper gegen d8-Mutation des E-Cadherin
d9-E-Cad	Mutation des Exon 9 für die Expression des E-Cadherin
d9MAk	Monoklonaler Antikörper gegen d9-Mutation des E-Cadherin
Da	Dalton (g/Mol)
DOTA	1,4,7,10-tetra-azacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetra-acetic-acid
DTPA	Diethylentriamin-penta-acetic-acid
FKS	Fetales Kälberserum
FWHM	Full Width at Half Maximum
h	Stunde
HCl	Salzsäure
Her2	Human epidermal growth factor receptor-2
hLL2	Monoklonaler Antikörper gegen Antigen CD22
HMFG1	Monoklonaler Antikörper gegen Antigen MUC1
HSC	Human Signetringcell Carcinoma
HuM195	Monoklonaler Antikörper gegen Antigen CD33
HvG	Host versus Graft
HWZ	Halbwertszeit
i.p.	intraperitoneal

i.v.	intravenös
ITLC	Instant Thin Layer Chromatography
kBq	Kilobecquerel
keV	Kiloelektronenvolt
LET	Linearer Energietransfer
M	Mol
MAk	Monoklonaler Antikörper
MBq	Megabecquerel
mCi	Millicurie
MeV	Megaelektronenvolt
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	Millimol
MN-14	Monoklonaler Antikörper gegen Karzinoembryonales Antigen
mSv	Millisiewert
MTA	Maximal tolerierbare Aktivität
MW	Mittelwert
p.i.	post injectionem
PBS	Phosphate Buffered Saline
RIK	Radioimmunkonjugat
RIT	Radioimmuntherapie
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
SD	Standardabweichung
UICC	Union International Contre Cancer
Upm	Umdrehungen pro Minute
VEGF	Vascular epithelial growth factor

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Dr. Reingard Senekowitsch-Schmidtke für die Überlassung des Themas sowie die Bereitstellung eines sehr gut ausgestatteten Arbeitsplatzes in einem sehr freundlichen und konstruktiven Team. Ich danke ihr für die stets liebenswürdige und motivierende Unterstützung bei allen Bereichen meiner Arbeit.

In gleicher Weise danke ich Herrn Dr. Christof Seidl für die sehr gute Betreuung, die stets geduldigen Hilfestellungen sowie die vielen Stunden intensiver Diskussionen, welche die Arbeit inhaltlich entscheidend prägten.

Frau Dr. Roswitha Beck danke ich für die sehr gute Einführung und Betreuung der tierexperimentellen Versuche.

Allen Mitarbeitern im Labor danke ich für die tatkräftige Mithilfe bei der Durchführung von Versuchen und für die freundschaftliche Atmosphäre. Insbesondere möchte ich Frau Ulrike Schwaiger für die gute Pflege der Tiere danken.

Frau Dr. Leticia Quintanilla-Fent und ihrem Team vom Institut für Pathologie der GSF in Neuherberg möchte ich recht herzlich für die histopathologische Aufbereitung und Beurteilung von Organproben danken.

Herrn Prof. Dr. Karl H. Summer vom Institut für Toxikologie der GSF in Neuherberg danke ich für die Unterstützung bei Fragestellungen zur Nierentoxizität.

Herrn Dr. Thorsten Poethko danke recht herzlich für die freundliche und konstruktive Mithilfe bei der Lösung chemischer Probleme.

Des Weiteren danke ich Herrn Dr. Ingo Wolf für die Dosimetrieberechnungen, Frau Grahneis und ihrem Team für die Szintigraphieaufnahmen, dem Team der Klinischen Chemie für die Messung der Blutparameter und dem Team der Experimentellen Onkologie und Therapieforschung für die Pflege der Tiere.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie und Ulrich.

## 1 Einleitung

Beim Magenkarzinom beträgt die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen in Deutschland ca. 21.000, davon sind ca. 11.000 Männer und ca. 10.000 Frauen betroffen. Bei Frauen ist das Magenkarzinom die fünfhäufigste Tumorerkrankung, bei Männern die sechsthäufigste (Sendler et al., 2006). Trotz weltweit sinkender Inzidenzen seit den 30er Jahren des 20sten Jahrhunderts ist das Magenkarzinom nach wie vor von großer klinischer Bedeutung, da es gemäß WHO die zweithäufigste tumorbedingte Todesursache nach dem Lungenkarzinom ist (Stewart und Kleihues, 2003).

Das Magenfrühkarzinom, welches nur auf die Mukosa bzw. Submukosa beschränkt ist, wird vom lokal fortgeschrittenen Magenkarzinom unterschieden, welches die Submukosa überschreitet. Letzteres wird makroskopisch nach Laurén in 2 Karzinomtypen unterteilt, die unterschiedliches Verhalten hinsichtlich des lokalen Tumorwachstums und der Metastasierung zeigen. Karzinome vom intestinalen Typ sind meist scharf abgrenzbar, wachsen temporär lokal begrenzt und weisen eine geringe Disseminationstendenz vorzugsweise in die Leber auf. Im Gegensatz dazu sind Karzinome vom diffusen Typ unscharf begrenzt und zeigen eine ausgedehnte Infiltration der Magenwand mit weit verstreuten Tumorzellen. Infolge der frühzeitigen Infiltration der lymphgefäßreichen Subserosa bzw. der Serosa kommt es beim diffusen Typ häufig zu einer Dissemination in die Peritonealhöhle, welche zur Entwicklung einer Peritonealkarzinose führt.

Patienten mit primärem Magenkarzinom erkranken in 10% bis 20% der Fälle an einer Peritonealkarzinose (Sugarbaker und Yonemura, 2000), Patienten mit diffusem Magenkarzinom in ca. 80% der Fälle (Siewert und Sendler, 1999). Infolge dieser Erkrankung werden Nachbarorgane, insbesondere der Darm, aufgrund von Infiltration oder Verdrängung durch die Tumormassen funktionell häufig beeinträchtigt. Dabei kann eine Peritonealkarzinose durch die Symptome eines Subileus bzw. Ileus und/oder durch das Auftreten von Aszites klinisch auffällig werden. Die Prognose für Patienten mit diagnostizierter Peritonealkarzinose ist extrem schlecht. Das mediane Überleben beträgt nur ca. 3 bis 6 Monate und verschlechtert sich zusätzlich bei Auftreten von Aszites und bei Tumorvergrößerung von über 2 cm (Sadeghi et al., 2000).

Bereits der Nachweis von freien Tumorzellen in der Peritoneallavage einer im Rahmen des Staging durchgeführten Laparoskopie ist ein Prognosefaktor, der mit einem erhöhten Risiko verbunden ist ein lokoregionales Rezidiv und/oder eine

Peritonealkarzinose zu entwickeln, vor allem bei Patienten mit Magenkarzinomen im Stadium IB (T2 N0 M0 oder T1 N1 M0) nach UICC (Union International Contre Cancer) (Rosenberg et al., 2006).

Die chirurgische Therapie verbunden mit oder ohne neoadjuvanter, systemischer Chemotherapie stellt derzeit die einzige Therapieoption für das Magenkarzinoms dar (Sendler und Siewert, 2003). Für Karzinome mit Fernmetastasen oder mit einer Peritonealkarzinose für die eine mikroskopische bzw. makroskopische Tumorfreiheit durch eine Resektion des Primärtumors nicht zu erzielen ist, sind die Aussichten für eine vollständige Heilung drastisch reduziert.

Bei diagnostizierter Peritonealkarzinose ist das Repertoire an Therapieoptionen stark limitiert und auf palliative Maßnahmen zur Verbesserung der Lebensqualität beschränkt. Die chirurgische Therapie dient lediglich der Behandlung von lokalen tumorbedingten Komplikationen, wie z. B. Stenosen oder Blutungen (Sendler und Siewert, 2003). Der systemische Einsatz von Zytostatika erzielt derzeit die effektivste therapeutische Wirkung. Damit kann eine Überlebensverlängerung von einigen Monaten erreicht werden, allerdings verbunden mit einer Reihe von Nebenwirkungen, da bekanntlich auch schnell proliferierendes gesundes Gewebe der zytotoxischen Wirkung unterliegt. Die intraperitoneale (i.p.) Applikation von Zytostatika zur Steigerung der therapeutischen Effizienz und Reduktion der Nebenwirkungen brachte nicht den erhofften Erfolg, da die Substanzen aufgrund ihres geringen Molekulargewichts schnell resorbiert werden (Borchardt et al., 2000). Ein nebenwirkungsarmer, neuer Therapieansatz der Peritonealkarzinose ist die i.p. Antikörpertherapie (Sendler et al., 2006). Hierbei werden Tumorzellen aus dem Aszites von Patienten zunächst im Hinblick auf die Expression bestimmter Antigene, z. B. Her2 oder VEGF (Lordick et al., 2005) analysiert. Bei positivem Status werden Antikörper gegen diese Antigene i.p. appliziert. Nach Sendler et al. (2006) ist die i.p. Applikation der Antikörper gut verträglich und bewirkt eine mit der Reduktion von Tumorzellen verbundene Abnahme von Aszites sowie eine Verbesserung der Lebensqualität.

Bei der Radioimmuntherapie (RIT) werden Radionuklide gekoppelt an Antikörper gegen Tumorzellen eingesetzt. Die Kopplung der Radionuklide an die Antikörper erfolgt mittels geeigneter Chelatoren. Die resultierenden Radioimmunkonjugate (RIK) binden antikörpervermittelt spezifisch an Oberflächenmoleküle, die von Tumorzellen

überexprimiert oder exklusiv exprimiert werden. Infolgedessen werden die Tumorzellen durch die zytotoxische Wirkung der Radionuklide gezielt abgetötet.

Insbesondere die i.p. Applikation von RIK könnte eine gut verträgliche und sehr effektive Therapieoption sowohl für die manifeste Peritonealkarzinose als auch für die frühe i.p. Tumorzell dissemination gastralen Ursprungs sein. Darauf weisen die vielversprechenden Ergebnisse einer präklinischen Therapiestudie von Huber et al. (2003) und Beck et al. (2006) im Mausmodell hin. Dabei wurden weiblichen, ca. 6 Wochen alten swiss nu/nu Nacktmäusen 1 d bzw. 8 d nach i.p. Inokulation von Tumorzellen des diffusen Magenkarzinoms (HSC45-M2) unterschiedliche Aktivitäten eines tumorspezifischen  $\alpha$ -Emitter-Immunkonjugats ( $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk) i.p. appliziert. Gegenüber untherapierten Kontrolltieren, die ein medianes Überleben von nur 19 d aufwiesen, resultierte die i.p. Therapie mit 1,85 MBq, 7,4 MBq bzw. 22,2 MBq  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk sowohl 1 d nach Tumorzellinokulation als auch 8 d nach Tumorzellinokulation in einem signifikant längeren medianen Überleben. Die beste therapeutische Effizienz erzielte jedoch die i.p. Therapie mit 1,85 MBq  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk 1 d nach Tumorzellinokulation, wobei 8 von 9 therapierten Tieren das Ende der Beobachtungszeit von 250 d tumorfrei überlebten (Beck et al., 2006).

Die hohe therapeutische Effizienz und gute Verträglichkeit der  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk Konjugate beruhte zum einen auf der Verwendung des tumorspezifischen Antikörpers d9MAk und zum anderen der Wahl des  $\alpha$ -Emitters  $^{213}\text{Bi}$  (Bismuth-213), der die optimalen physikalischen Eigenschaften für die RIT disseminierter Tumorzellen aufweist. Bei ca. 10% der Patienten mit Magenkarzinom vom diffusen Typ exprimieren Tumorzellen eine mutierte Form des Oberflächenmoleküls E-Cadherin mit Deletion von Exon 9 (d9-E-Cadherin) (Becker et al., 1999). Der monoklonale Antikörper d9MAk bindet hierbei spezifisch an mutiertes d9-E-Cadherin, nicht aber an Wildtyp-E-Cadherin normaler Zellen (Becker et al., 1999).

$\alpha$ -Emitter sind durch einen hohen linearen Energietransfer (LET) von ca. 100 keV/ $\mu\text{m}$  gekennzeichnet, d.h. die beim Zerfall emittierten  $\alpha$ -Teilchen lösen innerhalb kürzester Distanzen sehr viele Ionisationsprozesse aus, wobei eine hohe lokalisierte Energie im betroffenen Gewebe deponiert wird. Die daraus resultierende hohe relative biologische Wirksamkeit (RBW) innerhalb einer Reichweite von nur 50  $\mu\text{m}$  bis 100  $\mu\text{m}$  favorisiert  $\alpha$ -Emitter für den therapeutischen Einsatz bei der RIT von kleinen Tumoren, Mikrometastasen bzw. disseminierten Tumorzellen (Nikula et al., 1999, Senekowitsch-

Schmidtke et al., 2001, Milenic et al., 2004).  $^{213}\text{Bi}$  mit einer Halbwertszeit (HWZ) von ca. 46 min kann unter den allgemein schwer verfügbaren  $\alpha$ -Emittlern vergleichsweise einfach in einem  $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$  Generator aus Actinium-225 ( $^{225}\text{Ac}$ ) gewonnen werden, jedoch nicht in der für klinische Studien benötigten ausreichenden Menge. Daher findet  $^{213}\text{Bi}$  derzeit vor allem in experimentellen Studien Anwendung. Die relativ kurze HWZ von  $^{213}\text{Bi}$  ist dabei für die Therapie aus logistischer Sicht, d.h. die Zeit von der Herstellung des  $^{213}\text{Bi}$ -Immunkonjugats bis zur Applikation, als nachteilig zu bewerten, erweist sich aber hinsichtlich des reduzierten Risikos einer Strahlenschädigung gegenüber gesunden Geweben insbesondere bei lokoregionaler Applikation als sehr vorteilhaft.

Die Toxizität von  $^{213}\text{Bi}$ -Immunkonjugaten gegenüber dem strahlensensiblen Knochenmark untersuchte Huber (2003) nach i.p. Applikation unterschiedlicher  $^{213}\text{Bi}$ -Aktivitäten und zeigte, dass auch eine i.p. Injektion von 22,2 MBq des  $^{213}\text{Bi}$ -Immunkonjugat nur zu einer temporären Suppression der Knochenmarksfunktion führte. Strahleninduzierte Langzeitschäden bezüglich der Entwicklung maligner Neoplasien wies keines der therapierten Tiere auf, welche die Beobachtungszeit von 250 d überlebten. Lediglich bei 3 von 5 verstorbenen Mäusen, die mit 22,2 MBq des  $^{213}\text{Bi}$ -Immunkonjugats behandelt wurden, waren pathologische Veränderungen des Nierengewebes in der Histologie feststellbar, die auf eine aktivitätsbedingte Schädigung durch in proximalen Tubuluszellen gespeichertes  $^{213}\text{Bi}$  zurückgeführt wurden. Ursache dafür war vermutlich die Bindung von freiem  $^{213}\text{Bi}$  an niedermolekulare Proteine, welche die glomeruläre Filtrationsbarriere passierten und von proximalen Tubuluszellen aus dem Ultrafiltrat reabsorbiert wurden (Huber, 2003). Dabei dürfte der Multiligand-Scavenger-Rezeptor Megalin der proximalen Tubuluszellen für die intrazelluläre Aufnahme der  $^{213}\text{Bi}$  gekoppelten Peptide verantwortlich gewesen sein (de Jong et al., 2005). Das Risiko derartig ausgelöster Nierenschäden kann jedoch reduziert werden durch die Applikation kationischer Aminosäuren, wie z. B. D-Lysin (Behr et al., 1997), oder durch die Applikation geringer Konzentration des Plasmaexpanders Gelofusine (GELO) (Braun) wie jüngste Studien von Vegt et al. (2006) und van Eerd et al. (2006) zeigten.

$\beta$ -Emitter werden aufgrund ihrer besseren Verfügbarkeit sehr viel häufiger in der präklinischen sowie klinischen RIT von Tumoren verwendet als  $\alpha$ -Emitter (Volkert et al., 1991). Im Gegensatz zu  $\alpha$ -Emittlern weisen  $\beta$ -Emitter einen deutlich geringeren LET von ca. 0,2 keV/ $\mu\text{m}$  sowie maximale Reichweiten im Gewebe im Millimeterbereich auf,

weshalb  $\beta$ -Emitter für die RIT von soliden Tumoren geeignet erscheinen. Anwendung in der experimentellen bzw. klinischen RIT finden Jod-131, z. B. als  $^{131}\text{I}$ -MN-14 (Koppe et al., 2003), Yttrium-90, z. B. als  $^{90}\text{Y}$ -HMFG1 (Janssen et al., 2003) oder  $^{90}\text{Y}$ -Ibritumomab-Tiuxetan (Gordon et al., 2004), Rhenium-186, z. B. als  $^{186}\text{Re}$ -hLL2 (Postema et al., 2003) und Lutetium-177, z. B. als  $^{177}\text{Lu}$ -cG250 (Brouwers et al., 2004). Diese Radionuklide unterscheiden sich hinsichtlich der HWZ, der Energie der  $\beta$ -Partikel, der Reichweite der  $\beta$ -Partikel im Gewebe sowie der emittierten  $\gamma$ -Strahlung (Tab. 1). Während  $^{90}\text{Y}$  aufgrund seiner vergleichsweise hohen Energie und Penetrationstiefe der Strahlung für die RIT größerer Tumorknoten von ca. 1 cm einzusetzen ist (Howell et al., 1989, O'Donoghue et al., 1995), eignet sich  $^{177}\text{Lu}$  besonders für die RIT kleinerer Tumorknötchen von ca. 1 mm, disseminierter Tumorzellen sowie von Mikrometastasen (Volkert et al., 1991, Koppe et al., 2004, Brouwers et al., 2004).

Radionuklide	Halbwertszeit (d)	Maximale Energie der $\beta$ -Strahlung (MeV)	Maximale Reichweite im Gewebe (mm)	$\gamma$ -Strahlung (keV)
$^{131}\text{I}$	8,0	0,606	3	364, 637
$^{90}\text{Y}$	2,7	2,28	12	keine
$^{186}\text{Re}$	3,8	1,07	5,4	137
$^{177}\text{Lu}$	6,7	0,497	2,5	208, 113

**Tabelle 1: Physikalische Eigenschaften der am häufigsten verwendeten  $\beta$ -Emitter für die RIT (Koppe et al., 2004)**

Als positive Eigenschaften von  $^{177}\text{Lu}$  erweist sich dabei die aufgrund der geringen Energie der  $\beta$ -Teilchen (0,497 MeV) relativ kurze mittlere Reichweite von ca. 1,6 mm (maximale Reichweite ca. 2,5 mm) sowie die begleitende  $\gamma$ -Strahlung, die zur szintigraphischen Darstellung der  $^{177}\text{Lu}$ -Verteilung genutzt werden kann. Die relativ lange HWZ von  $^{177}\text{Lu}$  (6,71 d) ist hinsichtlich der spezifischen zytotoxischen Wirkung am Tumor ebenfalls positiv, aber im Hinblick auf die allgemeine Toxizität negativ zu

bewerten, da insbesondere bei Applikation von RIK die biologische HWZ der  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugate vergleichsweise lang ist. Die Arbeit von Koppe et al. (2004) am Mausmodell zeigte, dass die lokoregionale RIT mit  $^{177}\text{Lu}$ -MN-14 Konjugaten gegen Karzinoembryonales Antigen, 10 d nach i.p. Inokulation von  $1 \times 10^6$  Tumorzellen kolorektalen Ursprungs (LS174T), im Vergleich zur i.p. Therapie mit  $^{131}\text{I}$ -MN-14,  $^{90}\text{Y}$ -MN-14 bzw.  $^{186}\text{Re}$ -MN-14 deutlich effektiver war: 50% der mit  $^{177}\text{Lu}$ -MAk behandelten Tiere überlebten das Ende der Beobachtungszeit nach 142 d tumorfrei.

## 2 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit am Mausmodell war die Bewertung der lokoregionalen RIT i.p. disseminierter Tumorzellen des diffusen Magenkarzinoms mit tumorspezifischen  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugaten im Hinblick auf die therapeutische Effizienz und Toxizität. Darüber hinaus wurde die therapeutische Effizienz und Toxizität der  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugate mit  $\alpha$ -Emitter  $^{213}\text{Bi}$  gekoppelten d9MAk Konjugaten, die bei Huber (2003) im gleichen Tumormodell i.p. appliziert wurden, verglichen.

In vitro wurde dazu die Bindung der tumorspezifischen  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate gegenüber nicht tumorspezifischen  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugaten an HSC45-M2 Zellen bestimmt sowie die Stabilität der  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugate bei Inkubation in Humanserum vs. in PBS geprüft. Zudem wurde die Klonogenität der HSC45-M2 Zellen nach Inkubation mit  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk bzw.  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk in Abhängigkeit der  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivität untersucht.

In vivo wurde die Biodistribution i.p. bzw. i.v. applizierter  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate bei Nacktmäusen mit und ohne Peritonealkarzinose im Vergleich zu  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugaten untersucht, szintigraphisch dargestellt und die absorbierten Organdosen bestimmt. Hierbei wurden Mäusen mit Peritonealkarzinose  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugate 1 d bzw. 14 d nach i.p. Inokulation von  $1 \times 10^7$  HSC45-M2 Zellen i.p. injiziert. Die therapeutische Effizienz der tumorspezifischen  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate wurde bei Nacktmäusen 1 d bzw. 8 d nach i.p. Inokulation von  $1 \times 10^7$  HSC45-M2 Zellen in Abhängigkeit von der i.p. applizierten  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivität ebenfalls im Vergleich zu  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugaten ermittelt. Mäuse, die mit  $1 \times 10^7$  HSC45-M2 Zellen i.p. inokuliert wurden, aber keine Therapie erhielten, dienten als Kontrolle für das Tumorwachstum. Die Beurteilung der Toxizität i.p. applizierter  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugate erfolgte anhand des Blutbildes, der regelmäßigen klinischen Untersuchung der therapierten Tiere sowie der histopathologischen Untersuchung entnommener Organe nach dem Tod der therapierten Tiere.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Chemikalien

Ammoniumacetat	Sigma, Taufkirchen
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
DMEM-Lösung (Dulbecco's Modified Eagle Medium) mit 3,7 g/l NaHCO <sub>3</sub> , 4,5 g/l D-Glukose, 1,028 g/l N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamin, Na-Pyruvat	Biochrom, Berlin
EDTA 1% in PBS ohne Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	c. c. pro Neustadt
Entellan Eindeckmedium	Merck, Darmstadt
Ethanol 70%	Merck, Darmstadt
FKS (Fetales Kälberserum)	Life Technologies, Karlsruhe
Formalin 4% (Stammlösung 37%)	Merck, Darmstadt
Mikroskopie Aquatex	Merck, Darmstadt
Mikroskopie Azur-II-Eosin nach Giemsa	Merck, Darmstadt
Mikroskopie Eosin-Methylenblau nach May-Grünwald	Merck, Darmstadt
NaCl 0,9%	Delta-Pharma, Pfullingen
PBS (Phosphat-Buffered-Saline) mit NaCl (8 g/l), KCl (0,2 g/l), KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,2 g/l), Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ×12 H <sub>2</sub> O (2,85 g/l), pH 7,2	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin (1×10 <sup>4</sup> U/1×10 <sup>4</sup> µg/l)	Biochrom, Berlin
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt

#### 3.2 Medikamente

Augensalbe, Vidisic <sup>®</sup>	Dr. Mann Pharma Berlin
Diethyether (Narkose)	Chinosol, Seelze
Heparin	Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen
Ketavet <sup>®</sup> (100 mg/ml Ketaminhydrochlorid)	Pharma & Upjohn, Erlangen
Rompun <sup>®</sup> (2% Xylazinhydrochlorid)	Bayer Vital, Leverkusen

### 3.3 Verbrauchsmaterialien

BD Micro-Fine Insulinspritze (1 ml, U-40)	Becton Dickinson, Heidelberg
Combitip Pipetten (5 ml/10 ml)	Eppendorf, Hamburg
Deckgläschen (24×60 mm)	Menzel-Gläser, Braunschweig
ITLC SC (Instant thin layer chromatography Paper)	Gelman Science, Michigan, USA
Kanülen (25 G/27 G)	Becton Dickinson, Heidelberg
Objektträger (76×26 mm)	Knittel, Braunschweig
Omnitip Pipetten (10 µl/ 200 µl/ 300 µl/ 1000 µl)	Abimed, Jena
PD-10 Desalting columns	Amershambiotech, Freiburg
pH-Indikatorstäbchen (pH 4.0-7.0)	Merck, Darmstadt
Spritzen (1 ml/10 ml)	Codan, Lensahn
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> / 75 cm <sup>2</sup> / 182 cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen mit Spitzboden (15 ml)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen mit Spitzboden (50 ml)	Corning Inc., NY, USA

### 3.4 Lösungen

Ketavet-Ropum Narkotikum:

82% physiologische NaCl-Lösung 0,9%

10% Ketavet<sup>®</sup> (100 mg/ml Ketaminhydrochlorid)

8% Rompun<sup>®</sup> (2% Xylazinhydrochlorid)

### 3.5 Geräte

Analysewaage Satorius, Typ LA 230S-OCE (Einteilung 0,0001 g, Messfehler 0,0002 g)	Satorius, Göttingen
Auflichtmikroskop Axiovert 10	Zeiss, Oberkochen
Biofuge 13	Heraeus, Osterode
Blutanalysegerät SE 9000	Sysmex, Norderstedt
Brutschrank Heraeus 6000	Heraeus, Hanau

Färbegerät für Blutausstriche	Bavimed Laborgeräte, Birkenau
Gamma Counter Typ 1480 WIZARD <sup>®</sup> TM 3	Wallac, Oy, Turku, Finnland
Gamma Kamera Vertex	ADAC/ Philips, Niederlande
LaminAir <sup>®</sup> HB 2472 Flow-Arbeitsbank	Heraeus, Osterode
Megafuge 1.0 R	Heraeus, Osterode
Trockenschrank	Heraeus, Osterode
Waage, Laboratory LC 1200S	Satorius, Göttingen
Zellzählgerät CASY <sup>®</sup>	Schärfe, Reutlingen

## 3.6 Radioimmunkonjugate

### 3.6.1 Antikörper

Die monoklonalen Antikörper, anti-delta-9-E-Cadherin (d9MAk) bzw. anti-delta-8-E-Cadherin (d8MAk), wurden am Institut für Pathologie an der Technischen Universität München von K.-F. Becker und dem Institut für Pathologie des GSF-Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg von E. Kremmer entwickelt und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Im Gen des Oberflächenproteins E-Cadherin entstand in Folge einer splice-site-Mutation eine neue Fusionsregion zwischen Exon 8 und Exon 10 durch Deletion des Exon 9 (d9-E-Cad). Anhand dieser veränderten DNA Sequenz wurde ein Peptid aus 13 Aminosäuren synthetisiert, mit KLH (keyhole limpet hemacyanin) gekoppelt und Lou/C Ratten subkutan (s.c.) sowie intraperitoneal (i.p.) mit einem Adjuvanz appliziert. Eine letzte Boosterung wurde nach 4 Wochen ohne Adjuvanz durchgeführt. 3 Tage danach erfolgte die Fusion aktivierter Plasmazellen aus der weißen Pulpa der Milz mit Myelomzellen. Mittels Enzyme Linked Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) konnte anhand spezifischer Maus-Anti-Ratten-Antikörper aus einer Vielzahl entstandener Hybridomzellen gezielt der Klon identifiziert werden, der Antikörper gegen das mutierte d9-E-Cad produziert. Die Antikörper des Klons 6H8 binden spezifisch nur an das Antigen d9-E-Cad und gehören der Immunglobulinklasse IgG2a (d9MAk) an (Becker et al., 1999).

Eine andere splice-site Mutation im Gen des E-Cadherin führte zu einer Veränderung der DNA Sequenz zwischen Exon 7 und Exon 9 durch Deletion von Exon 8 (d8-E-Cad).

Gegen diese Mutation wurde nach oben beschriebener Methode der monoklonale Antikörper d8MAk hergestellt. Die Antikörper des als 7H1 bezeichneten Klons, die ebenfalls zur Immunglobulinklasse IgG2a zählen, sind spezifisch gegen das Peptid der neuen Fusionsregion zwischen Exon 7 und Exon 9 gerichtet und binden ausschließlich an d8-E-Cad (Becker et al., 1999). Im vorliegenden Fall wurde d8MAk als nicht tumorspezifischer Antikörper gegenüber d9-E-Cad im Vergleich zu d9MAk verwendet.

### **3.6.2 Radionuklid**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Lutetium-177 ( $^{177}\text{Lu}$ ) als Radionuklid für die Kopplung mit d9MAk bzw. d8MAk verwendet. Lutetium (Ordnungsnummer 71) wird als Nebengruppenelement den Lanthanoiden, auch Seltenen Erden genannt, zugeordnet. Es wurde 1907 von G. Urbain an der Universität von New Hampshire entdeckt.  $^{177}\text{Lu}$  ist ein künstliches Isotop, das nach Neutronenbeschuss aus  $^{176}\text{Lu}$  hergestellt wird.

$^{177}\text{Lu}$  wurde in einer 0,05 M HCl Lösung von Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Bosten, MA, USA bezogen. Es zerfällt mit einer Halbwertszeit (HWZ) von 6,71 d in das stabile Element Hafnium-177 ( $^{177}\text{Hf}$ ). Dabei wird neben Beta ( $\beta$ ) auch Gamma ( $\gamma$ )-Strahlung emittiert. Das Energiemaximum der  $\beta$ -Komponente liegt bei 0,497 MeV (79%), das der  $\gamma$ -Komponente bei 0,113 MeV (6,4%) und 0,208 MeV (11%). Die maximale Reichweite der  $\beta$ -Teilchen beträgt 2,5 mm, die mittlere Reichweite ca. 1,6 mm. Aufgrund der  $\gamma$ -Komponente ist  $^{177}\text{Lu}$  in vivo gut detektierbar.

#### **3.6.2.1 Chelatierung der Antikörper**

Freie Ionen eines Übergangsmetalls, wie z. B. Lu, gehen bevorzugt koordinative Bindungen mit Schwefel, Stickstoff und Sauerstoff ein und binden in vivo dementsprechend leicht an Proteine (Henning et al., 2000), wodurch es zur Anreicherung in unterschiedlichen Organgeweben kommen kann (Milenic et al., 2002). Für freie  $^{177}\text{Lu}$ -Ionen konnte z. B. eine starke Anreicherung im Knochengewebe festgestellt werden (Müller et al., 1978). Damit in der vorliegenden Arbeit  $^{177}\text{Lu}$  nach i.p. bzw. i.v. Applikation gezielt an seinen Wirkort den HSC45-M2 Zellen gelangen konnte, wurde es mittels eines Chelators an d9MAk bzw. d8MAk gekoppelt. Durch die Bildung stabiler Komplexverbindungen kann die Abspaltung freier  $^{177}\text{Lu}$ -Ionen in vivo verhindert werden.

Nach einem beschriebenen Verfahren von Nikula et al. (1999) wurden die Antikörper d9MAk bzw. d8MAk mit dem bifunktionalen Chelator SCN-CHX-A-DTPA (2-(4-

isothiocyanatobenzyl)-Cyclohexyl-Diethylentriaminpentaessigsäure) am Institut für Transurane der Europäischen Kommission in Karlsruhe konjugiert. SCN-CHX-A-DTPA bindet kovalent an Lysylreste des Antikörpers, wobei ca. 3-5 Chelate pro Antikörpermolekül binden.

### 3.6.2.2 <sup>177</sup>Lu-Markierung der Antikörper

Die Markierung der chelatierten Antikörper wurde gemäß Milenic et al. (2002) mit leichter Modifikation durchgeführt. In Eppendorfgläsern wurden 7,4 MBq –  $4,4 \times 10^2$  MBq (200  $\mu$ Ci – 1200  $\mu$ Ci) <sup>177</sup>Lu (in 2  $\mu$ l – 31  $\mu$ l) mit 100  $\mu$ l 0,2 M HCl sowie 50  $\mu$ l 3 M NH<sub>4</sub>C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub> bei pH 5,5 gepuffert und nach Zugabe von 17  $\mu$ l – 34  $\mu$ l d9MAk bzw. 7  $\mu$ l – 38  $\mu$ l d8MAk Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die Abtrennung von gebundenen bzw. freien <sup>177</sup>Lu erfolgte mittels Gelfiltration (PD-10 Säule, Amersham). Dazu wurde die Säule zunächst mit 20 ml PBS gespült. Der Markierungsansatz (172  $\mu$ l – 219  $\mu$ l) wurde mit PBS ad 500  $\mu$ l aufgefüllt und auf die Säule gegeben. Nach Einzug der Probe wurden 2 ml PBS dazugegeben. Mit einem gesamten Volumen von 2,5 ml entspricht die Flüssigkeitsmenge dem Fassungsvermögen einer PD-10 Säule. Der <sup>177</sup>Lu markierte Antikörper wurde anschließend mit 2 ml PBS an der Säule eluiert. Freies <sup>177</sup>Lu verblieb in der Säule.

Die Bestimmung der Anteile von gebundenen bzw. freien <sup>177</sup>Lu erfolgte mittels ITLC (Instant Thin-Layer Chromatography) vor und nach der Abtrennung des freien <sup>177</sup>Lu. Dazu wurden nach vorheriger Verdünnung aus zwei verschiedenen Ansätzen 2  $\mu$ l auf ITLC Streifen (ca. 1×8 cm) gegeben und mittels Tri-Natriumcitrat-Dihydrat aufgetrennt. Die Verdünnung betrug für den Ansatz vor der Gelfiltration 1:500 bzw. für den Ansatz nach der Gelfiltration 1:5000. Die Anteile des gebundenen <sup>177</sup>Lu (stationär) und ungebundenen <sup>177</sup>Lu (mobil) wurden nach Trennung des Streifens in der Mitte mit Hilfe des  $\gamma$ -Counters bestimmt.

Um die Konzentrationen der eingesetzten Antikörper, Antigene und des <sup>177</sup>Lu miteinander vergleichen zu können, wurde die Anzahl der Moleküle d9MAk bzw. d8MAk, der <sup>177</sup>Lu-Atome und der Antigene d9-E-Cad für jeden Markierungsansatz separat bestimmt. Die Berechnung der Anzahl der Antikörpermoleküle erfolgte nach Gleichung (1).

**Gleichung (1):**

$$N_{AK} = \frac{X \times (N_A)}{M_m}$$

$N_{AK}$ : Anzahl der Antikörpermoleküle

$X$  [g]: Menge des eingesetzten Antikörpers

$N_A$  [mol<sup>-1</sup>]:  $6 \times 10^{23}$  (Avogadro-Konstante)

$M_m$  [g/mol]: 150.000 (Molekulargewicht eines IgG Ak)

Die Berechnung der Anzahl der <sup>177</sup>Lu-Atome erfolgte nach Gleichung (2).

**Gleichung (2):**

$$N_{Lu} = \frac{A_{Lu} \times t_{1/2}}{\ln 2}$$

$N_{Lu}$ : Anzahl der <sup>177</sup>Lu-Atome

$A_{Lu}$  [Bq]: <sup>177</sup>Lu-Aktivität

$t_{1/2}$  [s]: 6,71 d  $\times$  86400 s (HWZ von <sup>177</sup>Lu)

Die Berechnung der Anzahl der Antigene d9-E-Cad basierte auf einem Ergebnis der Untersuchung der HSC45-M2 Zellen mittels FACS-Analyse in der Arbeit von Seidenschwang (2006), wonach pro Tumorzelle ca.  $3 \times 10^5$  Antigene exprimiert werden.

**3.7 Zellen und Zellkultivierung****3.7.1 Humane Siegelringkarzinomzellen HSC45-M2**

Die Tumorzellen der Zelllinie HSC45-M2 wurden 1993 aus dem Aszites einer 28-jährigen japanischen Patientin mit fortgeschrittenem diffusen Magenkarzinom von histologischen Typ Siegelringkarzinom isoliert und kultiviert (Yanagihara et al., 1993). Dieser Tumortyp ist charakterisiert durch den Verlust des Zell-Zellkontaktes im frühen Stadium der Karzinogenese, der zu einer Auflösung der physiologischen Gewebestruktur führt (Muta et al., 1996). Die Ursache dafür ist die mutationsbedingte Veränderung des Oberflächenprotein E-Cadherin (Fukudome et al., 2000).

**3.7.1.1 Kultivierung**

Alle Arbeitsschritte mit Zellen wurden unter keimfreien Bedingungen an einer Laminar-Flow Arbeitsbank (Heraeus, Osterode) durchgeführt.

Kultiviert wurden die HSC45-M2 Zellen in Zellkulturflaschen mit einer Grundfläche von 175 cm<sup>2</sup> in 30 ml DMEM Medium bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit.

Das Medium war mit 10% Fetalen Kälberserum (FKS), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin angereichert. Der im Medium enthaltene pH-abhängige Indikator Phenolrot signalisiert durch den Farbumschlag von rot zu gelb eine Anreicherung von wachstumshemmenden sauren Stoffwechselprodukten.

Zur Gewinnung der Zellen wurde das Medium abgesaugt und die verbliebenen Rückstände sowie Zelldentritus mit 10 ml PBS von dem Zellrasen abgespült und entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit 7 ml einer 1 mM EDTA Lösung bei 37°C für 10 min inkubiert und durch Beklopfen der Kulturflasche abgelöst. In sterilen Röhrchen wurde die Zellsuspension abzentrifugiert (1200 Upm, 3 min). Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet mit Kulturmedium zur Umsetzung in neue Flaschen resuspendiert. Für die Inokulation der Zellen in Mäusen wurde FKS-freies Medium verwendet.

Die Bestimmung der Zellkonzentration erfolgte mit Hilfe des Zellzählgerätes CASY 1 (Schärfe, Reutlingen). Dazu wurden 2 µl, 50 µl oder 100 µl der Zellsuspension mit 10 ml isotoner Salzlösung CASYton verdünnt. Die Zellkonzentration in der Ausgangsmenge konnte durch Wahl der entsprechenden Verdünnung in CASY 1 (1:100, 1:200 und 1:5000) direkt bestimmt werden.

### **3.8 Versuchstiere und Versuchstierhaltung**

Weibliche swiss nu/nu sowie Balb/c AnN Crl BR Mäuse (Alter: 5 bis 11 Wochen) wurden aus pathogenfreier Zucht von Charles River Laboratories (Frankreich) bzw. Charles River Wiga GmbH (Deutschland) bezogen. Mindestens 14 d vor Versuchsbeginn erfolgte die Einstellung der Mäuse. Je 5 Tiere pro Käfig wurden auf Streu bei artgerecht eingestellten Lichtphasen, 26°C Raumtemperatur und 50% bis 60% Luftfeuchtigkeit gehalten und mit Mäusestandardfutter Altromin 1314 und Leitungswasser ad libitum versorgt. Der Streuwechsel und die Reinigung der Käfige erfolgten wöchentlich. Für eine versuchstierfreundliche Haltung wurden pro Käfig ein Zellstofftuch sowie eine autoklavierte Papierrolle zum Spielen gegeben.

Nacktmäuse besitzen aufgrund ihrer Thymusaplasie keine zelluläre Immunabwehr. Die humorale Abwehr mit dem Entstehungsort im Knochenmark ist primär nicht beeinträchtigt, jedoch sekundär aufgrund der Abhängigkeit von den T-Zellen in ihrer Funktion reduziert. Da Host-versus-Graft (HvG) Abstoßungsreaktionen vor allem auf der zellulären Komponente des Immunsystems basieren, eignen sich Nacktmäusen besonders für Xenograft Transplantationen. Balb/c Mäuse besitzen eine vollständige

zelluläre und humorale Immunkompetenz und wurden zur Untersuchung der Biodistribution von  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugaten in tumorfreien Mäusen verwendet.

Nach den geltenden Bestimmungen für Tierversuche wurden die in vivo Experimente mit der Genehmigung von Oberbayern unter dem Aktenzeichen 209.1/211-2531-81/02 2002 durchgeführt.

### **3.8.1 Anästhesie und Tötung**

Für Langzeitnarkosen der Tiere von ca. 20 min Dauer, erforderlich für Szintigraphieaufnahmen, wurde den Tieren 250  $\mu\text{l}$  einer Rompun-Ketamin-Lösung i.p. injiziert. Um die Austrocknung der Cornea durch den fehlenden Lidschluß während der Narkose zu verhindern, wurde die Augensalbe Vidisic<sup>®</sup> aufgetragen. Dem erhöhten Wärmeverlust, bedingt durch den reduzierten Stoffwechsel, wurde mit einer Infrarotlampe entgegengewirkt, die zum Schutz vor Verbrennungen in einem Abstand von mindestens 30 cm aufgestellt wurde. Kurzzeitnarkosen bis zu 3 min Dauer, erforderlich für i.v. Injektionen bzw. Blutabnahmen wurden in einem Gefäß mit Ether gedrängten Tuch durchgeführt.

Zur Tötung wurden die Tiere in einen mit  $\text{CO}_2$  durchströmten Behälter bis zum Atemstillstand gegeben. Danach wurde der Brustkorb eröffnet und die Aorta im Aortenbogenbereich durchtrennt.

## **3.9 In vitro Versuche**

### **3.9.1 Stabilität der $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugate**

Zur Bestimmung der Stabilität von  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugaten wurden 0,37 MBq/ml bzw. 1,63 MBq/ml (10  $\mu\text{Ci/ml}$  bzw. 44  $\mu\text{Ci/ml}$ ) des  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk (spezifische Aktivität 514 MBq/mg (13,8 mCi/mg)) in je 1 ml Humanserum bzw. PBS bei RT bis zu 7 d inkubiert. An den Zeitpunkten 0 h, 4 h, 1 d, 2 d, 3 d, 4 d und 7 d wurde der Anteil an Antikörper gebundenem  $^{177}\text{Lu}$  bzw. freiem  $^{177}\text{Lu}$  mittels ITLC Chromatographie ermittelt.

### **3.9.2 Bindung der $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugate an Tumorzellen**

Die Bestimmung der Bindungskapazität der  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk bzw.  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugate erfolgte nach einem beschriebenen Verfahren (Nikula et al., 1999).  $3 \times 10^6$  Zellen wurden in 0,5 ml Kulturmedium mit 14,8 kBq/ml (0,4  $\mu\text{Ci/ml}$ ), 37 kBq/ml (1,0  $\mu\text{Ci/ml}$ ), 74 kBq/ml (2  $\mu\text{Ci/ml}$ ) und 148 kBq/ml (4  $\mu\text{Ci/ml}$ ) (spezifische Aktivität: 185 MBq/mg (5 mCi/mg))  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk bzw.  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk für 30 min auf Eis inkubiert

und nach Zugabe von 0,5 ml PBS abzentrifugiert (1200 Upm, 3 min). Der Überstand wurde separiert und das Zellpellet erneut mit 0,5 ml PBS resuspendiert und abzentrifugiert. Die  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivität im ersten und im zweiten Überstand sowie im Zellpellet wurde im  $\gamma$ -Counter bestimmt. Der Anteil der  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivität im Zellpellet wurde im Vergleich zur Gesamtaktivität (Aktivität in Überstand 1 und 2 plus Aktivität im Zellpellet) berechnet und dargestellt.

### **3.9.3 Klonogener Test**

Mittels Klonogener Tests wurde die Proliferationsfähigkeit von HSC45-M2 Zellen nach Inkubation mit zytotoxischen Substanzen ( $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk bzw.  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk) untersucht.

24-well Platten, je 4 pro  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugat, wurden mit jeweils 50 Zellen/ml/well bzw. 100 Zellen/ml/well beimpft. Nach 24 h wurden die Zellen alternativ mit 0,37 MBq/ml (10  $\mu\text{Ci/ml}$ ), 1,85 MBq/ml (50  $\mu\text{Ci/ml}$ ), und 3,7 MBq/ml (100  $\mu\text{Ci/ml}$ )  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk (spezifische Aktivität 735 MBq/mg – 893 MBq/mg (19,8 mCi/mg – 24,1 mCi/mg)) bzw.  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk (spezifische Aktivität 847 MBq/mg (22,9 mCi/mg)) in einem Volumen von 1 ml pro well für 7 d inkubiert. Unbehandelte Zellen, 50 Zellen/ml/well bzw. 100 Zellen/ml/well, dienten als Kontrolle.

Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch durch die Auszählung der gebildeten Klone. Vitale Klone bestanden aus ca. 20 – 50 Zellen mit deutlichen, scharfen Zellgrenzen. Um die Strahlenexposition des Untersuchers während der Auszählung zu minimieren, wurde vor der Zählung jeweils 0,5 ml/well des radioaktiven Mediums abgesaugt. Die Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardabweichung (SD) der Anzahl der Klone pro eingesetzter Aktivitätskonzentration wurde als prozentualer Anteil zur Klongenität der Kontrolle ermittelt.

## **3.10 In vivo Versuche**

### **3.10.1 Tumormodell**

Eine Peritonealkarzinose entwickelt sich beim Magenkarzinom häufig infolge einer diffusen Tumorzell dissemination. Mittels der i.p. Tumorzellinokulation wurde in der Maus die i.p. Streuung der Tumorzellen imitiert, um zum einen die Kinetik der  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugate nach i.p. bzw. i.v. Applikation im Vergleich zu tumorfreien Mäusen zu untersuchen und zum anderen um die therapeutischen Effizienz tumorspezifischer  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate nach lokoregionaler Applikation zu beurteilen.

Gemäß Huber (2003) wurden zur Induktion einer Peritonealkarzinose  $1 \times 10^7$  HSC45-M2 Zellen in 0,5 ml FKS-freien Medium Nacktmäuse i.p. inokuliert. Zur Applikation wurden 1 ml Spritzen mit 27G Kanülen verwendet. Die Injektionsstelle befand sich dicht unterhalb des Bauchfells im unteren Drittel des Abdomen auf der Linea alba, um Verletzung von Darm, Leber und Milz zu vermeiden. Positiv wirkte sich auf die gleichmäßige i.p. Dissemination der Zellen in der Regel ein Käfigwechsel aus. Durch die ständige Bewegung der Mäuse beim Anpassen an die frischen Käfigverhältnisse wurden die Zellen gut im Bauchraum verteilt.

Zur Untersuchung der Biodistribution oder der therapeutischen Effizienz wurden Mäusen 1 d, 8 d bzw. 14 d nach i.p. Tumorzellinokulation  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugate i.p. injiziert. Die histologische Untersuchung des Peritoneums bis zu 8 d nach i.p. Inokulation von  $1 \times 10^7$  HSC45-M2 Zellen zeigte bei Huber (2003), dass bis zu 2 d nach i.p. Zellinokulation keine histologisch nachweisbare Tumorzellinfiltration des Peritoneums, d.h. keine manifeste Peritonealkarzinose vorlag. Vermutlich befanden sich die injizierten Tumorzellen zu diesem Zeitpunkt teilweise noch frei flotierend in der Peritonealhöhle. 8 d nach i.p. Zellinokulation war dagegen eine ausgedehnte Infiltration des Peritoneums, d.h. eine manifeste Peritonealkarzinose nachweisbar. Im vorliegenden Fall wurde zur vereinfachten Darstellung 1 d nach i.p. Tumorzellinokulation als frühe Peritonealkarzinose (Früh-PC) und 8 d nach Tumorzellinokulation als späte oder fortgeschrittene Peritonealkarzinose (Spät-PC) bezeichnet.

### **3.10.2 Verteilung von $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugaten**

Die Verteilung der  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk bzw.  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugate wurde folgendermaßen untersucht:

#### ***3.10.2.1 Darstellung der Verteilung mittels Szintigraphie***

6 tumortragenden Nacktmäusen und 2 tumorfreien Balb/c Mäusen wurden i.p. bzw. i.v. 1,11 MBq – 2,59 MBq (30  $\mu\text{Ci}$  – 70  $\mu\text{Ci}$ )  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate (spezifische Aktivität 250 MBq/mg – 514 MBq/mg (6,8 mCi/mg – 13,9 mCi/mg)) bzw.  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugate (spezifische Aktivität 189 MBq/mg – 511 MBq/mg (5 mCi/mg – 13,8 mCi/mg)) in einem Volumen von 0,5 ml (i.p.) bzw. 0,2 ml (i.v.) injiziert. Die Verteilung der  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugate wurde 1 d p.i. bzw. 2 d p.i. szintigraphisch dargestellt. Dazu wurden die narkotisierten Mäuse (s. 3.8.1) in Bauchlage gelagert. Die Aufnahmen erfolgten ca. 20 min in ventro-dorsaler Richtung. Das ADAC Vertex

Szintigraphiegerät mit einem 3/8“Kristall und einem Medium-Energy-General-Purpose-Collimator erfasste die zwei  $^{177}\text{Lu}$   $\gamma$ -Peaks (113 keV, 208 keV) je in einem Fenster von 15%. Die Auflösung betrug 15 mm FWHM (Full Width at Half Maximum).

### 3.10.2.2 Biodistribution

Es wurden 3 Biodistributionsstudien durchgeführt:

Studie I: 24 weiblichen swiss nu/nu Nacktmäusen, wurden 24 h nach i.p. Zellinokulation 1,11 MBq (30  $\mu\text{Ci}$ )  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk (spezifische Aktivität: 257 MBq/mg (6,9 mCi/mg)) bzw.  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk (spezifische Aktivität: 189 MBq/mg (5 mCi/mg)) i.p. bzw. i.v. injiziert. Die Verteilung der  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration in den Organen wurde 1 h, 3 h und 7 d nach i.p. Applikation und 1 h nach i.v. Applikation bestimmt.

Studie II: 22 weiblichen swiss nu/nu Nacktmäusen wurden 14 d nach i.p. Zellinokulation 1,11 MBq (30  $\mu\text{Ci}$ )  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk (spezifische Aktivität: 511 MBq/mg (13,8 mCi/mg)) bzw.  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk (spezifische Aktivität: 250 MBq/mg (6,8 mCi/mg)) i.p. bzw. i.v. injiziert. Die Verteilung der  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration in den Organen wurde 1 h, 3 h und 48 h nach i.p. Applikation und 1 h nach i.v. Applikation bestimmt.

Studie III: 32 tumorfreien Balb/c Mäusen wurden 1,11 MBq (30  $\mu\text{Ci}$ )  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk (spezifische Aktivität: 514 MBq/mg (13,9 mCi/mg)) i.p. und i.v. appliziert. Die Verteilung der  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration in den Organen wurde 1 h, 3 h, 24 h, 48 h, 72 h und 7 d nach i.p. Applikation und 1 h, 24 h und 48 h nach i.v. Applikation bestimmt.

Pro Zeitpunkt und  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugat wurden für die i.p. Applikation in Studie I und II 3 und in Studie III 4 Tiere verwendet. Die i.v. Applikation wurde in Studie I und III an 3 und in Studie II an 2 Tieren durchgeführt.

Die i.p. Applikation von  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk bzw.  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk erfolgte in einem Injektionsvolumen von 0,5 ml PBS. Für die i.v. Injektion wurden die Schwanzvenen der Mäuse im warmen Wasser dilatiert, um die Punktion zu erleichtern. Die i.v. Applikation von  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk bzw.  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk erfolgte dann in einem Volumen von 0,2 ml PBS mit 27G Kanülen.

Zu den festgelegten Zeitpunkten erfolgte die Tötung der Mäuse (s. 3.8.1). Der Brustkorb wurde eröffnet und die Organe durch einen Schnitt in die Aorta entblutet, um den Messfehler durch die im Blut vorhandenen RIK gering zu halten. Zur Erfassung der Verteilung von  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk oder  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk in den Organen wurden diese in folgender Reihenfolge entnommen: Herz, Lunge, Muskel (Musculus quadriceps

femoris), Peritoneum, ggf. Tumor, Pankreas, Milz, Magen, Darm, Niere, Leber, Hirn, Haut, Knochen (Femur, links) und Knochenmark. Die Herzkammern wurden nach der Entnahme zusätzlich in Wasser gespült und auf feuchtem Filterpapier ausgedrückt um verbliebene Blutkoagel zu entfernen. Das Knochenmark wurde nach Präparation und Eröffnung der Femora durch Ausschaben mit einer Kanülenspitze gewonnen. Bei jedem Tier wurde von Leber, Niere, Dünn- bzw. Dickdarm, Peritoneum und Haut jeweils nur ein Teil an identischer Position entnommen, um keine Zählraten außerhalb des linearen Messbereichs des  $\gamma$ -Counters von  $1 \times 10^3$  cpm bis  $1 \times 10^6$  cpm zu erhalten. Aus den Darmproben wurden die Verdauungsreste entfernt.

Die Organmassen wurden in Proberöhrchen für den  $\gamma$ -Counter mittels der Sartorius Analysewaage (Sartorius, Göttingen) bestimmt. Um Ungenauigkeiten durch einen eventuellen Feuchtigkeitsverlust der Organe zu minimieren, wurden die Massen unmittelbar nach der Entnahme erfasst. Die  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivität des jeweiligen Organs wurde mittels des  $\gamma$ -Counters gemessen und als prozentualer Anteil der injizierten  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivität pro Gramm Gewebe (% ID/g) berechnet (Gleichung (3)). Um die  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentrationen der Organe zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten miteinander vergleichen zu können, wurden die  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivitäten mittels eines 1% Standards zerfallskorrigiert. Zur Bestimmung des 1% Standards wurde die pro Maus injizierte Aktivität auf 100 ml PBS verdünnt und in fünf 1 ml Aliquits im  $\gamma$ -Counter zusammen mit den Organproben gemessen.

**Gleichung (3):**

$$C_{RIK} = \frac{A_{Organ} / m_{Organ}}{A_{Standard}} \times 100 \quad C_{RIK} [\% \text{ ID/g}]: {}^{177}\text{Lu-Konzentration pro Organ}$$

$A_{Organ}$  [cpm]:  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivität pro Organ

$m_{Organ}$  [g]: Organmasse

$A_{Standard}$  [cpm]:  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivität im Standard

**3.10.2.3 Dosimetrie**

Die Abschätzung der absorbierten Strahlendosen in den Organen erfolgte anhand der Daten aus der Biodistributionsstudie III mittels des OLINDA (Organ Level Internal Dose Assessment Code) Software Programms (Vanderbilt University, 2003). Dazu wurden die nicht zerfallskorrigierten  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentrationen in den Organen mit

Ausnahme des Blutes (% ID/g) unter Einbeziehung eines Umrechnungsfaktors, der den Anteil des jeweiligen Organgewichts am Gesamtkörpergewicht der Maus angibt (Brown et al., 1997), in Prozent der injizierten Aktivität pro Organ (% ID/Organ) berechnet. Die resultierenden Zeit-Aktivitätskurven der Organe wurden durch mono-exponential Funktionen angepasst und daraus die Integration in Anzahl der Zerfälle pro injizierte Aktivität (residence times) in den Organen ermittelt. Diese Größen wurden in das OLINDA Programm eingegeben.

Am OLINDA-Modell des erwachsenen Mannes in mSv/MBq wurden die mittleren absorbierten Organdosen für folgende Organe bestimmt: Herz, Lunge, Muskel, Pankreas, Milz, Magen, Darm, Niere, Leber, Hirn, Haut, Knochen (Substantia corticalis und Substantia spongiosa) sowie Knochenmark.

#### **3.10.2.4 Gesamtkörperretention von $^{177}\text{Lu-d9MAk}$ Konjugaten**

Zur Bestimmung der Gesamtkörperretention von  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugaten im murinen Organismus wurden 8 swiss nu/nu Nacktmäusen 0,74 MBq – 14,8 MBq (20  $\mu\text{Ci}$  – 400  $\mu\text{Ci}$ )  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  in einem Volumen von 0,5 ml i.p. injiziert. Um die effektiv applizierte  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivität pro Maus zu erhalten, wurden die verwendeten Spritzen jeweils unmittelbar vor und nach der Injektion sowie die Mäuse unmittelbar nach der Applikation mittels eines Aktivimeters gemessen. Danach erfolgte die Messung der  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivität pro Maus täglich über einen Zeitraum von 7 d. Für die Messung wurden die Mäuse kurz narkotisiert und in einem luftdurchlässigen Plastikbeutel gegeben. Damit konnte eine Kontamination des Messgeräts mit radioaktiven Exkrementen verhindert werden.

Zur Berechnung der im Körper verbliebenen Aktivität wurde zunächst der prozentuale Anteil der injizierten  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivität pro Messzeitpunkt bestimmt und um den radioaktiven Zerfall mittels Zerfallsgesetzes korrigiert.

#### **3.10.3 Radioimmuntherapie mit $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugaten**

Es wurden 2 Therapiestudien durchgeführt:

Therapiestudie I: 1 d und 8 d nach Inokulation von  $1 \times 10^7$  HSC45-M2 Zellen wurden weiblichen swiss nu/nu Nacktmäusen (n=10) 0,37 MBq (10  $\mu\text{Ci}$ ), 1,85 MBq (50  $\mu\text{Ci}$ ), 7,4 MBq (200  $\mu\text{Ci}$ ) bzw. 14,8 MBq (400  $\mu\text{Ci}$ )  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  bzw.  $^{177}\text{Lu-d8MAk}$  Konjugate i.p. injiziert. Die entsprechenden spezifischen Aktivitäten der applizierten Therapieansätze sind in Tabelle 2 dargestellt. Untherapierte Mäuse (n=13) wurden zur

Kontrolle der i.p. Tumorpheriferation mitgeföhrt. Die injizierten Zellen unterschieden sich in 3 bis 10 Passagen. Die Höhe der applizierten  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivitäten orientierte sich zum einen an der bei Koppe et al. (2004) ermittelten maximal tolerierbaren Aktivität (MTA) von 16,65 MBq i.p. applizierter  $^{177}\text{Lu}$ -MN-14 Konjugate 10 d nach i.p. Tumorzellinokulation (LS174T) und zum anderen an Studien zur lokoregionalen RIT mit  $^{177}\text{Lu}$ -CC49 Konjugaten bei Mäusen 7 d nach i.p. Tumorzellinokulation (LS174T) (Schott et al., 1994).

Über einen Zeitraum von 250 d wurden die Tiere hinsichtlich ihres Allgemein- und Ernährungszustandes sowie Verhaltens beobachtet. Die Endpunktkriterien der Überlebenszeit waren (i) Zeichen von Aszites, (ii) sichtbares Tumorzuchstum oder (iii) tumorbedingte Kachexie. Zur Verifizierung des i.p. Tumorzuchstums wurden die Tiere unmittelbar nach dem jeweiligen Todeszeitpunkt obduziert. Tiere, die 250 d überlebten, wurden danach getötet und ebenfalls zur Verifizierung eines okkulten i.p. Tumorzuchstums obduziert.

Therapiestudie II: Um die Validität der Ergebnisse aus Studie I zu überprüfen, wurden 1 d nach Tumorzellinokulation die i.p. Therapien mit 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk (n=10) bzw. 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk (n=10) unter gleichen Bedingungen erneut durchgeführt (spezifische Aktivitäten: s. Tab. 2).

		Spezifische Aktivität in MBq/mg (mCi/mg)	
Applizierte $^{177}\text{Lu}$ - Aktivität in MBq ( $\mu\text{Ci}$ )	Applizierter Antikörper	Tag nach Tumorzellinokulation	
		1	8
1,85 (50)	d9MAk	103 (3)	378 (10)
	d8MAk	411 (11)	411 (11)
7,4 (200)	d9MAk	822 (22) [I], 925 (25) [II]	892 (24)
	d8MAk	787 (21) [I], 592 (16) [II]	740 (20)
14,8 (400)	d9MAk	871 (23)	778 (21)
	d8MAk	871	778

**Tabelle 2: Spezifische Aktivitäten der in Therapiestudie I [I] bzw. II [II] i.p. applizierten  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugate zum Zeitpunkt der Injektion**

### 3.10.4 Toxizitätsstudien

Gewebe mit einer hohen Proliferationsrate wie z. B. die Spermatozoen in den Testes oder die hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark sind besonders strahlensensibel und können bei der RIT unspezifisch geschädigt werden. Zellen des hämatopoetischen Systems treten nach unterschiedlich langer differentieller Entwicklung aus dem Knochenmark aus und zirkulieren im Blut. Die Bestimmung der weißen (Leukozyten) sowie roten (Erythrozyten) Blutkörperchen im Blut der Tiere stellte eine geeignete Methode dar, um die Radiotoxizität i.p. applizierter  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate auf das Knochenmark zu bewerten. Zudem wurden auffällige Veränderungen der Organe histopathologisch untersucht.

#### 3.10.4.1 Bestimmung der Leukozyten und Erythrozyten

1 Woche vor i.p. Applikation der  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate wurden die prätherapeutischen Werte für die Leukozyten bzw. Erythrozyten im Blut tumorfreier, weiblicher, 6 Wochen alter swiss nu/nu Nacktmäuse bestimmt und als Referenz gleich 100% verwendet. Den Tieren (n=5) wurden 0,37 MBq (10  $\mu\text{Ci}$ ), 1,85 MBq (50  $\mu\text{Ci}$ ),

7,4 MBq (200  $\mu\text{Ci}$ ), bzw. 14,8 MBq (400  $\mu\text{Ci}$ )  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk i.p. injiziert. Die Bestimmung der Leukozyten bzw. Erythrozyten erfolgt erstmalig 3 Tage p.i. und dann wöchentlich bis zu 52 Tagen. Die Blutentnahme der narkotisierten Mäuse (s. 3.8.1) erfolgte mittels heparinisierten Insulinspritzen durch Punktion der Vena jugularis. In den entnommenen Blutproben (50  $\mu\text{l}$ ) wurden die Leukozyten- bzw. Erythrozytenzahlen mit dem Blutanalysegerät SE 9000 (Sysmex, Norderstedt) im Differentialblutbild bestimmt. Dazu wurden 50  $\mu\text{l}$  Mäuseblut mit 100  $\mu\text{l}$  Shedreagenz Cellpack (Sysmex, Norderstedt) verdünnt. Das minimale Messvolumen des Analysegerätes betrug 80  $\mu\text{l}$ .

#### **3.10.4.2 Toxizitätsbeurteilung anhand histologischer Präparate**

Bei allen verstorbenen Tieren sowie bei Tieren, die aufgrund der Endpunktkriterien (s. 3.10.3) bzw. am Ende der Beobachtungszeit nach 250 d euthanisiert wurden, erfolgte eine Obduktion. Dabei wurde bei je 2 Tieren pro applizierter  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivität Milz, Leber sowie Nieren zur Beurteilung von Strahlenspätwirkungen entnommen. Da die Blutbildung bei Mäusen neben dem Knochenmark auch in Milz und Leber physiologisch stattfindet (Anver und Haines, 2004), waren diese Organe insbesondere für die Beurteilung strahleninduzierter maligner Neoplasien des blutbildenden Systems bedeutsam. Außerdem wurden auch alle auffällig veränderten Gewebe bzw. Organe wie z. B. Lymphknoten entnommen. Sämtliche Organe wurden in 4% Formalin bei RT konserviert. Die histologische Aufbereitung und Auswertung der Präparate erfolgte am Institut für Pathologie der GSF in Neuherberg durch Frau Dr. L. Quintanilla-Fent und ihrem Team.

### **3.11 Statistische Auswertung**

Die statistische Analyse wurde mit dem Statistik-Softwareprogramm SPSS 13 für Windows durchgeführt (Statistical Package for the Society Sciences). Hierbei wurden die Daten der Untersuchung der Bindungskapazität, des klonogenen Tests sowie der Blutwerte mittels des Kruskal-Wallis-Tests sowie des Wilcoxon-Tests für unabhängige Stichproben auf statistische Signifikanz mit  $p < 0,05$  geprüft. Die Auswertung der Therapiestudien erfolgte mittels der Methode nach Kaplan-Meier über einen Beobachtungszeitraum von 250 d nach i.p. Tumorzellinokulation. Mittels des Log Rank Testes wurden alle Therapiegruppen paarweise miteinander verglichen und mit  $p < 0,05$  hinsichtlich der statistischen Signifikanz untersucht.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 $^{177}\text{Lu}$ -Markierung von d9MAk bzw. d8MAk

Der Anteil von gebundenem  $^{177}\text{Lu}$  wurde mittels ITLC Chromatographie vor und nach PD 10 Gelfiltration der Radioimmunkonjugatlösung bestimmt. Nach Inkubation von 96  $\mu\text{g}$  – 400  $\mu\text{g}$  d9MAk bzw. d8MAk mit 7,4 MBq –  $4,4 \times 10^2$  MBq  $^{177}\text{Lu}$  für 1 h wurde vor der Gelfiltration eine Markierungsausbeute von  $90\% \pm 5\%$  bei  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk (n=21) und  $85\% \pm 13\%$  bei  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk (n=11) erzielt. Nach der Gelfiltration konnte die Reinheit der  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk bzw.  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugate auf  $97\% \pm 2\%$  bzw.  $94\% \pm 5\%$  gesteigert werden. Dabei wurde ein Verlust von 35% des ursprünglich eingesetzten d9MAk und 36% des d8MAk festgestellt. Die Unterschiede in den Markierungsausbeuten beider Antikörper resultierten zum einen aus der Verwendung verschiedener  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivitäten bzw. Antikörpermengen und zum anderen aus den Antikörperchargen, die sich in der Qualität der Antikörperchelatierung unterschieden.

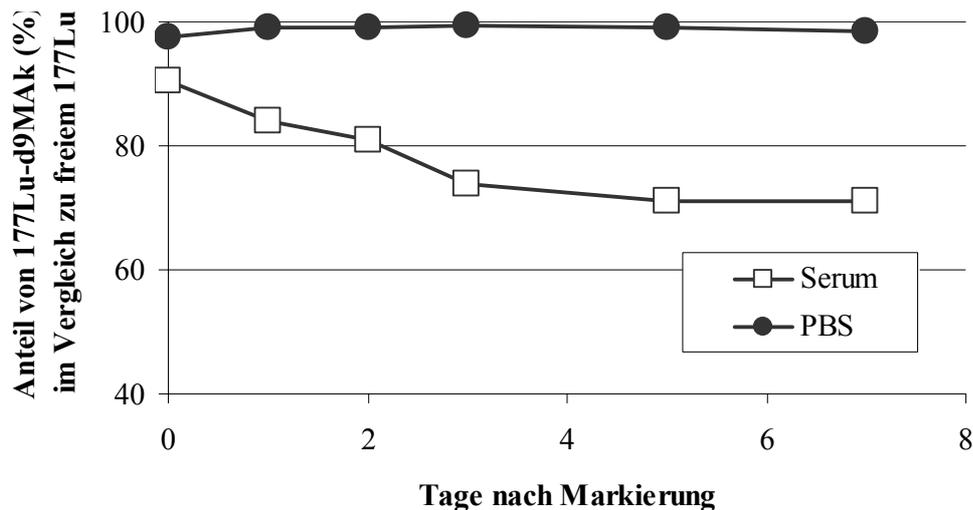
In den tierexperimentellen Therapiestudien wurden Mäusen unterschiedliche Aktivitäten des  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk bzw.  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugats i.p. appliziert. Die Antikörpermenge betrug dabei in Abhängigkeit von der applizierten Aktivität zwischen 5  $\mu\text{g}$  und 18  $\mu\text{g}$ , wobei im Mittel 10  $\mu\text{g}$  pro Maus injiziert wurde. Die spezifische Aktivität der  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugate variierte zum Zeitpunkt der Injektion in Abhängigkeit von der Markierung zwischen 103 MBq/mg und 925 MBq/mg bei  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk und 411 MBq/mg und 871 MBq/mg bei  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk, wobei die mittlere spezifische Aktivität der  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugate ca. 637 MBq/mg betrug. Entsprechend dieser mittleren spezifischen Aktivität war jedes 8 Antikörpermolekül mit einem  $^{177}\text{Lu}$ -Atom markiert.

Eine Erhöhung der spezifischen Aktivität war verbunden mit einer Senkung der Markierungsausbeute vor Gelfiltration. Ursächlich wurde dafür eine im Verhältnis zur Anzahl der  $^{177}\text{Lu}$ -Atome geringere Anzahl an Antikörpermoleküle angenommen. Beispielsweise betrug die Markierungsausbeute vor Gelfiltration 90% bei einer spezifischen Aktivität von 123 MBq/mg und nur 78% bei einer spezifischen Aktivität von 378 MBq/mg.

### 4.2 Stabilität der $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugate

In Abbildung 1 ist die Stabilität von  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugaten in Humanserum und in PBS über einen Zeitraum von 7 d veranschaulicht. In PBS konnte über den gesamten

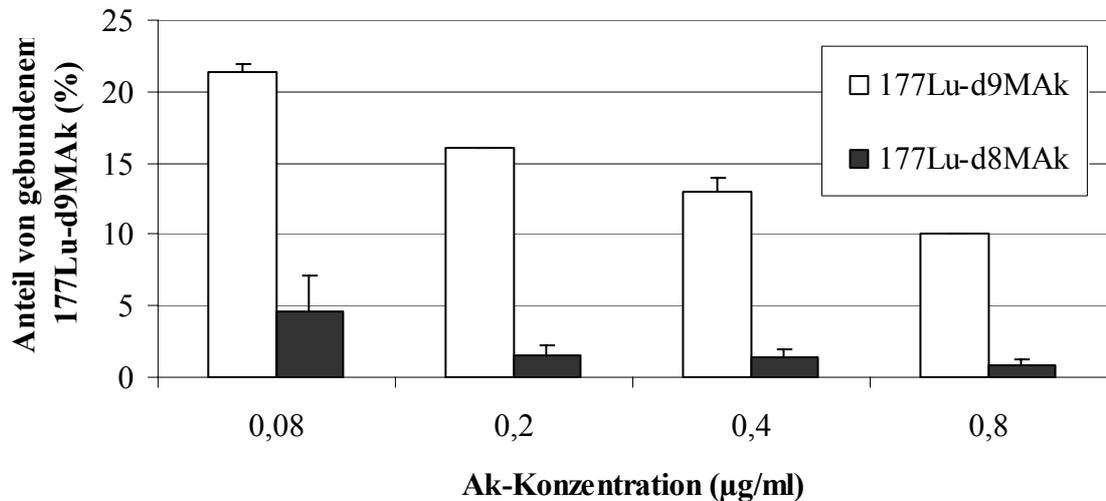
Zeitraum keine Veränderung der Stabilität festgestellt werden. Dagegen betrug der Anteil von  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  im Patientenserum 3 d nach Inkubation nur noch 74%. Bis zum 7. Tag wurde nur eine geringe Veränderung in der Stabilität der  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  Konjugate im Serum beobachtet. Zu diesem Zeitpunkt, d.h. nach ca. einer HWZ von  $^{177}\text{Lu}$  (6,7 d), betrug der Anteil von  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  71%.



**Abb 1.: Stabilität der  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  Konjugate.**  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  wurde in 1 ml Patientenserum bzw. 1 ml PBS bei RT über 7 d inkubiert. Während der Anteil der  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  Konjugate in PBS konstant bei ca. 100% blieb, verringerte er sich im Serum auf 71% nach 7 d.

### 4.3 Bindung der $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugate an Tumorzellen

Die Bestimmung der Tumorzellbindung der  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugate in Abhängigkeit von der Antikörperkonzentration erfolgte nach Inkubation von  $3 \times 10^6$  HSC45-M2 Zellen mit  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  bzw.  $^{177}\text{Lu-d8MAk}$  (s. 3.9.2). Dabei war die Bindung von  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  Konjugaten mit 21% (0,08  $\mu\text{g/ml}$  d9MAk), 16% (0,2  $\mu\text{g/ml}$  d9MAk), 13% (0,4  $\mu\text{g/ml}$  d9MAk) und 10% (0,8  $\mu\text{g/ml}$  d9MAk) signifikant höher als von  $^{177}\text{Lu-d8MAk}$  Konjugaten mit 4,5%, 2%, 2% und 1% ( $p < 0,05$ ) (Abb. 2).



**Abb 2.: Tumorzellbindung von  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk bzw.  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugate in Abhängigkeit von der Antikörperkonzentration.**  $3 \times 10^6$  HSC45-M2 Zellen wurden jeweils mit einer Antikörperkonzentration der  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugate von 0,08 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,4 µg/ml bzw. 0,8 µg/ml für 30 min in 0,5 ml PBS inkubiert. Die Bindung der  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate an die Tumorzellen war gegenüber  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugaten signifikant höher.

Bei Inkubation der HSC45-M2 Zellen mit  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugaten war mit zunehmender Antikörperkonzentration eine kontinuierliche Abnahme des Anteils an gebundenen  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugaten bei gleichzeitiger Zunahme des nicht gebundenen Anteils an  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk zu beobachten. Wie Tabelle 3 zeigt, nahm dabei mit zunehmender Antikörperkonzentration der  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugate bei konstanter Antigenzahl die Antigensättigung zu, d.h. die Zahl der gebundenen  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Moleküle, eine vollständige Antigensättigung konnte aber auch bei 2,7-facher Antikörperüberschuss nicht erreicht werden. Der Anteil nicht gebundener RIK nahm daher bei zunehmender Antikörperkonzentration ebenfalls zu. Bei 0,8 µg/ml  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk lag z. B. ein ca. 2,7-facher Antikörperüberschuss in der Inkubationslösung vor, der zu einer Antigensättigung von ca. 25% führte. Bei 0,08 µg/ml  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk lag ein 3,75-facher Antigenüberschuss in der Inkubationslösung vor, der zu einer Antigensättigung von nur 6% führte.

	Anzahl der HSC45-M2 Zellen	$3 \times 10^6$			
	Anzahl der AG ( $3 \times 10^5$ AG/Zelle)	$6 \times 10^{11}$			
Inkubationsansatz (0,5 ml)	Antikörperkonzentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	0,08	0,2	0,4	0,8
	Anzahl der Antikörpermoleküle	$1,6 \times 10^{11}$	$4 \times 10^{11}$	$8 \times 10^{11}$	$1,6 \times 10^{12}$
	<b>AG:AK Verhältnis</b>	<b>3,75:1</b>	<b>1,5:1</b>	<b>1:1,3</b>	<b>1:2,7</b>
Nach Inkubation	Antikörper gebunden an HSC45-M2 ( $\mu\text{g}$ )	0,009	0,016	0,026	0,04
	Antikörpermoleküle gebunden an HSC45-M2	$3,6 \times 10^{10}$	$6,4 \times 10^{10}$	$1 \times 10^{11}$	$1,6 \times 10^{11}$
	<b>Antigensättigung (%)</b>	<b>~6</b>	<b>~11</b>	<b>~17</b>	<b>~25</b>

**Tabelle 3: Antigen/Antikörperverhältnisse bei Inkubation von HSC45-M2 Zellen mit verschiedenen Antikörperkonzentrationen  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$ .** Berechnet wurde die Anzahl der Antigene und die Anzahl der Antikörpermoleküle (s. Gleichung (1) 3.6.2.2) pro Inkubationsansatz (0,5 ml) mit 0,04  $\mu\text{g}$ , 0,1  $\mu\text{g}$ , 0,2  $\mu\text{g}$  bzw. 0,4  $\mu\text{g}$   $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  sowie die Antigensättigung nach Inkubation.

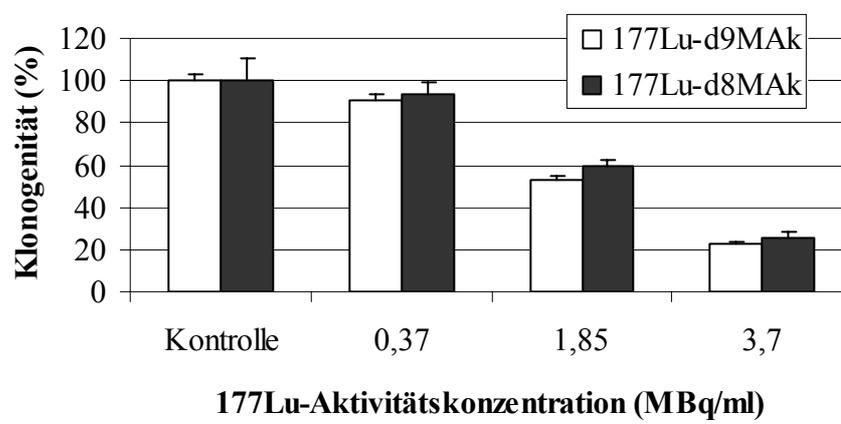
#### 4.4 Klonogener Test

Das klonogene Überleben nach Inkubation von HSC45-M2 Zellen mit  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugaten unterschied sich nicht bei Aussaat von 50 bzw. 100 Zellen pro well. Daher wurden die Ergebnisse mit 50 bzw. 100 Zellen pro well zusammengefasst und für  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  bzw.  $^{177}\text{Lu-d8MAk}$  dargestellt (Abb. 3).

Im Vergleich zur Klonogenität der nicht bestrahlten Kontrolle reduzierte die Inkubation mit 0,37 MBq/ml  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  bzw.  $^{177}\text{Lu-d8MAk}$  das klonogene Potential der HSC45-M2 Zellen auf 90% bzw. auf 94%. Die Inkubation mit 1,85 MBq/ml  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  bzw.  $^{177}\text{Lu-d8MAk}$  bewirkte eine Verminderung der Klone auf 53% bzw. auf 60%. Die stärkste Reduzierung der Klonogenität der HSC45-M2 Zellen auf 22% bzw.

auf 25% wurde nach Inkubation mit 3,7 MBq/ml  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk bzw.  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk erzielt.

Bei allen untersuchten Aktivitätskonzentrationen unterschied sich die Reduzierung des klonogenen Überlebens nach Inkubation mit  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugaten nicht signifikant zu  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugaten. Ursache dafür war sehr wahrscheinlich der für  $\beta$ -Emitter charakteristische Crossfire-Effekt, der den zytotoxischen Effekt der durch die spezifische Bindung erzielt wird, überwiegt.



**Abb 3.:** Klonogenität von HSC45-M2 Zellen 7 d nach Inkubation mit  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk bzw.  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk. Mit steigender  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivitätskonzentration nahm die Klonogenität der Tumorzellen sowohl bei  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk als auch bei  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk ab. Dabei unterschieden sich  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk bzw.  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk in ihrer Wirkung nicht signifikant.

## 4.5 Biodistributionsstudien

Für die Versuche, welche die Biodistribution i.p. oder i.v. applizierter tumorspezifischer bzw. nicht tumorspezifischer  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugate in vivo untersuchten, betrug die Markierungsausbeute von  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk bzw.  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk nach der Reinigung mittels der PD-10 Säule stets über 95%. Dementsprechend wurden  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentrationen in den Organen durch freies  $^{177}\text{Lu}$  für die Bewertung der Daten vernachlässigt.

### 4.5.1 Verteilung von $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk bzw. $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk in Mäusen mit Peritonealkarzinose nach i.p. Applikation

Die Untersuchung der Biodistribution i.p. applizierter  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugate erfolgte an swiss nu/nu Nacktmäusen 1 d nach i.p. Inokulation von HSC45-M2 Zellen (frühe

Peritonealkarzinose) bzw. 14 d nach i.p. Inokulation von HSC45-M2 Zellen (fortgeschrittene Peritonealkarzinose) 1 h, 3 h, 2 d und 7 d p.i. (Abb. 4 – 9).

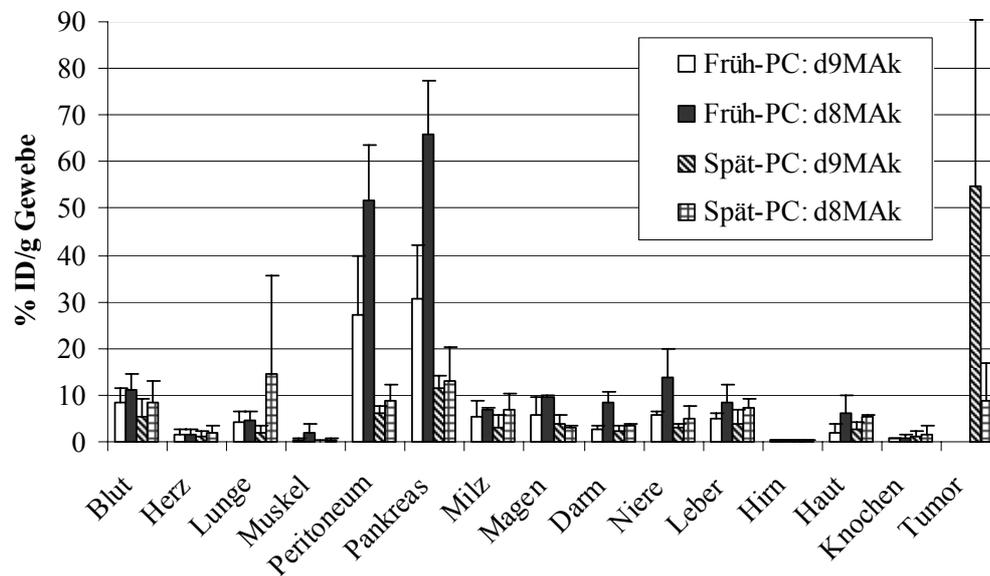
#### **4.5.1.1 Verteilung 1 h nach i.p. Applikation**

Bei Mäusen mit früher sowie fortgeschrittener Peritonealkarzinose konnte 1 h nach Applikation der  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugate in allen Organen mit Ausnahme des Tumorgewebes eine stärkere Konzentration des unspezifischen  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugats im Vergleich zum spezifischen  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugat festgestellt werden (Abb. 4). Im frühen Stadium der Peritonealkarzinose war die Konzentration der  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugate in Peritoneum ( $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk: 27,4 % ID/g,  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk: 51,6 % ID/g) und Pankreas ( $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk: 30,6 % ID/g,  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk: 65,7 % ID/g) im Vergleich zu Mäusen mit fortgeschrittener Peritonealkarzinose besonders hoch (Peritoneum: 5,9 % ID/g ( $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk), 8,8 % ID/g ( $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk), Pankreas: 11,4 % ID/g ( $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk), 13,0 % ID/g ( $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk)). Auffallend war dabei im frühen Stadium der Peritonealkarzinose die in beiden Organen fast doppelt so hohe  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration nach  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk gegenüber der  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Applikation. Gleichzeitig war die  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration im Blut bei  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk mit 11,2 % ID/g höher als bei  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk (8,3 % ID/g).

Im fortgeschrittenen Stadium der Peritonealkarzinose wurde die stärkste  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivität im Tumorgewebe gemessen. Mit 54,8 % ID/g reicherte  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk ca. 6-mal so stark im Tumorgewebe an wie  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk (8,7 % ID/g). Dementsprechend betrug der Tumor/Blut Quotient 1 h nach Applikation der  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate aufgrund der starken Anreicherung im Tumorgewebe bei ca. 10-mal geringerer  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration im Blut (5,5 % ID/g) 10,1. Die Applikation der  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugate resultierte dagegen in einem deutlich niedrigeren Tumor/Blut Quotient von 0,7, bedingt durch die annähernd gleiche  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration im Tumorgewebe (8,7 % ID/g) und im Blut (8,5 % ID/g).

Mit Ausnahme der Niere (13,6 % ID/g) nach  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Applikation bei früher Peritonealkarzinose und der Lunge (14,6 % ID/g) nach  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Applikation bei später Peritonealkarzinose waren die  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentrationen der übrigen Organe sowohl nach  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk als auch nach  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Applikation bei beiden Tumorstadien unter 10 % ID/g. Die ungewöhnlich hohe Konzentration der  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugate in der Lunge im Stadium der fortgeschrittenen Peritonealkarzinose kann dabei im Vergleich zu den übrigen  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentrationen in der Lunge (1,2-4,6 % ID/g) und

aufgrund der hohen Standardabweichung ( $\pm 20,9$ ) am ehesten auf eine Kontamination des Lungengewebes mit Blut während der Entnahme zurückgeführt werden.



**Abb 4:** Organverteilung i.p. applizierter  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk bzw.  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugate 1 h p.i. bei swiss nu/nu Nacktmäusen mit früher (Früh-PC) bzw. fortgeschrittener (Spät-PC) Peritonealkarzinose. Im fortgeschrittenen Tumorstadium zeigt sich im Tumorgewebe eine deutlich stärkere Retention der  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivität nach Applikation tumorspezifischer  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate als nach Applikation nicht tumorspezifischer  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugate. Die  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration im entnommenen Tumorgewebe war 1 h p.i. bei  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk ca. 6× höher als bei  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk.

#### 4.5.1.2 Verteilung 3 h nach i.p. Applikation

Im Vergleich zur hohen Organkonzentration der  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugate 1 h p.i. bei Mäusen mit früher sowie fortgeschrittener Peritonealkarzinose, war 3 h p.i. eine stärkere Konzentration des unspezifischen  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk gegenüber  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk nur noch in den Organen der Mäuse mit früher Peritonealkarzinose feststellbar (Abb. 5). Dabei war im frühen Stadium der Peritonealkarzinose der Abfall der  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration i.p. applizierter  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugate in Peritoneum und Pankreas besonders auffallend. Die  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration fiel in diesen Organen auf ca. die Hälfte des 1 h Wertes (Peritoneum und Pankreas: 51,6 % ID/g und 65,7 % ID/g (1 h) vs. 28,3 % ID/g und 33,8 % ID/g (3 h)). Dagegen war 3 h nach Applikation der spezifischen  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate in Mäusen mit früher Peritonealkarzinose die  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration in

Peritoneum und Pankreas mit 21,7 % ID/g und 27,7 % ID/g nur um 2% – 5% niedriger als bei der Verteilung nach 1 h p.i. (27,4 % ID/g und 30,6 % ID/g).

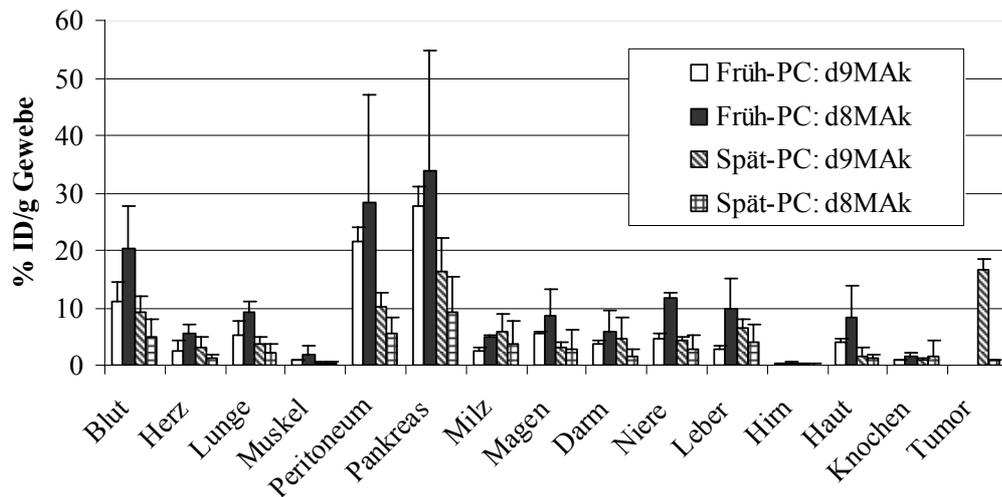
Im Blut der Mäuse mit früher Peritonealkarzinose wurde bei  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Applikation parallel zum starken Abfall in Peritoneum und Pankreas ein Anstieg der  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration von 11,2 % ID/g nach 1 h p.i. auf 20,3 % ID/g nach 3 h p.i. festgestellt. 3 h nach  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Applikation war im frühen Stadium der Peritonealkarzinose die  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration im Blut entsprechend dem geringen Abfall in Peritoneum und Pankreas nur wenig erhöht (1 h: 8,3 % ID/g, 3 h: 11,0 % ID/g).

Im fortgeschrittenen Stadium der Peritonealkarzinose wurde 3 h p.i. wie schon 1 h p.i. die stärkste  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivität im Tumorgewebe bei  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Applikation gemessen. Dabei war die  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konzentration im Tumor mit 16,5 % ID/g ca. 20-mal größer als bei  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk (0,8 % ID/g). Im Vergleich zum 1 h Wert ( $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk: 54,8 % ID/g,  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk: 8,7 % ID/g) war die  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration im Tumorgewebe bei Applikation spezifischer  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate jedoch um ca. 70% und bei unspezifischen  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugaten um ca. 100% geringer.

In Peritoneum und Pankreas von Mäusen mit fortgeschrittener Peritonealkarzinose konnte 3 h nach Applikation der  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate ein Anstieg der  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration gegenüber dem 1 h Wert beobachtet werden (Peritoneum und Pankreas: 6,0 % ID/g und 11,4 % ID/g (1 h p.i.), 10,0 % ID/g und 16,4 % ID/g (3 h p.i.)). Die  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration nach  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Applikation nahm dagegen in diesen Organen im Vergleich zu 1 h p.i. ab (Peritoneum und Pankreas: 8,8 % ID/g und 13,0 % ID/g (1 h p.i.), 5,5 % ID/g und 8,0 % ID/g (3 h p.i.)) und war damit ca. die Hälfte niedriger als bei  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk. Dies dürfte Ausdruck einer spezifischen Bindung von  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugaten an tumorinfiltriertes Peritoneum bzw. Pankreas sein.

Im Vergleich zu den  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentrationen im Blut von Mäusen mit fortgeschrittener Peritonealkarzinose 1 h p.i. ( $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk: 5,5 % ID/g,  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk: 8,5% ID/g), waren die Blutkonzentrationen 3 h p.i. bei  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk mit 9,3 % ID/g höher und bei  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk mit 4,5 % ID/g niedriger. Die höhere  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration im Blut bei gleichzeitig geringerer  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration im entnommenen Tumorgewebe 3 h vs. 1 h nach  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Applikation wirkte sich in einen entsprechend niedrigeren Tumor/Blut Quotient aus. Mit 1,8 bei  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk war dieser 3 h p.i. aber immer noch deutlich größer als bei  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk (0,18).

Mit Ausnahme der Niere (11,7 % ID/g) nach  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Applikation bei Mäusen mit früher Peritonealkarzinose waren die  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentrationen der übrigen Organe sowohl nach  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk als auch nach  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Applikation bei beiden Tumorstadien unter 10 % ID/g.



**Abb 5.: Organverteilung i.p. applizierter  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk bzw.  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugate 3 h p.i. bei swiss nu/nu Nacktmäusen mit früher (Früh-PC) bzw. fortgeschrittener (Spät-PC) Peritonealkarzinose.** Auch 3 h p.i. zeigt sich im Tumorgewebe bei fortgeschrittener Peritonealkarzinose eine deutlich stärkere Retention der  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivität nach Applikation tumorspezifischer  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate als nach Applikation nicht tumorspezifischer  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugate. Die  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration im entnommenen Tumorgewebe war 3 h p.i. bei  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk ca. 20× höher als bei  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk.

#### 4.5.1.3 Verteilung 2 d bzw. 7 d nach i.p. Applikation

Die Verteilung der  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugate 7 d p.i. konnte nur an Mäusen mit früher Peritonealkarzinose bestimmt werden. 4 von 6 Mäusen mit fortgeschrittener Peritonealkarzinose fielen aufgrund des progredienten Tumorstadiums 2 d p.i. mit stark reduziertem Allgemeinzustand auf (Tumorkachexie, Bewegungsarmut sowie verminderte Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme). Deshalb wurden alle Tiere (n=6) mit fortgeschrittener Peritonealkarzinose 2 d p.i. euthanisiert und die Organverteilung der  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugate zu diesem Zeitpunkt (2 d) bestimmt.

Die auffallend hohen Organkonzentrationen i.p. applizierter  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugate gegenüber  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugaten, die bei Mäusen mit früher oder später Peritonealkarzinose 1 h p.i. bzw. mit früher Peritonealkarzinose 3 h p.i. beobachtet wurden, waren 2 d bzw. 7 d p.i. nicht mehr feststellbar (Abb. 6). Die  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration i.p. applizierter  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugate war in beiden Tumorstadien nur noch in der Leber (Früh-PC: 7,7 % ID/g, Spät-PC: 16,4 % ID/g) und bei fortgeschrittener Peritonealkarzinose in der Milz (8,0 % ID/g) bzw. in der Niere (7,9 % ID/g) deutlich höher als bei  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk (Leber: 4,1 % ID/g (Früh-PC) und 6,8 % ID/g (Spät-PC), Milz: 5,3 % ID/g (Spät-PC), Niere: 5,1 % ID/g (Spät-PC)).

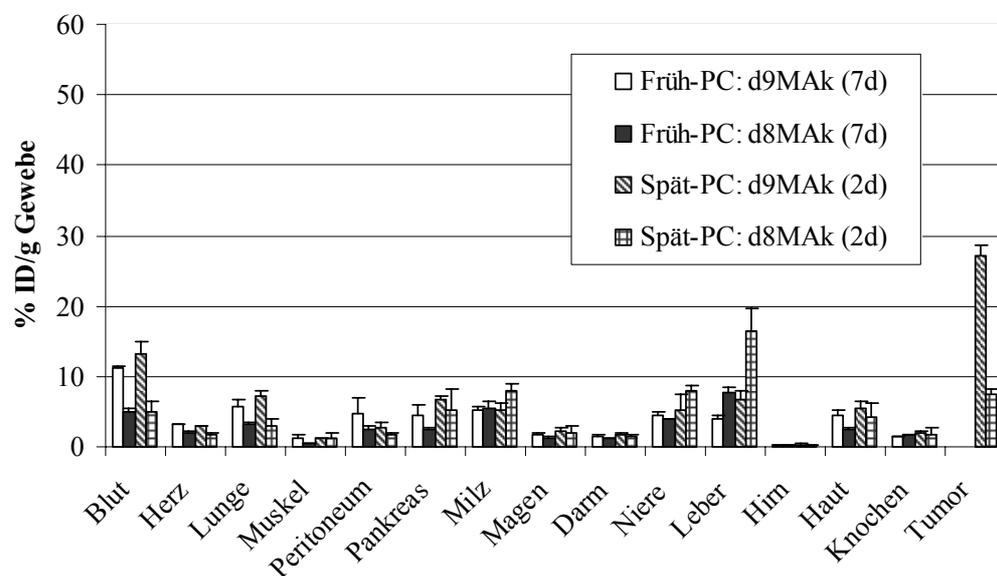
Im frühen Stadium der Peritonealkarzinose wurde 7 d nach Applikation der  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugate in Peritoneum und Pankreas erstmals eine höhere  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivität i.p. applizierter  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate im Vergleich zu  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugaten gemessen. Mit 4,8 % ID/g im Peritoneum und 4,5 % ID/g im Pankreas war die  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration bei  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk 7 d p.i. zwar wesentlich geringer als 3 h p.i. (21,7 % ID/g und 27,7 % ID/g), aber ca. doppelt so hoch wie bei  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk 7 d p.i. (2,5 % ID/g und 2,5 % ID/g). Auch im Blut der Mäuse mit früher Peritonealkarzinose war die  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration der applizierten  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate 7 d p.i. ca. doppelt so hoch wie bei  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk (11,3 % ID/g vs. 5,0 % ID/g). Im Vergleich zum 3 h Wert (11,0 % ID/g) blieb die  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konzentration im Blut jedoch unverändert.

Im fortgeschrittenen Stadium der Peritonealkarzinose wurde 2 d nach Applikation der  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugate vergleichbar zur Verteilung nach 1 h bzw. nach 3 h die stärkste  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration erneut im Tumorgewebe nach  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Applikation nachgewiesen. Im Vergleich zum 3 h Wert (16,5 % ID/g) war jedoch 2 d p.i. eine höhere Retention der  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate im Tumorgewebe von 27,0 % ID/g festzustellen. Die Tumorretention von  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk war hierbei ca. 3-mal stärker als bei  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk (7,5 % ID/g). Auch Peritoneum und Pankreas wiesen bei Mäusen mit fortgeschrittener Peritonealkarzinose geringfügig höhere  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration nach  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Applikation (2,8 % ID/g und 6,8 % ID/g) als nach  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Applikation (1,8 % ID/g und 5,2 % ID/g) auf. Im Vergleich zu 3 h p.i. waren diese jedoch deutlich geringer ( $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk: 10,0 % ID/g und 16,4 % ID/g,  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk: 5,0 % ID/g und 8,0 % ID/g).

Im Blut der Mäuse mit fortgeschrittener Peritonealkarzinose wurde 2 d nach  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Applikation eine gering höhere  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration gemessen als nach 3 h

(3 h: 9,3 % ID/g, 2 d: 13,1 % ID/g). Die  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konzentration war im Blut 2 d p.i. gegenüber dem 3 h Wert unverändert (3 h: 5,1 % ID/g, 2 d: 5,1 % ID/g). Aufgrund der stärkeren Retention der  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate im Tumorgewebe 2 d p.i. und der nur geringen Zunahme der  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration im Blut wurde ein höherer Tumor/Blut Quotient von 2,1 ermittelt im Vergleich zu 3 h p.i. (1,8). Der Tumor/Blut Quotient i.p. applizierter  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugate betrug 2 d p.i. 1,4.

In den übrigen Organen war die  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration sowohl nach  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk als auch nach  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Applikation bei beiden Tumorstadien unter 8 % ID/g.



**Abb 6.: Organverteilung i.p. applizierter  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk bzw.  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugate 7 d p.i. bei swiss nu/nu Nacktmäusen mit früher (Früh-PC) bzw. 2 d p.i. bei swiss nu/nu Nacktmäusen mit fortgeschrittener (Spät-PC) Peritonealkarzinose. 2 d p.i. zeigt sich im Tumorgewebe bei fortgeschrittener Peritonealkarzinose erneut eine deutlich stärkere Retention der  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivität nach Applikation tumorspezifischer  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate als nach Applikation nicht tumorspezifischer  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugate. Die  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration im entnommenen Tumorgewebe war 2 d p.i. bei  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk ca. 3× höher als bei  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk.**

#### 4.5.2 Verteilung von $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk bzw. $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk in Mäusen mit Peritonealkarzinose 1 h nach i.v. Applikation

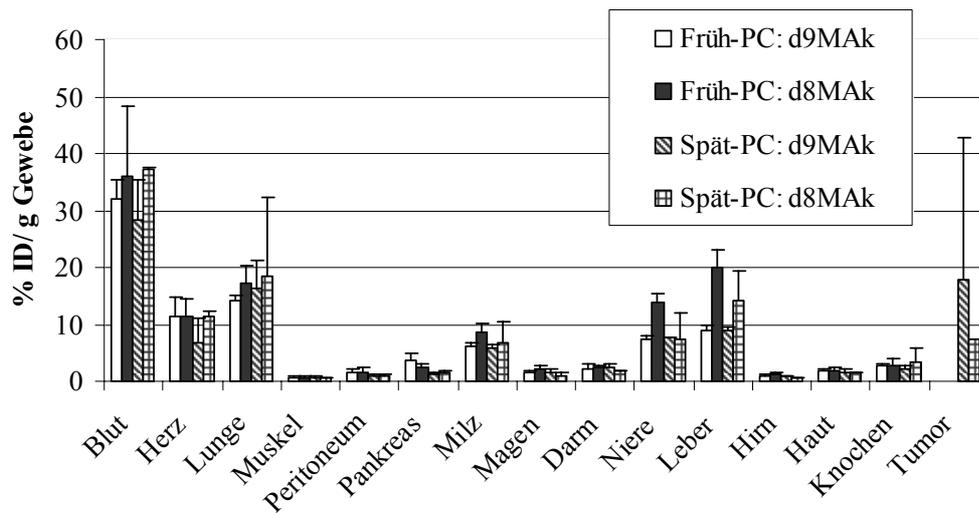
Bei früher und bei fortgeschrittener Peritonealkarzinose wurden sowohl nach  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Applikation als auch nach  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Applikation die höchsten  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentrationen im Blut (28,3 % ID/g bis 37,3 % ID/g) und den gut durchbluteten

Organen Herz (6,7 % ID/g bis 11,5 % ID/g), Lunge (14,1 % ID/g bis 18,5 % ID/g), Niere (7,2 % ID/g bis 13,9 % ID/g), Milz (5,9 % ID/g bis 8,6 % ID/g) und Leber (9,0 % ID/g bis 19,9 % ID/g) gemessen (Abb. 7). Die  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentrationen der übrigen Organe betragen weniger als 5 % ID/g. Im Vergleich zur Verteilung der  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugate 1 h nach *i.p.* Applikation (Blut: 5,5 % ID/g bis 11,2 % ID/g, Herz: 1,3 % ID/g bis 2,1 % ID/g, Lunge: 2,0 % ID/g bis 14,6 % ID/g, Niere: 3,0 % ID/g bis 13,6 % ID/g, Milz: 3,0 % ID/g bis 6,9 % ID/g, Leber: 3,8 % ID/g bis 8,3 % ID/g) waren die hohen Aktivitätskonzentrationen im Blut und den gut durchbluteten Organen nach *i.v.* Applikation auf die Applikationsroute zurückzuführen.

Im frühen Stadium der Peritonealkarzinose waren die  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentrationen *i.v.* applizierter  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugate in fast allen Organen mit Ausnahme von Peritoneum und Pankreas höher als bei  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugaten. Am deutlichsten war der Verteilungsunterschied zwischen  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk und  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk in Niere und Leber. Mit 13,9 % ID/g (Niere) und 19,9 % ID/g (Leber) war die  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration der  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugate 1 h *p.i.* ca. doppelt so hoch wie bei  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugaten (Niere: 7,5 % ID/g, Leber: 9,0 % ID/g).

Im fortgeschrittenen Stadium der Peritonealkarzinose war 1 h nach *i.v.* Applikation der  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate die hohe  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration von 17,9 % ID/g im Tumorgewebe am auffälligsten. Im Vergleich dazu war die  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration *i.v.* applizierter  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugate im Tumorgewebe 7,4 % ID/g. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass nach  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Applikation nur aus einer Maus mit fortgeschrittener Peritonealkarzinose verwertbares Tumorgewebe präpariert werden konnte.

Im Blut von Mäusen mit früher oder fortgeschrittener Peritonealkarzinose war die  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration nach Applikation von  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk mit 35,9 % ID/g bzw. 37,3 % ID/g deutlich höher als bei  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Applikation (Früh-PC: 31,9 % ID/g, Spät-PC: 28,3 % ID/g). Dementsprechend war der Tumor/Blut Quotient *i.v.* applizierter  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate mit 0,7 größer als bei  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugaten mit 0,2. Aufgrund der applikationsbedingt hohen  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration im Blut wurde im Vergleich zur *i.p.* Applikation kein Tumor/Blut Quotient größer 1 erzielt, auch wenn *i.v.* applizierte  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate zu einer deutlich höheren  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration im Tumorgewebe führten als  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugate.



**Abb 7.:** Organverteilung i.v. applizierter  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk bzw.  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugate 1 h p.i. bei swiss nu/nu Nacktmäusen mit früher (Früh-PC) bzw. fortgeschrittener (Spät-PC) Peritonealkarzinose. Auch nach systemischer Applikation zeigt sich im Tumorgewebe bei fortgeschrittener Peritonealkarzinose eine deutlich stärkere Retention der  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivität nach Applikation tumorspezifischer  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate als nach Applikation nicht tumorspezifischer  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugate. Die  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration im entnommenen Tumorgewebe war 1 h p.i. bei  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk ca. doppelt so hoch als bei  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk.

#### 4.5.3 Verteilung i.p. bzw. i.v. applizierter $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate in Mäusen ohne Peritonealkarzinose

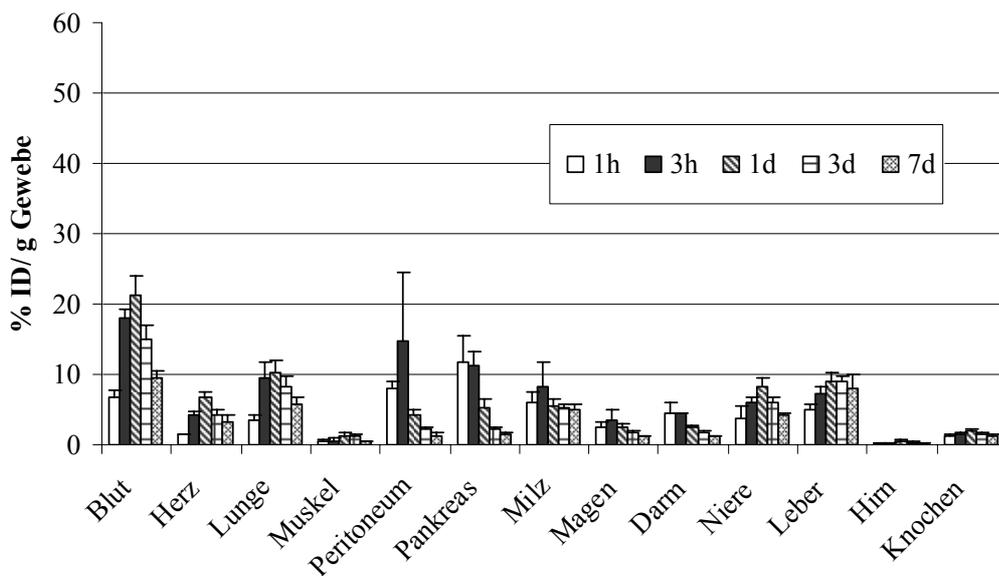
Die Untersuchung der Biodistribution an tumorfreien Balb/c Mäusen erfolgte ausschließlich mittels  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugaten, da aufgrund der fehlenden Tumorzellen von einer antikörperunabhängigen Verteilung der  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugate nach i.p. oder i.v. Applikation ausgegangen wurde.

##### 4.5.3.1 Verteilung 1 h, 3 h, 1 d, 3 d und 7 d nach i.p. Applikation

1 h nach i.p. Applikation der  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate wurden die höchsten  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivitäten in Peritoneum (7,9 % ID/g) und Pankreas (11,7 % ID/g) gemessen (Abb. 8). Die  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration im Blut war 1 h p.i. mit 6,8 % ID/g höher als in den übrigen Organen (<6 % ID/g). Auch 3 h p.i. wurden die stärksten  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration in Peritoneum (14,6 % ID/g) und Pankreas (11,3 % ID/g), aber vor allem im Blut (18,0 % ID/g) festgestellt. Parallel zur doppelt so hohen  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration im Peritoneum 3 h p.i. im Vergleich zu 1 h p.i. stieg die  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration im Blut auf das 3-fache des

1 h Wertes. Diese Zunahme der  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration im Peritoneum und im Blut war sehr wahrscheinlich auf die Resorption i.p. applizierter  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate am Peritoneum in den Blutkreislauf zurückzuführen.

Parallel zur Blutkonzentration nahm die  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration 3 d p.i. in den gut durchbluteten Organen Herz, Lunge, Milz, Niere und Leber deutlich zu und war mit Ausnahme der Milz (3 h p.i.) 1 d p.i. maximal (Blut: 21,4 % ID/g, Herz: 6,8 % ID/g, Lunge: 10,4 % ID/g, Niere: 8,2 % ID/g, Leber: 8,9 % ID/g). In Peritoneum und Pankreas war 1 d p.i. (4,2 % ID/g und 5,4 % ID/g) im Vergleich zu 3 h p.i. eine niedrige  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration feststellbar. Während in allen untersuchten Organen die  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration bis 7 d p.i. kontinuierlich abnahm, war in der Milz mit 5,6 % ID/g nach 1 d, 5,2 % ID/g nach 3 d und 5,1 % ID/g nach 7 d sowie in der Leber mit 8,9 % ID/g nach 1 d, 9,1 % ID/g nach 3 d und 8,0 % ID/g nach 7 d eine Retention der  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivität zu beobachten.

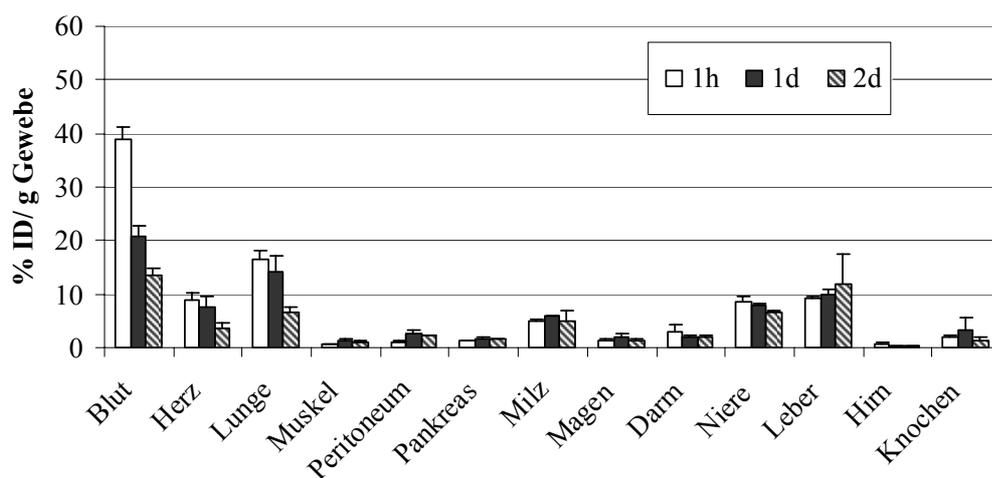


**Abb 8.: Organverteilung i.p. applizierter  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate 1 h, 3 h, 1 d, 3 d und 7 d p.i. bei Balb/c Mäusen ohne Peritonealkarzinose.** 1 d p.i. war im Blut und in den gut durchbluteten Organen Herz, Lunge, Niere und Leber die  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration am höchsten. 7 d p.i. war nur in Milz und Leber eine nahezu unveränderte  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration feststellbar, weshalb eine Retention der  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivität in diesen Organen zu vermuten war.

#### 4.5.3.2 Verteilung 1 h, 1 d und 2 d nach i.v. Applikation

Während des gesamten Verteilungszeitraums von 2 d nach i.v. Applikation der  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate wurden zu jedem Untersuchungszeitpunkt (1 h, 1 d, 2 d) die höchsten  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentrationen in Blut und den gut durchbluteten Organen Herz, Lunge, Niere, Milz und Leber festgestellt (Abb. 9). Hierbei waren die  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentrationen 1 h p.i. in Blut, Herz, Lunge und Niere am höchsten und nahmen bis 2 d p.i. kontinuierlich ab. Im Gegensatz dazu war in der Milz, wie auch schon nach i.p. Applikation, ein fast unveränderter Verlauf der  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration i.v. applizierter  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate zu ermitteln: 5,1 % ID/g nach 1 h, 5,8 % ID/g nach 1 d und 4,9 % ID/g nach 2 d. Die Leber wies 2 d p.i. als einziges Organ eine zunehmende Tendenz der  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration von 9,1 % ID/g nach 1 h auf 12,0 % ID/g nach 2 d auf.

Die  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentrationen i.v. applizierter  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate waren in den übrigen untersuchten Organen zu jedem Verteilungszeitpunkt unter 4 % ID/g.



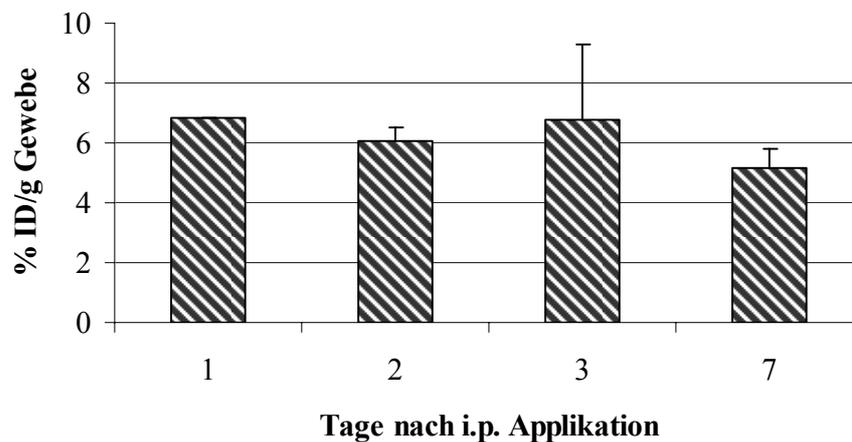
**Abb 9.:** Organverteilung i.v. applizierter  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate 1 h, 1 d und 2 d p.i. bei Balb/c Mäusen ohne Peritonealkarzinose. 1 h p.i. war im Blut die  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration deutlich am höchsten. Ähnlich der i.p. Applikation war 2 d nach systemischer Applikation von  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugaten in Milz und Leber eine Retention der  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivität zu beobachten.

#### 4.5.4 Zeitlicher Verlauf i.p. applizierter $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate im Knochenmark

Unterstützend zur Beurteilung der Ergebnisse der Toxizitätsstudien (s. 4.11) hinsichtlich einer möglichen strahlungsbedingten Schädigung des hämatopoetischen Systems wurde

die  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration i.p. applizierter  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate im roten Knochenmark von tumorfreien Balb/c Mäusen 1 d bis 7 d p.i. bestimmt (Abb. 10). 1 d p.i. war der Gewinn von rotem Knochenmark aus dem Femur nur bei einem Tier möglich.

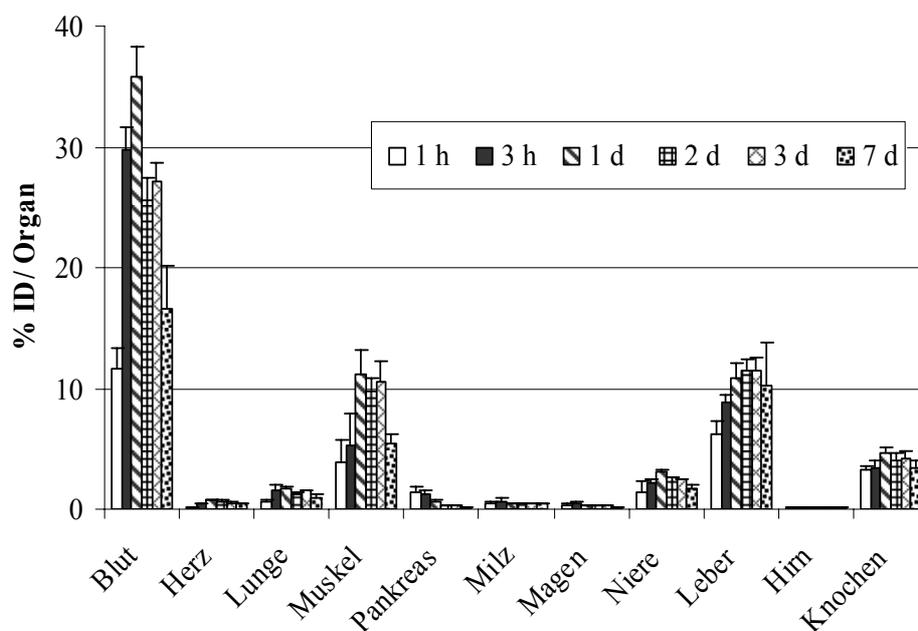
1 d p.i. bis 3 d p.i. war eine nahezu unveränderte  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration im Knochenmark festzustellen, die 1 d p.i. 6,9 % ID/g, 2 d p.i. 6,1 % ID/g und 3 d p.i. 6,8 % ID/g betrug. 7 d p.i. war die  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration mit 5,2 % ID/g nur geringfügig niedriger. Aufgrund der ermittelten Blut- und Knochenmarkskonzentrationen über 7 d nach i.p. Applikation von  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugaten erscheint eine toxische Schädigung des hämatopoetischen Systems durch im Knochenmark retinierte  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugate wahrscheinlich.



**Abb 10.:**  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration i.p. applizierter  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate im roten Knochenmark von Balb/c Mäusen ohne Peritonealkarzinose 1 d, 2 d, 3 d und 7 d p.i.. Die nahezu unveränderte  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration im Knochenmark während der ersten 3 d p.i. sowie die nur geringfügig niedriger  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration 7 d p.i. sprechen für eine Retention von  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugaten im Knochenmark.

## 4.6 Dosimetrie

Auf den Daten der Biodistribution von  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugaten an tumorfreien Mäusen basierend, wurden die absorbierten Organdosen ermittelt. Dazu wurde der prozentuale Anteil der injizierten  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivität pro Organ aus dem prozentualen Anteil der injizierten  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivität pro Gramm Gewebe unter Einbeziehung der jeweiligen Organmasse berechnet (s. 3.10.2.3). Abbildung 11 zeigt den prozentualen Anteil der injizierten  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivität pro Organ 1 h, 3 h, 1 d, 2 d, 3 d bzw. 7 d nach i.p. Applikation von  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugaten. Neben der  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration im Blut (11,6 % ID/Organ – 35,8 % ID/Organ) waren Leber (6,2 % ID/Organ – 11,5 % ID/Organ), Muskeln (3,8 % ID/Organ – 11,1 % ID/Organ), Knochen (3,2 % ID/Organ – 4,6 % ID/Organ) sowie Nieren (1,4 % ID/Organ – 5,1 % ID/Organ) die Organe, welche die höchsten  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentrationen aufwiesen.



**Abb 11.: Prozentuale Anteil der injizierten  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivität pro Organ (% ID/Organ) 1 h, 3 h, 1 d, 2 d, 3 d bzw. 7 d nach i.p. Applikation von  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugaten in tumorfreien Balb/c Mäusen.** Neben der  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration im Blut wiesen die Leber, die Muskulatur, die Knochen und die Niere die höchsten  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentrationen auf.

Die höchste absorbierte Organdosis nach i.p. Applikation von  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugaten wurde in der Leber mit 1,37 mSv/MBq und nachfolgend in der Niere mit 1,19 mSv/MBq festgestellt. Im Vergleich dazu war die Organdosis im Knochenmark mit ca.

0,079 mSv/MBq gering. Aufgrund der Vermutung von Postema et al. (2003), dass eine Retention von ungebundenem  $^{177}\text{Lu}$  in der Knochenmatrix zu einer erhöhten absorbierten Strahlendosis im Knochenmark führt, wurde die Organdosis des Knochenmarks unter Annahme eines 5% freien Anteils von  $^{177}\text{Lu}$  exemplarisch berechnet. Zur Berechnung wurde im Knochen eine Verteilung von Substantia spongiosa und Substantia corticalis von 3:1 angenommen, da das rote Knochenmark zwischen der Substantia spongiosa lokalisiert ist. Trotz der stärkeren Gewichtung der Substantia spongiosa lag die Organdosis des Knochenmarks jedoch mit ca. 0,14 mSv/MBq immer noch deutlich unter den Organdosen von Leber und Niere.

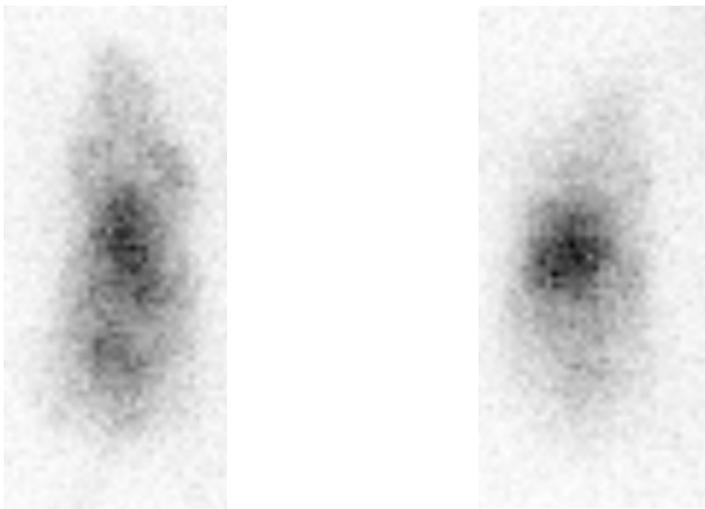
Organ	Organdosis (mSv/MBq)
Leber	1,37
Niere	1,19
Lunge	$1,98 \times 10^{-1}$
Dünndarm	$2,03 \times 10^{-1}$
Milz	$3,63 \times 10^{-1}$
Knochen	$5,2 \times 10^{-1}$
Pankreas	$6,56 \times 10^{-1}$
Muskel	$5,10 \times 10^{-2}$
Rotes Knochenmark	$7,94 \times 10^{-2}$
Herzwand	$8,80 \times 10^{-2}$
Gehirn	$1,51 \times 10^{-3}$
Haut	$2,81 \times 10^{-3}$
Magen	$9,48 \times 10^{-3}$

**Tabelle 3: Absorbierte Organdosen in mSv/MBq.** Bei i.p. Applikation von  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugaten ist die Leber gefolgt von der Niere das Organ mit der höchsten Strahlendosis.

#### 4.7 Darstellung i.p. applizierter $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugate mittels Szintigraphie

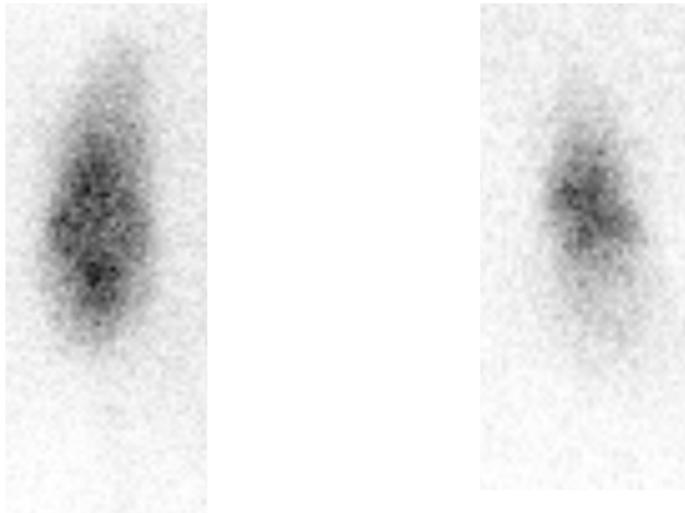
Mittels der Szintigraphie wurde die Verteilung i.p. applizierter  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate bzw.  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugate in Mäusen mit fortgeschrittener Peritonealkarzinose 1 d p.i. (Abb. 12) bzw. 2 d p.i. (Abb. 13) dargestellt. Anschließend wurden diese Tiere euthanisiert und das Abdomen eröffnet, um die tatsächliche i.p. Tumorlokalisation mit den Szintigraphieaufnahmen zu vergleichen. Außerdem wurde die Verteilung von  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugaten in tumorfreien Mäusen 2 d nach i.p. Applikation bzw. 2 d nach i.v. Applikation miteinander verglichen (Abb. 14).

Bei Mäusen mit fortgeschrittener Peritonealkarzinose war 1 d nach i.p. Applikation spezifischer  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate (Abb. 12, links) eine Aktivitätsretention im Bereich des Oberbauchs bzw. Zwerchfells, im linken Mittelbauch sowie im mittleren Unterbauch zu beobachten. Zum gleichen Zeitpunkt war nach i.p.  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Applikation (Abb. 12, rechts) eine höhere Aktivität nur im Bereich des Thorax festzustellen, das Abdomen stellte sich hierbei unauffällig dar. Eine i.p. Aktivitätsretention lag daher nach i.p. Applikation von  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugaten nicht vor.



**Abb 12.:** Szintigraphische Darstellung von swiss nu/nu Nacktmäusen mit fortgeschrittener Peritonealkarzinose 1 d nach i.p. Applikation von  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk (links) und  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk (rechts). Links: Auffällige Aktivitätsretention im Bereich des gesamten Abdomen, vor allem im linken Mittelbauch sowie mittleren Unterbauch. Rechts: Hohe Aktivitätskonzentration im Bereich der blutreichen Thoraxorgane Lunge und Herz. Eine abdominale Aktivitätsretention ist nicht sichtbar.

2 d nach i.p.  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  Applikation zeigte sich bei Mäusen mit fortgeschrittener Peritonealkarzinose (Abb. 13, links) ebenfalls eine Aktivitätsretention in den bereits 1 d p.i. beschriebenen Bereichen sowie eine generell höhere Aktivität im gesamten Abdomen. Dagegen wiesen Mäuse mit fortgeschrittener Peritonealkarzinose 2 d nach i.p.  $^{177}\text{Lu-d8MAk}$  Applikation (Abb. 13, rechts) keinen Unterschied im Vergleich zur Verteilung 1 d p.i. auf.

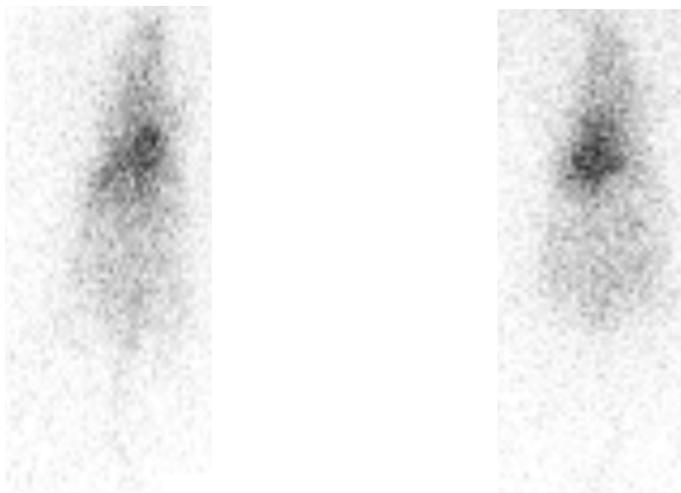


**Abb 13.:** Szintigraphische Darstellung von swiss nu/nu Nacktmäusen mit fortgeschrittener Peritonealkarzinose 2 d nach i.p. Applikation von  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  (links) und  $^{177}\text{Lu-d8MAk}$  (rechts). Links: Im Vergleich zu 1 d p.i. ebenfalls deutliche Aktivitätsretention im Bereich des gesamten Abdomen. Rechts: Im Vergleich zu 1 d p.i. unveränderte Aktivitätsverteilung im Bereich des Thorax.

Die Obduktion der untersuchten Mäuse mit fortgeschrittener Peritonealkarzinose verifizierte die szintigraphisch dargestellte Retention i.p. applizierter spezifischer  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  Konjugate im Abdomen. In allen Mäusen konnte eine diffuse Peritonealkarzinose mit Tumorplaques unter beiden Zwerchfellschenkeln sowie Tumorknötchen im Mesenterium makroskopisch nachgewiesen werden. Das szintigraphische Bild einer i.p. Tumormanifestation zeigte sich entsprechend der Tumorlokalisation jedoch nur nach i.p. Applikation von  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  Konjugaten sowohl 1 d p.i. als auch 2 d p.i.. Die Aktivitätsretention im Bereich des mittleren Unterbauchs 1 d bzw. 2 d nach i.p.  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  Applikation dürfte dabei sehr wahrscheinlich den im Mesenterium lokalisierten Tumorknötchen entsprochen haben.

Derartig lokalisierte Aktivitätsverteilungen waren nach i.p.  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Applikationen nicht zu beobachten, weshalb eine tumorassoziierten Retention der spezifischen  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate angenommen werden konnte.

In tumorfreien Mäusen wurde 2 d p.i. sowohl nach i.p. Applikation (Abb. 14, links) als auch nach i.v. Applikation (Abb. 14, rechts) von  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugaten die Aktivität nur im Bereich der blutreichen Organe des Thorax festgestellt. Damit stimmte dieses Ergebnis weitgehend mit der Aktivitätsverteilung i.p. applizierter nicht spezifischer  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugate 2 d p.i. in Mäusen mit fortgeschrittener Peritonealkarzinose überein und bestätigt die tumorspezifische Retention der  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate.

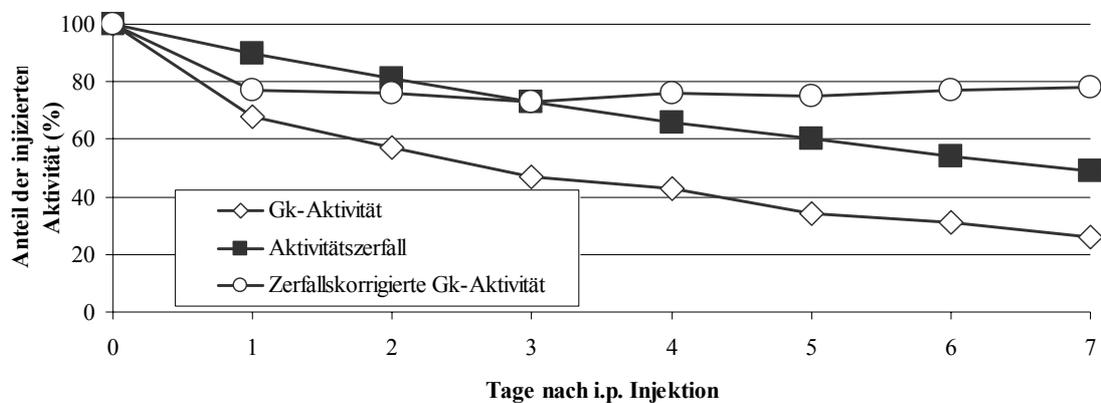


**Abb 14.:** Szintigraphieaufnahmen von tumorfreien Balb/c Mäusen 2 d nach i.p. (links) bzw. i.v. (rechts) Applikation von  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugaten. Bei fehlender i.p. Tumormanifestation zeigen beide Applikationsrouten eine ähnliche Aktivitätsverteilung, vor allem im Bereich der blutreichen Thoraxorgane.

#### 4.8 Ganzkörperretention von $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugaten

Die Bestimmung der Ganzkörperretention i.p. applizierter  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate erfolgte an tumorfreien swiss nu/nu Nacktmäusen (n=8) über einen Zeitraum von 7 d und diente der Untersuchung der biologischen HWZ der  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugate. Abbildung 15 stellt den Verlauf der täglich gemessenen Ganzkörperaktivität ohne und mit Zerfallskorrektur sowie den Verlauf des radioaktiven Zerfalls der injizierten  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Aktivität dar. Ohne Zerfallskorrektur zeigte sich hierbei eine kontinuierliche

Abnahme der Ganzkörperaktivität, die nahezu parallel zum radioaktiven Zerfall der injizierten  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivität verlief. Nach der Zerfallskorrektur der Ganzkörperaktivität war nach einem anfänglichen Abfall um ca. 20% 1 d p.i. ein nahezu unveränderter Verlauf der injizierten  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivität, d.h. eine Aktivitätsretention, im Körper der Tiere feststellbar. Da die Biodistribution i.p. applizierter  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate an tumorfreien Mäusen nach dem 1. bis 7. Tag p.i. in keinem Organ mit Ausnahme von Milz und Leber eine Retention der  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivität zeigte, könnte die in der Ganzkörperuntersuchung vom 1. bis 7. Tag p.i. beobachtete Aktivitätsretention vermutlich Ausdruck der Retention von  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugaten in der Milz bzw. in der Leber gewesen sein.



**Abb 15.:** Verlauf der Ganzkörperaktivität ohne und mit Zerfallskorrektur nach i.p. Applikation von  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugaten in tumorfreien swiss nu/nu Nacktmäusen über 7 d p.i. Zudem ist der Verlauf des radioaktiven Zerfalls der injizierten  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivität dargestellt. Während die nicht zerfallskorrigierte Ganzkörperaktivität (Gk-Aktivität) über 7 d p.i. kontinuierlich abnahm, konnte nach der Zerfallskorrektur eine deutliche Retention der injizierten  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivität gezeigt werden.

## 4.9 Therapiestudien I

Die Therapiestudien wurden an swiss nu/nu Nacktmäusen 1 d und 8 d nach i.p. Inokulation von  $1 \times 10^7$  HSC45-M2 Zellen mit 0,37 MBq, 1,85 MBq, 7,4 MBq und 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk bzw.  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk durchgeführt. Pro Gruppe wurden 10 Tiere therapiert. Die Kontrollgruppe umfasste 14 Tiere. Insgesamt wurden 3 Tiere nicht in die Bewertung aufgenommen. Je eine Maus der Therapiegruppen 1,85 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk 1 d und 8 d nach Tumorzellinokulation aufgrund s.c. Tumoren im Bereich der

Injektionsstelle sowie eine Maus der Gruppe 0,37 MBq  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$ , 1 d nach Tumorzellinokulation, aufgrund intraluminale Zelinjektion in den Darm.

Die Bewertung der Therapiestudien erfolgte in der vorliegenden Arbeit anhand der medianen Überlebenszeiten. Für die Vergleichbarkeit mit anderen in der Literatur beschriebenen Therapiestudien wurde in Tabelle 2 und 3 zusätzlich zum Median der Mittelwert und die dazugehörigen Wertebereiche aufgeführt. Überlebten bis zum Ende des Beobachtungszeitraums (250 d) mehr als 50% der Tiere einer Gruppe, wie z. B. bei Therapiegruppe 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  1 d nach Tumorzellinokulation, konnte keine mediane Überlebenszeit angegeben werden. Mittels des Log-Rank-Tests wurden die 16 Therapiegruppen und die Kontrollgruppe auf folgende Fragestellung hinsichtlich ihrer statistischen Signifikanz geprüft:

- a) Welche Therapiegruppen wiesen einen Therapieeffekt gegenüber untherapierten Kontrolltieren auf?
- b) Welches  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugat ( $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  bzw.  $^{177}\text{Lu-d8MAk}$ ) ist hinsichtlich des Therapieerfolgs effektiver?
- c) Bei welcher  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivität war der Therapieerfolg optimal?
- d) Besteht eine Abhängigkeit zwischen dem Applikationszeitpunkt (1 d oder 8 d) und der therapeutischer Effizienz?

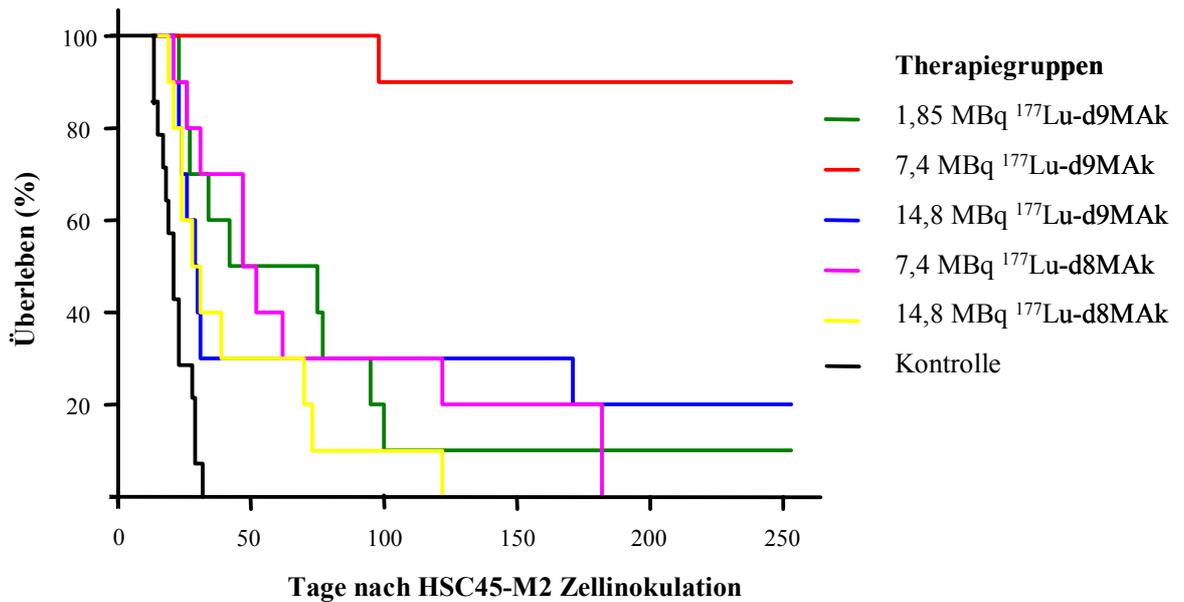
Ad a) Das mediane Überleben der unbehandelten Kontrollgruppe betrug 21 d (Abb. 16 und 17). Alle mit 0,37 MBq behandelten Tiere, unabhängig vom Antikörper oder Therapiezeitpunkt nach Tumorzellinokulation, und alle mit 1,85 MBq  $^{177}\text{Lu-d8MAk}$  1 d bzw. 8 d nach Tumorzellinokulation behandelten Tiere zeigten hinsichtlich der Überlebenswahrscheinlichkeiten keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle. Deshalb wurden diese Therapiegruppen in der folgenden Bewertung nicht berücksichtigt. Bei den übrigen Gruppen (1,85 MBq, 7,4 MBq und 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  sowie 7,4 MBq und 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu-d8MAk}$ ) konnte dagegen 1 d (Tab. 4) bzw. 8 d (Tab. 5) nach Tumorzellinokulation ein signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle ermittelt werden. Ein Therapieeffekt war somit sowohl bei i.p. Applikation spezifischer als auch unspezifischer  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugate feststellbar.

Therapie- bzw. Kontrollgruppe	Mediane Überlebenszeit (d)	95 % Konfidenzintervall (d)	Mittlere Überlebenszeit (d)	95 % Konfidenzintervall (d)	p-Wert
Kontrolle	21	17-25	22	18-25	-
0,37 MBq <sup>177</sup> Lu-d9MAk	19	15-23	20	16-23	0,5318
1,85 MBq <sup>177</sup> Lu-d9MAk	42	0-106	73	36-110	0,0002
7,4 MBq <sup>177</sup> Lu-d9MAk	-	-	238	209-266	0,00001
14,8 MBq <sup>177</sup> Lu-d9MAk	29	23-35	86	28-144	0,0083
0,37 MBq <sup>177</sup> Lu-d8MAk	15	11-19	24	16-32	0,4766
1,85 MBq <sup>177</sup> Lu-d8MAk	20	17-23	22	15-30	0,8132
7,4 MBq <sup>177</sup> Lu-d8MAk	47	25-69	77	39-116	0,0001
14,8 MBq <sup>177</sup> Lu-d8MAk	28	17-39	45	24-66	0,0086

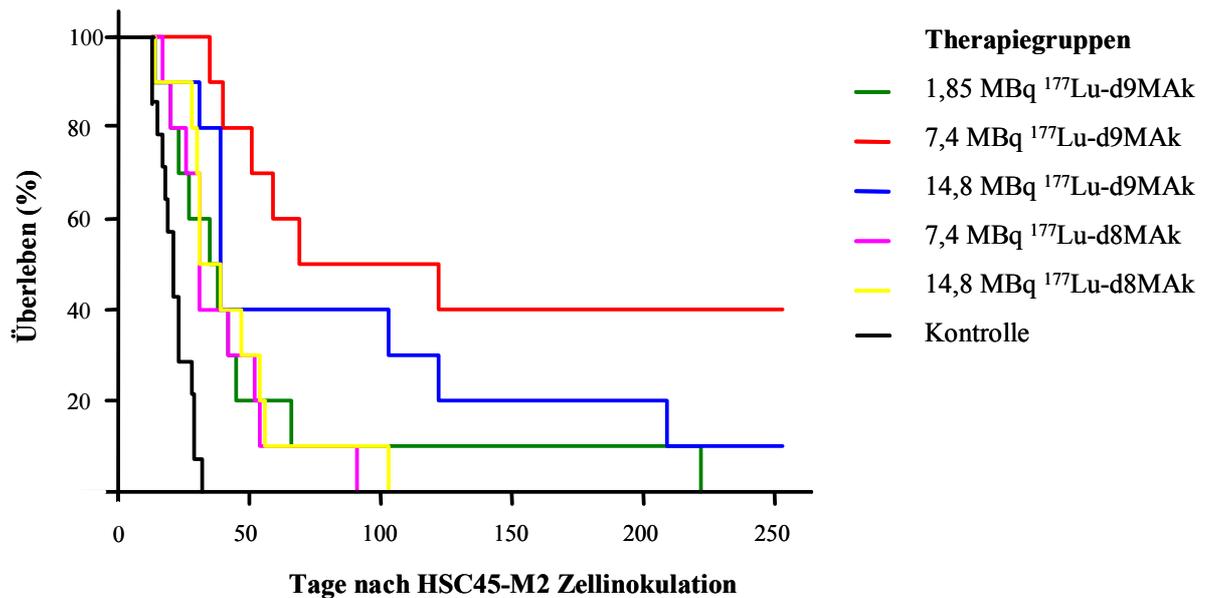
**Tabelle 4: Mediane bzw. mittlere Überlebenszeiten der Therapiegruppen 1 d nach i.p. Inokulation von HSC45-M2 Zellen im Vergleich zur untherapierten Kontrollgruppe.** Mit Ausnahme von 0,37 MBq <sup>177</sup>Lu-d9MAk sowie 0,37 MBq bzw. 1,85 MBq <sup>177</sup>Lu-d8MAk resultierte die i.p. Applikation der <sup>177</sup>Lu-Immunkonjugate in einer signifikanten Überlebensverlängerung (p<0,05).

Therapie- bzw. Kontrollgruppe	Mediane Überlebenszeit (d)	95% Konfidenzintervall (d)	Mittlere Überlebenszeit (d)	95% Konfidenzintervall (d)	p-Wert
Kontrolle	21	17-25	22	18-25	-
0,37 MBq <sup>177</sup> Lu-d9MAk	16	11-21	23	14-32	0,9599
1,85 MBq <sup>177</sup> Lu-d9MAk	35	18-52	53	17-89	0,0038
7,4 MBq <sup>177</sup> Lu-d9MAk	69	0-167	139	79-198	0,00001
14,8 MBq <sup>177</sup> Lu-d9MAk	39	33-45	89	40-137	0,0001
0,37 MBq <sup>177</sup> Lu-d8MAk	16	10-22	30	15-45	0,3976
1,85 MBq <sup>177</sup> Lu-d8MAk	19	10-28	27	13-41	0,5015
7,4 MBq <sup>177</sup> Lu-d8MAk	31	26-36	40	26-53	0,0029
14,8 MBq <sup>177</sup> Lu-d8MAk	31	22-40	43	28-59	0,0006

**Tabelle 5: Mediane bzw. mittlere Überlebenszeiten der Therapiegruppen 8 d nach i.p. Inokulation von HSC45-M2 Zellen im Vergleich zur untherapierten Kontrollgruppe.** Mit Ausnahme von 0,37 MBq <sup>177</sup>Lu-d9MAk sowie 0,37 MBq bzw. 1,85 MBq <sup>177</sup>Lu-d8MAk resultierte die i.p. Applikation der <sup>177</sup>Lu-Immunkonjugate in einer signifikanten Überlebensverlängerung (p<0,05).



**Abb 16.:** Kaplan-Maier-Überlebenskurven der untherapierten Kontrollgruppe sowie der Therapiegruppen 1 d nach Tumorzellinokulation. 6 Wochen alten swiss nu/nu Nacktmäusen wurden 1 d nach Inokulation von  $1 \times 10^7$  HSC45-M2 Zellen 1,85 MBq, 7,4 MBq bzw. 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  bzw. 7,4 MBq bzw. 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu-d8MAk}$  i.p. appliziert. Die mit 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  i.p. therapierten Tiere überlebten signifikant länger gegenüber den Kontrolltieren sowie den übrigen therapierten Tieren.



**Abb 17.:** Kaplan-Maier-Überlebenskurven der untherapierten Kontrollgruppe sowie der Therapiegruppen 8 d nach Tumorzellinokulation. 6 Wochen alten swiss nu/nu Nacktmäusen wurden 8 d nach Inokulation von  $1 \times 10^7$  HSC45-M2 Zellen 1,85 MBq, 7,4 MBq bzw. 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  oder 7,4 MBq bzw. 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu-d8MAk}$  i.p. appliziert. Die mit 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  i.p. therapierten Tiere überlebten signifikant länger gegenüber den Kontrolltieren sowie den übrigen therapierten Tieren (Ausnahme: 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$ ).

Ad b) Bei Therapie 1 d nach Zellinokulation waren bei  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivitäten von 1,85 MBq und 7,4 MBq die mit  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  therapierten Gruppen denjenigen mit  $^{177}\text{Lu-d8MAk}$  signifikant überlegen ( $p=0,0018$ ;  $p=0,00001$ ). Dagegen war bei 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu}$  kein signifikanter Unterschied zwischen spezifischem bzw. unspezifischem Antikörper hinsichtlich der therapeutischen Effizienz erkennbar ( $p=0,3575$ ). Eine signifikant bessere therapeutische Effizienz von  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  Konjugaten vs.  $^{177}\text{Lu-d8MAk}$  Konjugaten konnte bei Therapie am Tag 8 nach Zellinjektion nur bei Applikation von 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu}$  festgestellt werden ( $p=0,0026$ ). Die mit 1,85 MBq bzw. 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu}$  therapierten Gruppen unterschieden sich hinsichtlich d9MAk bzw. d8MAk nicht signifikant im Überleben ( $p=0,1543$ ;  $p=0,0875$ ).

Insgesamt erwies sich die i.p. Therapie mit spezifischen  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  Konjugaten sowohl 1 d als auch 8 d nach Tumorzellinokulation als die effizientere Therapie im Vergleich zu nicht spezifischen  $^{177}\text{Lu-d8MAk}$  Konjugaten.

Ad c) Zur Ermittlung der optimalen  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivität für die Therapie, wurden die Gruppen 1,85 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk vs. 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk, 1,85 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk vs. 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk, 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk vs. 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk sowie 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk vs. 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk an Tag 1 bzw. an Tag 8 nach Tumorzellinokulation verglichen.

1 d nach Tumorzellinokulation war die i.p. Applikation von 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk sowohl der i.p. Applikation von 1,85 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk ( $p=0,0001$ ) als auch der i.p. Applikation von 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk ( $p=0,0009$ ) hochsignifikant überlegen. Bei Applikation von 1,85 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk vs. 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk konnte hinsichtlich des Überlebens kein signifikanter Unterschied ermittelt werden ( $p=0,9005$ ). Ebenso wurde bei i.p. Applikation von 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk vs. 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk 1 d nach Tumorzellinokulation kein signifikanter Unterschied im Überleben ermittelt ( $p=0,1511$ ).

8 d nach Tumorzellinokulation zeigten nur die mit 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk vs. 1,85 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk therapierten Gruppen einen signifikanten Unterschied im Überleben ( $p=0,0174$ ), wobei die mit 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk therapierten Mäuse im Median deutlich länger überlebten als die mit 1,85 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk therapierten Mäuse (69 d vs. 35 d). Die Applikation von 1,85 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk vs. 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk ( $p=0,3048$ ), 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk vs. 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk ( $p=0,1296$ ) sowie 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk vs. 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk ( $p=0,5932$ ) ergab dagegen kein signifikantes Ergebnis bezüglich des Überlebens. Insgesamt erwies sich die i.p. Applikation 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu}$  als die optimale Aktivität für die lokoregionale RIT der frühen bzw. fortgeschrittenen Peritonealkarzinose mit  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugaten im Mausmodell.

Ad d) Zur Untersuchung des optimalen Therapiezeitpunktes wurden die entsprechenden Gruppen (1,85 MBq, 7,4 MBq und 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk bzw.  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk), die an Tag 1 bzw. Tag 8 nach Tumorzellinokulation i.p. therapiert wurden miteinander verglichen. Dabei wies nur die am 1. Tag nach Tumorzellinokulation mit 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk therapierte Gruppe eine signifikante Überlebensverlängerung gegenüber der am 8. Tag nach Tumorzellinokulation therapierten Gruppe auf ( $p=0,0164$ ). Bei allen anderen Gruppen war hinsichtlich des Applikationszeitpunktes kein signifikanter Unterschied im Überleben festzustellen. Eine Abhängigkeit der therapeutischen Effizienz spezifischer  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate vom Therapiezeitpunkt

nach Tumorzellinokulation zeigte sich somit in einem Fall (7,4 MBq  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$ ) zugunsten des früheren Injektionszeitpunktes.

Am Ende des Beobachtungszeitraums (250 d) lebten insgesamt noch 17 Mäuse aus 5 Gruppen mit sehr gutem Allgemein- und Ernährungszustand (s. Tab. 6). Zum Ausschluss eines latenten i.p. Tumorwachstums wurden diese Tiere getötet und obduziert. Die Obduktion ergab, dass alle Tiere makroskopisch tumorfrei waren. Auch die therapierten sowie untherapierten Tiere, die vor Ende des Beobachtungszeitraums starben oder euthanisiert wurden, wurden unmittelbar nach dem jeweiligen Todeszeitpunkt obduziert. Dabei war bei allen Tieren, denen 1 d nach Tumorzellinokulation 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  i.p. appliziert wurde, und bei einem Tier, dem 1 d nach Tumorzellinokulation 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu-d8MAk}$  i.p. appliziert wurde, keine Peritonealkarzinose makroskopisch feststellbar. Alle anderen Tiere wiesen ausgeprägtes i.p. Tumorwachstum auf.

Therapiegruppe	Tag der Therapie nach Tumorzellinokulation	Anzahl der überlebten Tiere von n=10
1,85 MBq $^{177}\text{Lu-d9MAk}$	1	1
7,4 MBq $^{177}\text{Lu-d9MAk}$	1	9
14,8 MBq $^{177}\text{Lu-d9MAk}$	1	2
7,4 MBq $^{177}\text{Lu-d9MAk}$	8	4
14,8 MBq $^{177}\text{Lu-d9MAk}$	8	1

**Tabelle 6: Anzahl der therapierten Tiere, die am Ende des Beobachtungszeitraums 250 d p.i. lebten.** Die lokoregionale Therapie mit 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  1 d nach i.p. Inokulation von HSC45-M2 Zellen resultierte in der höchsten therapeutischen Effizienz, wobei 9 von 10 Mäusen tumorfrei 250 d überlebten.

## 4.10 Therapiestudie II

Zur Validitätsprüfung eines Teils der Ergebnisse aus Therapiestudie I wurden Nacktmäusen (n=10)  $1 \times 10^7$  HSC45-M2 Zellen der gleichen Zellpassage i.p. inokuliert. Nach 1 d erfolgte die i.p. Applikation von 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  bzw.  $^{177}\text{Lu-d8MAk}$ . Die unbehandelte Kontrollgruppe umfasste 5 Tiere. Die Analyse der Überlebenszeiten erfolgte unter den folgenden zwei Fragestellungen:

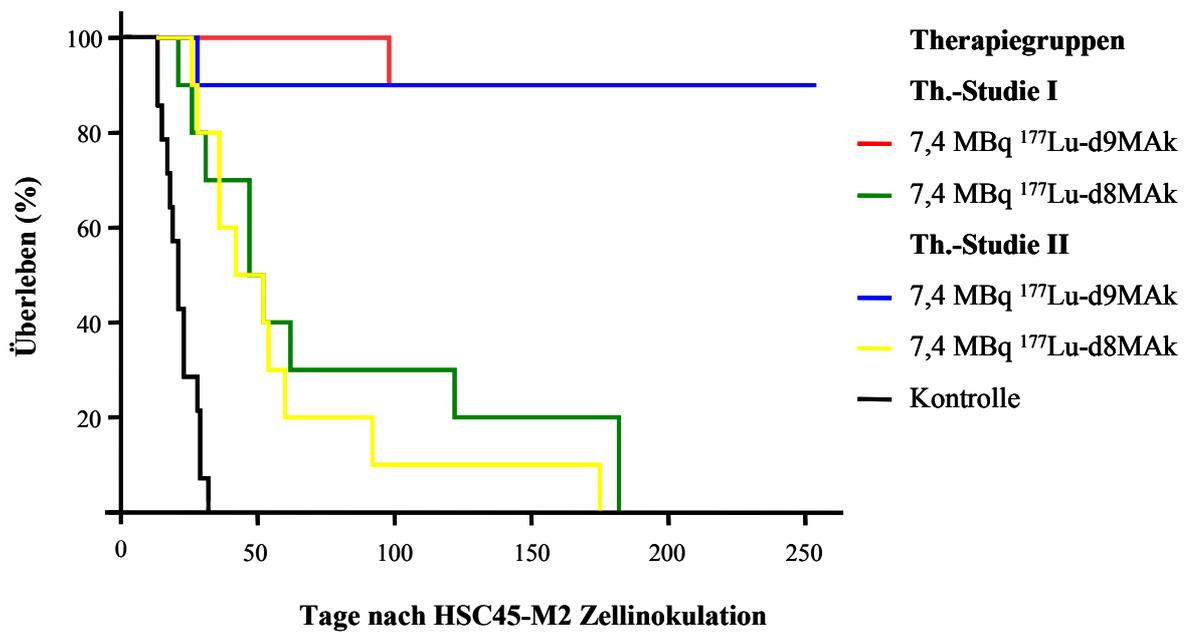
- a) Kann der Therapieeffekt der i.p. Applikation von 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  gegenüber der Kontrolle aus Therapiestudie I in Therapiestudie II bestätigt werden?
- b) Kann die signifikant bessere therapeutische Effizienz von 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  gegenüber 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu-d8MAk}$  aus Therapiestudie I in Therapiestudie II bestätigt werden?
- c) Kann ein signifikanter Unterschied zwischen den Therapiegruppen aus Therapiestudie I und II festgestellt werden?

Für die Untersuchung der Überlebenswahrscheinlichkeiten wurden alle Kontrolltiere aus Studie I und II zusammengefasst.

Ad a) Im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren (Abb. 18) wurde auch in Therapiestudie II eine signifikante Überlebensverlängerung der mit 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  therapierten Tiere festgestellt ( $p=0,00001$ ), ebenso wie nach i.p. Applikation unspezifischer  $^{177}\text{Lu-d8MAk}$  Konjugate ( $p=0,00001$ ).

Ad b) Die mit  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  i.p. therapierten Tiere überlebten signifikant länger als die mit  $^{177}\text{Lu-d8MAk}$  i.p. therapierten Tiere ( $p=0,002$ ), weshalb in Therapiestudie II die bessere therapeutische Effizienz der tumorspezifischen  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  Konjugate gegenüber den nicht tumorspezifischen  $^{177}\text{Lu-d8MAk}$  Konjugaten ebenfalls gezeigt wurde.

Ad c) Der Vergleich von mit 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  bzw. 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu-d8MAk}$  i.p. therapierten Tieren aus Therapiestudie I mit denen aus Therapiestudie II ergab keinen signifikanten Unterschied ( $p=0,970$ ;  $p=0,666$ ). Ein zufälliges Überleben von mit 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  i.p. therapierten Tieren 1 d nach Tumorzellinokulation kann somit ausgeschlossen werden.



**Abb 18.: Kaplan-Maier-Überlebenskurven.** Vergleich der Therapiegruppen 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  bzw. 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu-d8MAk}$  1 d nach Tumorzellinokulation der Therapiestudie I (Th.-Studie I) mit denen der Therapiestudie II (Th.-Studie II). Die i.p. Applikation von 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  führte in 2 unabhängigen Therapiestudien zu einem signifikant längeren Überleben der Tiere als die i.p. Applikation von 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu-d8MAk}$ .

## 4.11 Toxizitätsstudien

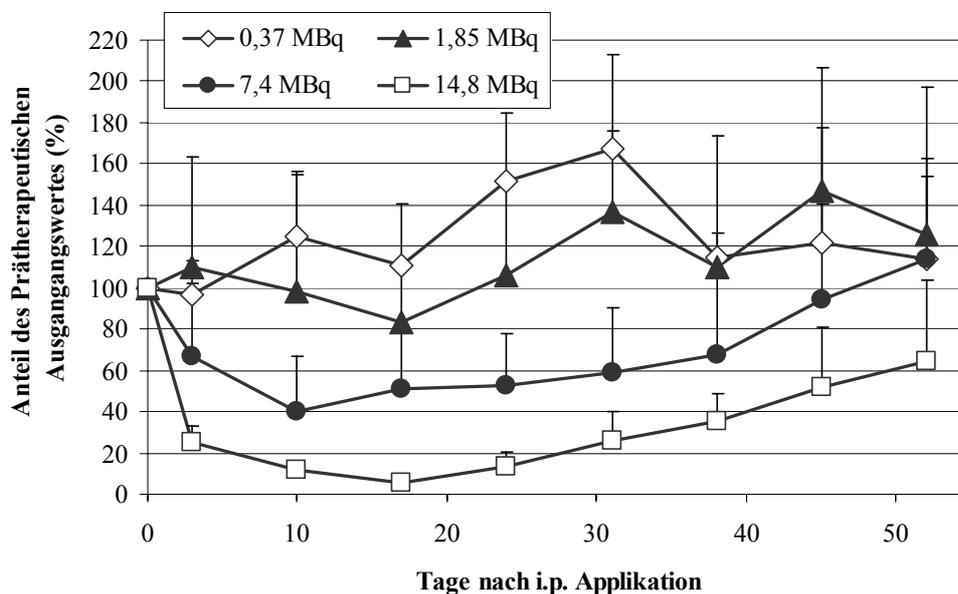
### 4.11.1 Verlauf der weißen Blutkörperchen

Die Bestimmung der Leukozyten im Blut weiblicher swiss nu/nu Mäuse nach i.p. Applikation von  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  Konjugaten erfolgte unter exakt gleichen Bedingungen wie bei Huber (2003). Daher wurde in dieser Studie auf Kontrolltiere, denen keine RIK appliziert wurden, verzichtet. Im Blut untherapierter Mäuse stiegen die Leukozyten kontinuierlich bis zum 50. Tag auf 143% des Ausgangswertes an (Huber, 2003).

Die Darstellung der Leukozytenverläufe (Abb. 19), bezogen auf den prätherapeutischen Ausgangswert (100%), zeigt eindeutig die Abhängigkeit der Leukozytenzahlen von der applizierten  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivität (0,37 MBq, 1,85 MBq, 7,4 MBq und 14,8 MBq). Während die Applikation von 0,37 MBq  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  keinen signifikanten Abfall der Leukozyten unter 100% bewirkte, fielen sie bei den übrigen  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivitäten innerhalb der ersten 20 d unterschiedlich stark ab. Bei 1,85 MBq  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  wurde mit 18% des prätherapeutischen Ausgangswerts der geringste Abfall 17 d nach Applikation

festgestellt. Die Applikation von 7,4 MBq bzw. 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk hatte dagegen schon am 3. Tag p.i. einen deutlichen Abfall der Leukozyten auf 67% bzw. 25% zur Folge. Dabei wurden die niedrigsten Leukozytenzahlen bei 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu}$  mit 40% am Tag 10 und bei 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu}$  mit 6% am Tag 17 p.i. ermittelt.

Die anschließende Regeneration spiegelte sich in ansteigenden Leukozytenzahlen wider. Je nach applizierter  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivität erholten sich die weißen Blutkörperchen unterschiedlich schnell. Bei 1,85 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk konnte eine schnelle Regeneration innerhalb 1 Woche auf den prätherapeutischen Ausgangswert beobachtet werden. Danach war ein ähnlicher Verlauf wie bei unbehandelten Mäusen (s. o.) feststellbar. Bei 7,4 MBq bzw. 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk erholten sich die Leukozyten dagegen nur langsam. Der prätherapeutische Ausgangswert wurde entsprechend einer vollständigen Regeneration 50 d p.i. bei Applikation von 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk mit 114% des Ausgangswertes erreicht. Bei 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk war dagegen nur eine sehr zögerliche Regeneration auf 64% des Ausgangswertes am Ende des Untersuchungszeitraums zu ermitteln.

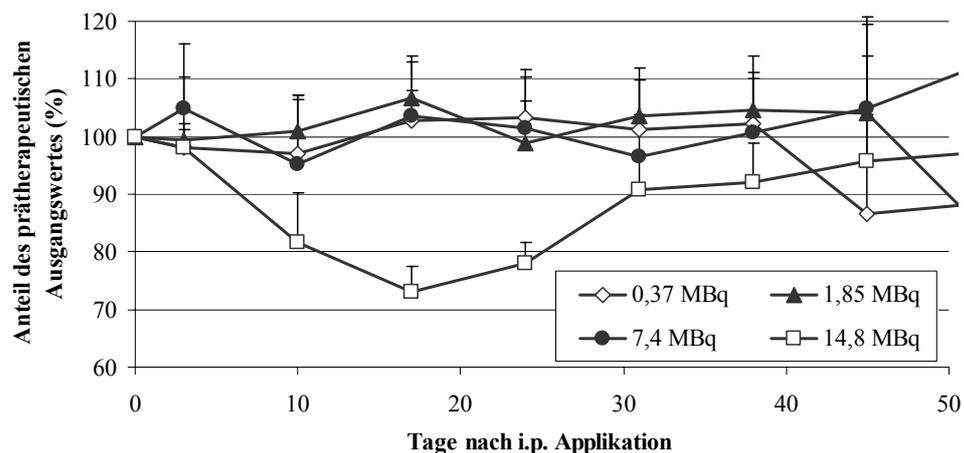


**Abb 19.:** Verlauf der Leukozyten im peripheren Blut. Nach i.p. Applikation von 0,37 MBq, 1,85 MBq, 7,4 MBq und 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk wurden bei tumorfreien, weiblichen swiss nu/nu Mäusen die Leukozyten im Blutbild über 52 Tage bestimmt. Bei 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk wurden die niedrigsten Leukozytenwerte sowie eine deutlich protrahierte Regeneration der Leukozyten festgestellt.

#### 4.11.2 Verlauf der roten Blutkörperchen

Die Darstellung der Erythrozytenverläufe (Abb. 20) bezogen auf den prätherapeutischen Ausgangswert (100%) zeigt, dass nur die i.p. Applikation von 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk einen signifikanten Abfall der roten Blutkörperchen bewirkte. Hierbei fielen die Werte nach 3 d p.i. bis 10 d p.i. um 19% und erreichten den niedrigsten Wert von 73% 17 d p.i. Danach war ein allmählicher Anstieg der Erythrozyten feststellbar. Wie auch bei den Leukozyten wurde eine vollständige Regeneration bis zu 50 Tagen p.i. nicht beobachtet.

Die i.p. Applikationen der übrigen  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivitäten (0,37 MBq – 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk) wiesen dagegen keine signifikanten Veränderungen im Verlauf der roten Blutkörperchen auf.



**Abb 20.: Verlauf der Erythrozyten im peripheren Blut.** Nach i.p. Applikation von 0,37 MBq, 1,85 MBq, 7,4 MBq und 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk wurden bei tumorfreien, weiblichen swiss nu/nu Mäusen die Erythrozyten im Blutbild über 50 d bestimmt. Nur bei 14,8 MBq war ein signifikanter Abfall der Erythrozyten feststellbar.

#### 4.12 Körperliche Auffälligkeiten und histopathologische Untersuchung

Während der ersten 48 h nach i.p. Tumorzellinokulation fielen vor allem Veränderungen im Verhalten sowie in der Körperhaltung auf. Das Verhalten war geprägt durch eine Bewegungsarmut sowie eine verringerte Nahrungsaufnahme, weshalb die Tiere müde, kraftlos und exsikiert wirkten. Über 50% der Tiere zeigten innerhalb der ersten 2 d eine starke Rundrückenbildung. Insgesamt wurde die Summe

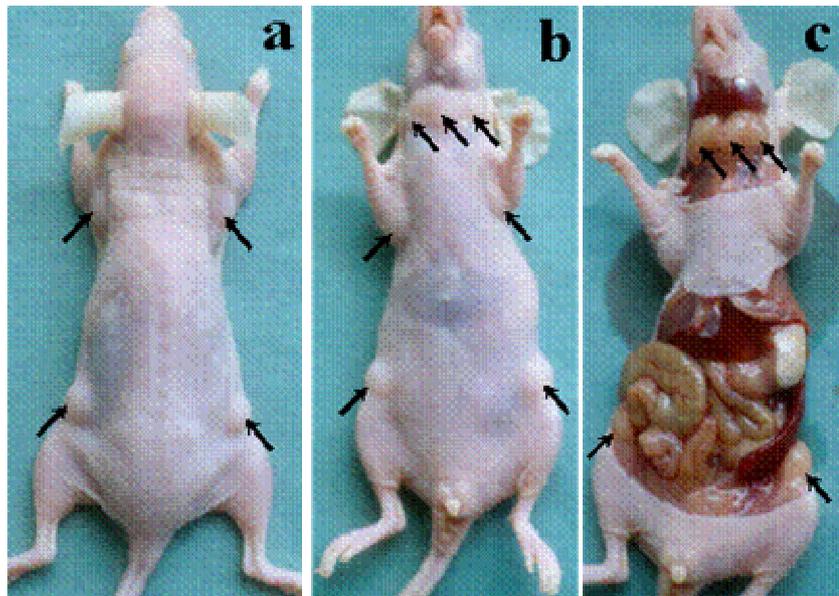
dieser Veränderungen als Symptome einer peritonealen Reizung interpretiert. Wie Huber (2003) feststellte, war der schlechte Allgemeinzustand auch mit einer Reduktion des Körpergewichts verbunden. Spätestens 2 d nach Tumorzellinokulation war eine stetige Normalisierung der beobachteten Veränderungen feststellbar.

Bei Tieren mit manifester Peritonealkarzinose waren Veränderungen im Verhalten ebenfalls festzustellen. Neben der Bewegungsarmut und der verringerter Nahrungs- bzw. Flüssigkeitsaufnahme wurde hier vor allem die Zurückgezogenheit der betroffenen Tiere vom Rest der Gruppe im Käfig beobachtet. Diese Tiere wiesen aufgrund von Aszites und/oder weit fortgeschrittenem Tumorwachstum eine massive Umfangsvermehrung des Abdomen bei gleichzeitig kachektischem Ernährungszustand auf.

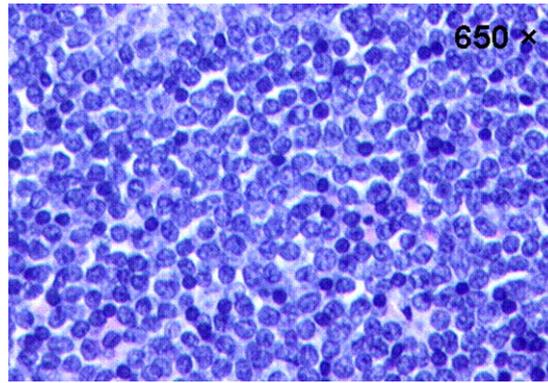
Bei Mäusen, welche mit 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  i.p. therapiert wurden, war die ausgeprägte Blässe der Haut und Schleimhäute, Konjunktiven bzw. Analschleimhaut, besonders auffallend. Ca. 1 Woche p.i. wurde diese Veränderung der Hautfarbe erstmalig festgestellt und verstärkte sich in den folgenden 2 Wochen. Während dieser Zeit wirkten die Tiere müde und sehr geschwächt. Danach war eine langsame Normalisierung der Hautfarbe sowie des Aktivitätszustands der Tiere festzustellen. Um den Verdacht auf eine strahleninduzierte Anämie zu klären, wurden die roten Blutkörperchen im peripheren Blut von Mäusen nach i.p. Applikation von 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  im Rahmen der Toxizitätsstudien untersucht.

Während des Beobachtungszeitraums der Therapiegruppen von 250 d wurde bei 2 von 65 Mäusen, denen 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  bzw.  $^{177}\text{Lu-d8MAk}$  therapeutisch oder zur Bestimmung der Toxizität i.p. appliziert wurde, und bei 6 von 45 Mäusen, denen 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  bzw.  $^{177}\text{Lu-d8MAk}$  i.p. appliziert wurde, eine auffällige Lymphknotenschwellung nach ca. 110 d p.i. beobachtet (Abb. 21). Dabei waren die zervikalen, axillären sowie inguinalen/femorale Lymphknoten deutlich sichtbar vergrößert. Parallel zur Zunahme der Lymphknotenschwellung wurde bei 4 der mit 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  behandelten Tiere und bei 1 der mit 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  behandelten Tiere eine Verschlechterung des Allgemeinzustands festgestellt. Bei erhaltener Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme äußerte sich dies vor allem durch einen zunehmend kachektischen Ernährungszustand sowie einem reduzierten Aktivitätszustand.

Zur Diagnosesicherung wurden die Lymphknoten sowie Leber, Milz, Nieren und das Gehirn unmittelbar nach dem Tod entnommen und histopathologisch untersucht. Das Ergebnis zeigte, dass die Organe bei 4 der 5 Mäuse mit reduziertem Allgemeinzustand eine massive diffuse Infiltration mit einförmigen, neoplastischen Zellpopulationen aufwiesen. Die mittelgroßen Zellen waren charakterisiert durch ein blastenartiges Chromatin, einen unauffälligen Nukleolus und einem spärlichen Zytoplasma (Abb. 22). Diese Morphologie ist typisch für ein lymphoblastisches Lymphom, eine maligne Erkrankung des lymphatischen Systems, ausgehend von den frühesten Vorläuferzellen der B- und/oder T-Zellen des Knochenmarks bzw. des Thymus (Schaefer et al., 2004). Insbesondere die Blasteninfiltration des zentralen Nervensystems ist ein charakteristisches Merkmal dieser Erkrankung (Schaefer et al., 2004).

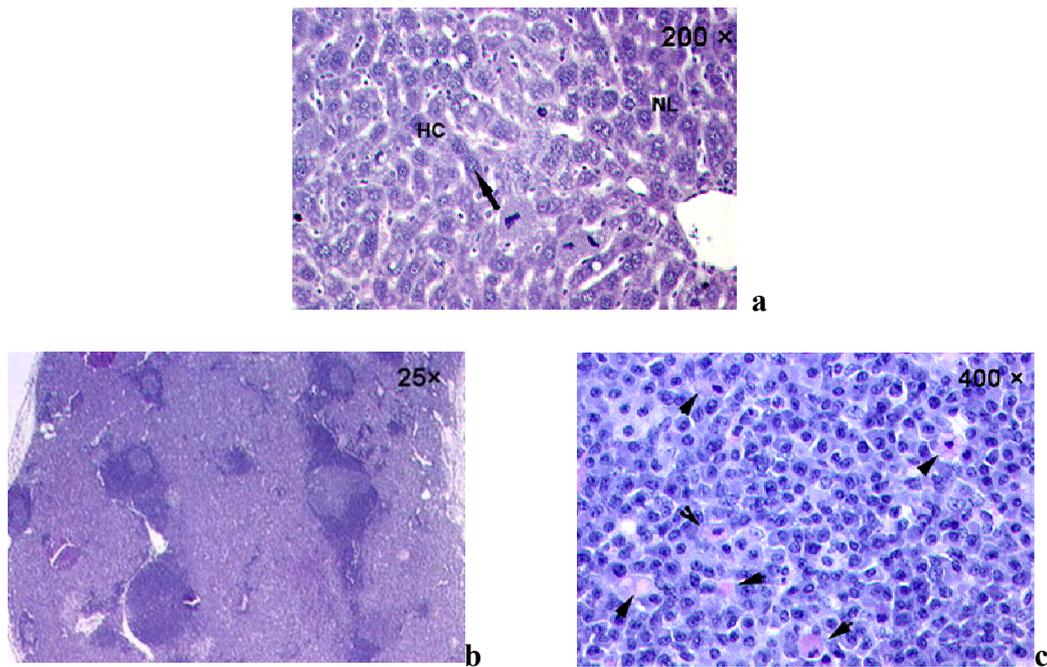


**Abb 21.:** Generalisierte Lymphknotenschwellung einer Maus 119 d nach i.p. Therapie mit 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  Konjugaten. a) Ansicht von dorsal zeigt die sichtbar vergrößerten axillären und femoralen Lymphknoten (Pfeile) b) Ansicht von ventral zeigt zudem die zervikalen Lymphknoten c) Ansicht von ventral zeigt freigelegte zervikale und femorale Lymphknoten (Pfeile).



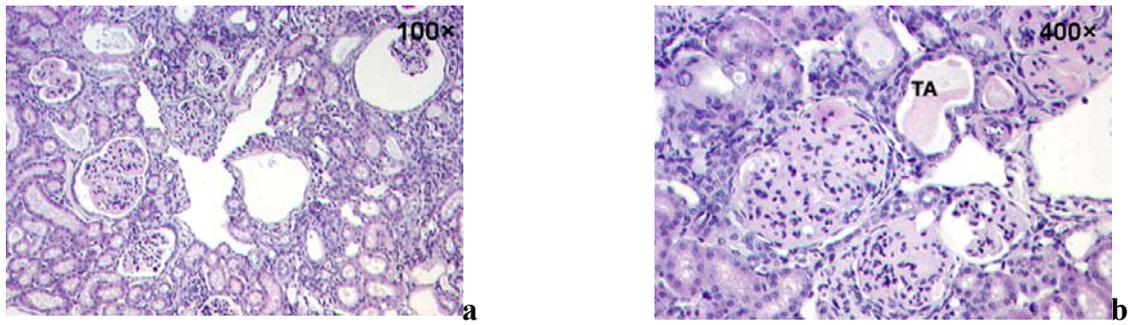
**Abb 22.:** Lymphknoten (HE, 650×) einer Maus 119 d nach i.p. Therapie mit 7,4 MBq <sup>177</sup>Lu-d9MAk Konjugaten. Sichtbar ist die typische Morphologie eines lymphoblastischen Lymphoms mit mittelgroßen Zellen, die ein blastenartiges Chromatin und ein spärliches Zytoplasma aufweisen.

Das übrige Tier der 5 Mäuse, die einen stark reduzierten Allgemeinzustand aufwiesen, zeigte ebenfalls ausgeprägte Pathologien der Milz, Nieren, Leber sowie Lymphknoten. Dabei wurde in der Milz eine folliculäre Hyperplasie, in der Nieren eine schwere proliferative Glomerulonephritis und in der Leber ein hepatozelluläres Karzinom (Abb. 23 a) nachgewiesen. Die deutliche Vergrößerung der Lymphknoten war hierbei hauptsächlich durch die mikroskopisch nachweisbare massive Proliferation von Plasmazellen im interfollikulären Raum bedingt (Abb. 23 b, c). Obwohl mittels der H&E Färbung eine maligne oder benigne Zuordnung dieser Zellproliferation nicht möglich war, wurde aufgrund der Menge an Russell Körperchen, dies sind Plasmazellen mit einer hohen Konzentration an Immunglobulinen im Zytoplasma (s. Pfeile in Abb. 23 c), und der Invasion des angrenzenden Fettgewebes ein Plasmozytom vermutet.



**Abb 23.:** Lebergewebe (HE, 200×) (a) und Lymphknotengewebe (HE, 25×) (b) bzw. (HE, 400×) (c) einer Maus 145 d nach i.p. Applikation von 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  a) Übergang von hepatozellulärem Karzinom mit Mitosen (Pfeil) zu normalem Lebergewebe (NL). b) Massive Proliferation von Plasmazellen im interfollikulären Raum. c) Russell Körperchen (Pfeile). Aufgrund dieses typischen Befundes und der Invasion von Plasmazellen in angrenzendes Fettgewebe war ein Plasmozytom anzunehmen.

Die histologische Untersuchung der Nieren und der Leber von 4 mit 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  i.p. therapierten Mäusen und von einer mit 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu-d8MAk}$  i.p. therapierten Maus ergab ebenfalls pathologische Ergebnisse. In allen untersuchten Nieren war eine milde (n=3) bis schwere (n=2) proliferative Glomerulonephritis feststellbar, die in einem Fall (14,8 MBq  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$ ) zusätzlich eine Sklerose sowie eine tubuläre Atrophie (Abb. 24) aufwies. Die Leber war in allen Fällen ohne pathologischen Befund.



**Abb 24.:** Nierengewebe (HE, 100×) (a) bzw. (HE, 400×) (b) einer Maus 100 d nach i.p. Therapie mit 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugaten 8 d nach Tumorzellinokulation. a) Schwere diffuse proliferative Glomerulonephritis mit b) Sklerose sowie tubulärer Atrophie (TA).

## 5 Diskussion

Für Patienten mit diagnostiziertem Magenkarzinom ist der Nachweis einer Peritonealkarzinose mit einer infausten Prognose verbunden. Bereits der Nachweis einzelner Tumorzellen in einer im Rahmen des Staging durchgeführten laparoskopischen Peritoneallavage führt unabhängig von Tumorstadium (nach UICC) zu einer Prognoseverschlechterung (Rosenberg et al., 2006). Nach dem Ergebnis der klinischen Studie von Sadeghi et al. (2000) betrug das mediane Überleben von 125 Patienten mit einer Peritonealkarzinose des Magenkarzinoms ohne therapeutische Interventionen nur ca. 3 Monate. Derzeitige Therapieoptionen sind in der Regel palliativ und beinhalten eine systemische oder lokoregionale Chemotherapie. Diese Therapien sind jedoch bezüglich ihrer tumorzytotoxischen Wirkung unspezifisch und nebenwirkungsreich.

Eine viel versprechende, spezifische tumorzytotoxische Therapieoption stellt die Radioimmuntherapie (RIT) dar. Dabei werden Radionuklid markierte tumorspezifische Antikörper, wie z. B. d9MAk, eingesetzt. d9MAk ist ein spezifischer, monoklonaler Antikörper gegen ein mutiertes Oberflächenantigen E-Cadherin, welches bei ca. 10% der Patienten mit einem Magenkarzinom des diffusen Typs von den Tumorzellen exprimiert wird, nicht aber von normalen Gewebe (Becker et al., 1999). In einer präklinischen Therapiestudie erzielten Huber et al. (2003) an Mäusen mit i.p. disseminierten Tumorzellen vom Typ des diffusen Magenkarzinoms hochsignifikant längere Überlebenszeiten nach lokoregionaler Applikation von  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk Konjugaten im Vergleich zu untherapierten Kontrolltieren bei nur geringer Knochenmarkstoxizität. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Bewertung der lokoregionalen RIT i.p. disseminierter Tumorzellen vom Typ des diffusen Magenkarzinoms mittels  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugaten hinsichtlich der therapeutischen Effizienz und Toxizität auch im Vergleich zu  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk Konjugaten.

### 5.1 RIT von Mikrometastasen bzw. disseminierten Tumorzellen mittels $\alpha$ -Emitter bzw. $\beta$ -Emitter gekoppelten Immunkonjugaten

Die Effektivität der zytotoxischen Wirkung von Radioimmunkonjugaten (RIK) ist neben der Spezifität des Antikörpers vor allem vom Radionuklid abhängig, denn die physikalischen Eigenschaften sollten auf die Art des zu therapierenden Tumors abgestimmt sein.

$\alpha$ -Emitter werden aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften, z. B. hohem linearen Energietransfer (LET) von ca. 100 keV/ $\mu\text{m}$  bei geringer Penetrationstiefe im Gewebe von ca. 40-100  $\mu\text{m}$ , als Radionuklide für die RIT von Mikrometastasen oder disseminierten Tumorzellen gegenüber  $\beta$ -Emittern favorisiert (Nikula et al., 1999, Senekowitsch-Schmidtke et al., 2001, Milenic et al., 2004).  $^{213}\text{Bi}$  mit einer HWZ von ca. 46 min wird unter den allgemein schlecht verfügbaren  $\alpha$ -Emittern häufig in der präklinischen sowie klinischen RIT verwendet, da  $^{213}\text{Bi}$  am besten herzustellen ist und die Markierung mit Antikörpern vergleichsweise einfach ist, z. B. gegenüber dem  $\alpha$ -Emitter  $^{211}\text{At}$  (Astat-211). Die Zytotoxizität gegenüber normalen Geweben, insbesondere dem Knochenmark, ist bei i.p. Applikation von  $^{213}\text{Bi}$ -Immunkonjugaten aufgrund der relativ kurzen HWZ und der geringen Reichweite als gering einzuschätzen. Bei i.p. Applikation verzögert die Resorption via Peritoneum den Übertritt der RIK in das Blut, wodurch das Risiko einer strahlentoxischen Wirkung auf den Gesamtorganismus bei  $^{213}\text{Bi}$ -Immunkonjugaten zusätzlich minimiert wird. Daher erscheint  $^{213}\text{Bi}$  für die lokoregionale RIT der Peritonealkarzinose mittels tumorspezifischem Antikörper d9MAk gut geeignet zu sein.

Häufiger als  $\alpha$ -Emitter werden  $\beta$ -Emitter sowohl in der experimentellen präklinischen RIT als auch in der klinischen RIT von Tumoren eingesetzt. Unter den vielfach verwendeten  $\beta$ -Emittern  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{186}\text{Re}$  und  $^{177}\text{Lu}$  weist besonders  $^{177}\text{Lu}$  optimale physikalische Eigenschaften auf, welche für die RIT von kleinen Tumoren, Mikrometastasen, aber auch disseminierten Tumorzellen vorteilhaft sind (Janssen et al., 2003, Koppe et al., 2004, Brouwers et al., 2004). Dabei scheint vor allem die Kombination aus relativ kurzer Reichweite im Gewebe (im Mittel 1,6 mm) und der HWZ von 6,71 d die Effektivität der zytotoxischen Wirkung von  $^{177}\text{Lu}$  zu bedingen.

Die therapeutische Effizienz von  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugaten in der RIT kleiner Tumore bzw. disseminierter Tumorzellen gegenüber anderen  $\beta$ -Emittern gekoppelten Immunkonjugaten belegen mehrere Studien. Zum Beispiel zeigte die präklinische Therapiestudie von Koppe et al. (2004) an Nacktmäusen, denen 10 d vor Therapie Tumorzellen kolorektalen Ursprungs i.p. inokuliert wurden, dass das Überleben der mit  $^{177}\text{Lu}$ -MN-14 i.p. therapierten Tiere eindeutig länger war als das der mit  $^{131}\text{I}$ -,  $^{186}\text{Re}$ - bzw.  $^{90}\text{Y}$ -MN-14 therapierten Tiere. Alvarez et al. (1997) konnten in einer klinischen Phase I/II Studie, in welcher 27 Patientinnen mit Peritonealkarzinose des Ovarialkarzinoms nach erfolgloser Chemotherapie mit  $^{177}\text{Lu}$ -CC49 gegen tumorassoziertes Glykoprotein TAG-72 i.p. therapiert wurden, eine eindeutige

Überlebensverlängerung bei Patientinnen mit i.p. Mikrometastasen bzw. Tumorknötchen <1 cm (n=14) gegenüber Patientinnen mit Tumormetastasen >1 cm (n=13) feststellen. Somit erscheint  $^{177}\text{Lu}$  neben dem  $\alpha$ -Emitter  $^{213}\text{Bi}$  das geeignete Radionuklid für die lokoregionale RIT der Peritonealkarzinose des diffusen Magenkarzinoms mit dem tumorspezifischen Antikörper d9MAk zu sein.

## 5.2 Bewertung der tumorspezifischen Bindung von $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk im Vergleich zu $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk in vitro

Im Vorfeld der in vivo Studien wurde die Spezifität der  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate im Hinblick auf die Zytotoxizität im Vergleich zu  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugaten, die nicht an die Tumorzellen binden, an HSC45-M2 Magenkarzinomzellen mit mutierten d9-E-Cadherin in vitro untersucht. Die spezifische Bindung der  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate an d9-E-Cadherin exprimierenden HSC45-M2 Zellen konnte eindeutig nachgewiesen werden (s. 4.3). Unerwartet war dabei, dass auch die antigenunspezifischen  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugate eine schwache Bindung an die HSC45-M2 Zellen zeigten, die aber mit 1% – 4,5% gegenüber 10% – 21% bei  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk deutlich geringer war. Bei Seidl et al. (2005) war mit  $^{213}\text{Bi}$ -d8MAk Konjugaten ebenfalls eine schwache Bindung an die HSC45-M2 Zellen feststellbar, die vermutlich auf eine unspezifische Interaktion der Fc Domäne des Antikörpers d8MAk mit Oberflächenproteinen der HSC45-M2 Zellen zurückzuführen ist.

Das Ergebnis des klonogenen Tests (s. 4.4) zeigte, dass die Proliferation der HSC45-M2 Zellen 7 d nach Inkubation mit  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk bzw. mit  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk in Abhängigkeit von der Aktivität signifikant gehemmt wurde, nicht aber in Abhängigkeit vom Antikörper. Beispielsweise betrug die Proliferationshemmung bei Inkubation mit 1,85 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk 47% bzw. mit 1,85 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk 40% und bei Inkubation mit 3,7 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk 78% bzw. mit 3,7 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk 75%. Die Berechnung der Anzahl der Antigene und der Moleküle Antikörper pro Antikörperlösung ergab, dass in einem Inkubationsvolumen von 1 cm<sup>3</sup> ein ca. 10.000-facher Antikörperüberschuss vorlag. Daher dürfte die gleich starke zytotoxische Wirkung der  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk bzw.  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugate auf den für  $\beta$ -Emitter charakteristischen Crossfire-Effekt zurückzuführen sein, d.h. die zytotoxische Wirkung von  $\beta$ -Partikeln die von RIK ausgesendet werden, welche nicht an die Tumorzellen gebunden sind.

Eine spezifische Reduktion der Proliferationskapazität der HSC45-M2 Zellen durch  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk gegenüber  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk könnte jedoch erreicht werden, wenn nach einer

Inkubationszeit von z. B. 7 h, wie in der Arbeit von Schipper et al. (2003), das Medium gegen RIK freies Medium ausgetauscht werden würde. Damit wäre der Crossfire-Effekt ausgeschaltet. Schipper et al. (2003) untersuchten die Proliferationskapazität von NIS (Natrium-Jod-Symporter)-exprimierenden vs. NIS-negativen pankreatischen neuroendokrinen Tumorzellen nach Inkubation mit  $^{131}\text{I}$ . Durch den mehrmaligen Austausch des Mediums über 2 h nach 7 h Inkubation, wodurch freies  $^{131}\text{I}$  eliminiert wurde, war bei Inkubation von NIS-positiven Zellen die spezifische zytotoxische Wirkung von  $^{131}\text{I}$  gegenüber NIS-negative Tumorzellen eindeutig nachweisbar (Schipper et al., 2003).

### **5.3 Bewertung der tumorspezifischen Bindung von $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk im Vergleich zu $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk in vivo**

Basierend auf den Ergebnissen der Biodistributionsstudien, den absorbierten Organdosen sowie der Untersuchung der Ganzkörperretention von  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugaten wird die therapeutische Effizienz und Toxizität in Abhängigkeit von der Kinetik der  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugate in vivo im Folgenden bewertet. Zunächst wird auf die Aktivitätskonzentrationen im Tumorgewebe nach i.p. bzw. i.v. Applikation bei fortgeschrittener Peritonealkarzinose (14 d nach i.p. Tumorzellinokulation) und folgend auf die Aktivitätskonzentrationen in den tumorinfiltrierten Organen Peritoneum und Pankreas nach i.p. Applikation bei früher Peritonealkarzinose (1 d nach i.p. Tumorzellinokulation) eingegangen. Hierbei wird der Einfluss des Tumorstadiums auf die Konzentration von  $^{177}\text{Lu}$  im Blut und in einzelnen Organen besonders berücksichtigt. Danach werden Auffälligkeiten in der Verteilung der  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugate bei Mäusen ohne Peritonealkarzinose sowie die absorbierten Organdosen untersucht. Im letzten Punkt wird die Verteilung i.p. applizierter  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate mit  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk Konjugaten (Huber, 2003) bezüglich der Konzentration von  $^{177}\text{Lu}$  bzw.  $^{213}\text{Bi}$  im Tumorgewebe und im Blut verglichen.

#### **5.3.1 Biodistribution von $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk im Vergleich zu $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk bei fortgeschrittener Peritonealkarzinose**

Im Tumorgewebe von Mäusen mit fortgeschrittener Peritonealkarzinose war nach i.p. Applikation der spezifischen  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate zu jedem Untersuchungszeitpunkt (1 h, 3 h, 2 d p.i.) eine eindeutig stärkere  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivität messbar als nach Applikation von  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugaten. Dies spiegelte sich im Tumor/Blut Quotienten wider, der jeweils 1 h, 3 h und 2 d p.i. ermittelt wurde und ein

guter prognostischer Faktor für die zu erwartende therapeutische Effizienz vs. Toxizität ist. Ausnahmslos war dieser bei i.p. applizierten  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugaten  $>1$  und stets größer als bei  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugaten. Nach i.v. Applikation von  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugaten konnte gegenüber  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugaten ebenfalls eine höhere  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivität im Tumorgewebe festgestellt werden, weshalb auch hier der Tumor/Blut Quotient beim tumorspezifischen  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk größer war als bei  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk. Insgesamt war der Tumor/Blut Quotient jedoch  $<1$ , da die  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration im Blut 1 h p.i. aufgrund der systemischen Applikation mit 28,3 % ID/g höher war als die  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration im Tumorgewebe (17,9 % ID/g).

Die tumorspezifische Anreicherung der  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate bei i.p. Tumormanifestation wurde somit bei lokoregionaler sowie systemischer Applikationsroute nachgewiesen. Bezüglich der therapeutischen Effizienz und Toxizität konnte der Vorteil der lokoregionalen Applikation aufgrund des ca. 17-fach höheren Tumor/Blut Quotienten nach i.p. Applikation vs. i.v. Applikation 1 h p.i. gezeigt werden. Die Szintigraphie der Mäuse mit fortgeschrittener Peritonealkarzinose 1 d bzw. 2 d nach i.p. Applikation der  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate stellte die tumorspezifische Retention im Tumorgewebe zudem optisch dar.

Im zeitlichen Verlauf fielen nach i.p. Applikation der  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate die Schwankungen der  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentrationen im Tumorgewebe besonders auf. Die Blutkonzentrationen wiesen dagegen vergleichsweise geringe Veränderungen auf. Eindrucksvoll zeigten dies die jeweiligen Tumor/Blut Quotienten. Während 1 h p.i. die höchste Tumorkonzentration der  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate (54,8 % ID/g) und dementsprechend der höchste Tumor/Blut Quotient von 10,1 festzustellen war, konnte 3 h p.i. aufgrund der deutlich niedrigeren Tumorkonzentration (16,5 % ID/g) nur noch ein Tumor/Blut Quotient von 1,8 ermittelt werden. 2 d p.i. betrug die Tumorkonzentration 27 % ID/g und resultierte in einem Tumor/Blut Quotienten von 2,1.

Die Schwankungen der  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration im Tumorgewebe, die sich im Tumor/Blut Quotient widerspiegelten, sind sehr wahrscheinlich auf die Untersuchung unterschiedlich großer Tumormassen zurückzuführen. Denn aufgrund der i.p. Verteilungs- und Manifestationsmöglichkeiten der Tumorzellen nach i.p. Inokulation, wurde an den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten Tumorknötchen unterschiedlicher Größe vorgefunden, so dass z. B. in einem Fall ein einzelnes großes Tumorknötchen als

Gewebeprobe entnommen wurde und in einem anderen Fall mehrere kleinere Tumorknötchen. In Abhängigkeit von der Tumorgroße variiert die Anzahl der Antigene, weshalb an größere Tumore theoretisch höhere Konzentrationen an  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAK Konjugaten binden könnten als an kleineren Tumore. Allerdings ist für die Bindung der RIK die zugängliche Tumoroberfläche entscheidend, da die Penetration der RIK in solide Tumorknötchen gering ist. Demzufolge ist im Vergleich zu einem einzelnen großen Tumorknötchen die Oberfläche mehrerer kleiner insgesamt größer und der prozentuale Anteil der injizierten Aktivität pro Gramm Gewebe entsprechend höher. Für die Messung der Aktivitätskonzentration im Tumorgewebe sollten daher nur einzelne Tumorknötchen als Gewebeprobe entnommen und untersucht werden.

Der starke Abfall der  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration im Tumorgewebe 3 h nach i.p. Applikation der  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAK Konjugate im Vergleich zu 1 h p.i. könnte jedoch auch auf eine Instabilität der  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugate in vivo hinweisen. Hierbei wäre eine Abspaltung von  $^{177}\text{Lu}$  vom Antikörper nach bereits erfolgter Tumorzellbindung als Ursache für die deutlich geringere  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivität im Tumorgewebe nach 3 h denkbar. Dafür würden auch die zu diesem Zeitpunkt (3 h) fast doppelt so hohen  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentrationen im Peritoneum und im Blut im Vergleich zu 1 h p.i. sprechen. Denn eine erhöhte intraperitoneale Konzentration an freiem  $^{177}\text{Lu}$  würde zu einer Resorption von  $^{177}\text{Lu}$  am Peritoneum führen, infolge dessen die  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration im Blut zunimmt.

Einen weiteren Hinweis für eine Instabilität der  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAK Konjugate nach i.p. Applikation liefern eigene Untersuchungen zur in vitro Stabilität der RIK im Serum bzw. PBS (s. 4.2). Bei Inkubation von  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAK in Serum wurde innerhalb der ersten 3 d eine um 26% verminderte Bindungsstabilität zwischen  $^{177}\text{Lu}$  und d9MAK festgestellt. Danach blieb die Bindung der RIK mit 71% des Ausgangswertes im weiteren Verlauf unverändert. Im Gegensatz dazu war die Bindung zwischen  $^{177}\text{Lu}$  und d9MAK bei Inkubation von  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAK in PBS über den Beobachtungszeitraum von 8 d stabil. Da die Bindung der  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAK Konjugate durch das proteinfreie, aber elektrolythaltige PBS nicht beeinflusst wurde, dürften vor allem die im Serum enthaltenen Proteine bzw. Enzyme die Instabilität der  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugate bedingt haben. Die vom Peritoneum abgegebene Flüssigkeit ist ein Transsudat der Blutgefäße und enthält dementsprechend Proteine des Blutserums, jedoch in deutlich geringerer Konzentration. Somit kann eine Instabilität der  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugate auch in vivo nach i.p. bzw. nach i.v. Applikation vorgelegen haben. Zudem stützen auch die im Femur nach i.p. Applikation von  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAK ermittelten  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentrationen von

1,3 % ID/g 1 h p.i. auf 2,0 % ID/g 2 d p.i. die Vermutung einer in vivo Instabilität der  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugate, da freie  $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -Ionen in vivo bevorzugt im Knochengewebe abgelagert werden (Müller et al., 1980, Li et al., 2001). Ähnliche Aktivitätskonzentrationen im Femur waren auch nach i.p. Applikation von  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugaten in tumorfreien Mäusen festzustellen. Hierbei wurde über einen Untersuchungszeitraum von 7 d nach 1 d p.i. mit 1,9 % ID/g die höchste  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration im Knochen ermittelt, die im weiteren Verlauf bis zum 7. Tag (1,4 % ID/g) kontinuierlich abnahm. Einen vergleichbaren Verlauf der  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration im Femur zeigte Milenic et al. (2002) nach i.p. Applikation von  $^{177}\text{Lu}$ -CHX-A-DTPA-CC49 Konjugaten an nu/nu Nacktmäusen mit s.c. Tumoren kolorektalen Ursprungs. Danach war die ermittelte Aktivitätskonzentration 24 h p.i. mit 4,89 % ID/g jedoch ca. um das doppelte höher als in der vorliegenden Arbeit (Milenic et al., 2002).

Brouwers et al. (2004) untersuchten die Stabilität der Bindung zwischen  $^{177}\text{Lu}$  und dem MAk cG250 in Abhängigkeit des verwendeten Chelators DOTA bzw. SCN-CHX-A-DTPA in vitro und in vivo. Bei Inkubation in Serum wiesen die DOTA- $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugate ebenso wie die SCN-CHX-A-DTPA- $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugate während der ersten 14 d eine gute in vitro Stabilität mit einem freien  $^{177}\text{Lu}$ -Anteil von <5% auf. Über die gesamte Inkubationszeit von 22 d betrachtet, waren jedoch die  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-cG250 Konjugate mit einem freien  $^{177}\text{Lu}$ -Anteil von <5% stabiler als die  $^{177}\text{Lu}$ -SCN-CHX-A-DTPA-cG250 Konjugate, deren freier  $^{177}\text{Lu}$ -Anteil >5% war (Brouwers et al., 2004). Die Biodistributionsstudien an Mäusen mit s.c. Tumoren nach i.v. Applikation von  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-cG250 bzw.  $^{177}\text{Lu}$ -SCN-CHX-A-DTPA-cG250 zeigten nach Applikation der SCN-CHX-A-DTPA-RIK zu jedem Untersuchungszeitpunkt (1 d, 3 d, 7 d p.i.) eindeutig höhere  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentrationen im Knochen sowie 3 d bzw. 7 d p.i. eindeutig höhere  $^{177}\text{Lu}$ -Anreicherungen in Leber und Milz im Vergleich zur Applikation von DOTA-RIK. Brouwers et al. (2004) nahmen daher in vivo eine stärkere Instabilität der SCN-CHX-A-DTPA- $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugate als der DOTA- $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugaten an. Mögliche Ursachen für diese insgesamt jedoch geringe Instabilität der SCN-CHX-A-DTPA- $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugaten im Vergleich zu DOTA- $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugaten wurden von den Autoren nicht genannt (Brouwers et al., 2004).

Hinweise auf eine mögliche Instabilität von SCN-CHX-A-DTPA- $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugaten zwischen  $^{177}\text{Lu}$  und dem Chelator liefern die Untersuchungen zur in vitro Stabilität von  $^{177}\text{Lu}$ -CHX-A-DTPA bzw.  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA ohne konjugierten MAk im Serum bei Stimmel et al. (1998). Hierbei konnte während der ersten 3 d der Inkubation

eine Reduktion der Bindungsstabilität zwischen  $^{177}\text{Lu}$  und CHX-A-DTPA um ca. 10% festgestellt werden. Im weiteren Verlauf blieben die  $^{177}\text{Lu}$ -CHX-A-DTPA Komplexe mit ca. 90% des Ausgangswertes unverändert. Die  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA Komplexe blieben dagegen über die gesamten 21 d stabil (Stimmel et al., 1998). Die Stabilität der  $^{177}\text{Lu}$ -CHX-A-DTPA Komplexe im Serum wies damit einen ähnlichen Verlauf auf wie die Stabilität der SCN-CHX-A-DTPA- $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugate der vorliegenden Arbeit, weshalb auch hier eine Instabilität zwischen  $^{177}\text{Lu}$  und SCN-CHX-A-DTPA und nicht zwischen SCN-CHX-A-DTPA und d9MAk vermutet wurde.

### 5.3.2 Biodistribution von $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk im Vergleich zu $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk bei früher Peritonealkarzinose

Bei Mäusen mit früher Peritonealkarzinose waren die höchsten  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentrationen nach i.p. Applikation der tumorspezifischen  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate in Peritoneum und Pankreas feststellbar, sowohl nach 1 h als auch nach 3 h p.i.. Auch 7 d p.i. zählten Peritoneum und Pankreas zu den Organen mit den höchsten  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentrationen. Aufgrund ihrer Lage waren Peritoneum und Pankreas nach i.p. Tumorzellinokulation besonders häufig tumorös infiltriert. Dies konnte makroskopisch nach Eröffnung des Abdomen von Mäusen mit fortgeschrittener Peritonealkarzinose sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch bei Huber (2003) gezeigt werden. Demzufolge war die Retention der i.p. applizierten  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate in Peritoneum und Pankreas 1 h, 3 h bzw. 7 d p.i. sehr wahrscheinlich auf die spezifische Bindung der  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate an die HSC45-M2 Zellen zurückzuführen.

Überraschend war, dass auch nach i.p. Applikation der nicht tumorspezifischen  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugate die  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration in Peritoneum und Pankreas hoch war, z. B. 1 h p.i. fast doppelt so hoch wie nach Applikation von  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk. Wie lässt sich diese Anreicherung der nicht spezifischen  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugate in tumorinfiltrierten Geweben erklären, wenn eine Bindung der  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugate an die d9-E-Cadherin mutierten HSC45-M2 Zellen ausgeschlossen werden kann?

Eine mögliche Erklärung, die auf den Ergebnissen von Janssen et al. (2003) basiert, könnte eine verstärkte Resorption ungebundener  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugate via Peritoneum sein. Die Autoren untersuchten die Retention tumorspezifischer bzw. nicht tumorspezifischer  $^{111}\text{In}$ -MAk Konjugate ( $^{111}\text{In}$ -HMFG1 bzw.  $^{111}\text{In}$ -G250) nach i.p. Applikation an Nacktmäusen 9 d nach Inokulation von Ovarialkarzinomzellen. Dazu wurde der Anteil freier bzw. zellgebundener RIK in der Peritoneallavage nach

Zentrifugation bestimmt. Hierbei war das spezifische RIK zu ca. 80% an die Zellen gebunden und zeigte somit eine signifikant bessere Retention als das unspezifische RIK, welches vor allem im Überstand vorlag. Beispielsweise wurde 4 h p.i. ca. 75% des spezifischen RIK retiniert, aber nur ca. 25% des nicht spezifischen RIK (Janssen et al., 2003). Demzufolge ist anzunehmen, dass ca. 75% der nicht spezifischen  $^{111}\text{In}$ -Immunkonjugate resorbiert wurden.

3 h p.i. spiegelte sich die Resorption der  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugate zum einen in einer doppelt so hohen Blutkonzentration im Vergleich zu 1 h p.i. und zum anderen in einer um die Hälfte geringeren  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration in Peritoneum und Pankreas wider. Dagegen wiesen die  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentrationen der  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate in Peritoneum, Pankreas und im Blut 3 h p.i. vs. 1 h p.i. nur geringfügige Veränderungen auf, weshalb hier eine tumorzellbedingte Retention der spezifischen  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate anzunehmen ist. Auch die nach 1 h und 3 h p.i. ermittelten höheren  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentrationen der i.p. applizierten  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugate in den übrigen untersuchten Organen im Vergleich zu  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugaten lassen sich mit einer resorptionsbedingt hohen  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration im Blut erklären. Senekowitsch-Schmidtke et al. (2001) wiesen höhere Organkonzentrationen nach i.p. Applikation von  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk Konjugaten bei Mäusen mit MDA-Zell-Peritonealkarzinose *ohne* Zielantigen im Vergleich zu Mäusen mit MDA-Zell-Peritonealkarzinose *mit* Zielantigen (d9-E-Cad) ebenfalls nach. Gleichzeitig war hierbei im Aszites der Mäuse mit d9-E-Cad-MDA-Zell-Peritonealkarzinose eine massive  $^{213}\text{Bi}$ -Aktivitätsretention festzustellen. Nach Zentrifugation des Aszites betrug der prozentuale Anteil der injizierten  $^{213}\text{Bi}$ -Aktivität im d9-E-Cad-MDA-Zellpellet 78 % ID/g. Eine derartig hohe  $^{213}\text{Bi}$ -Aktivitätsretention konnte im Aszites von Mäusen mit MDA-Zell-Peritonealkarzinose *ohne* d9-E-Cad Mutation nicht nachgewiesen werden (18 % ID/g) (Senekowitsch-Schmidtke et al., 2001).

7 d nach i.p. Applikation der  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate war die  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration im Blut ca. doppelt so hoch wie nach  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Applikation. Dies war vermutlich auf eine verlangsamte Resorption der  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate infolge der i.p. Retention zurückzuführen. Dafür sprechen die  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentrationen der applizierten  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate in Peritoneum und Pankreas 7 d p.i., die zwar insgesamt mit 5 % ID/g sehr gering, aber gegenüber  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugaten ca. doppelt so hoch waren. Der Großteil der  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugate war zu diesem Zeitpunkt (7 d) sehr wahrscheinlich bereits abgebaut, womit sich die vergleichsweise hohe  $^{177}\text{Lu}$ -

Konzentration in der Leber erklären lässt, da nach Koppe et al. (2005) RIK in der Leber katabolisiert werden.

### 5.3.3 Biodistribution und Dosimetrie von $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk bei tumorfreien Mäusen

Mäuse ohne vorherige i.p. Tumorzellinokulation zeigten bereits kurz nach i.p. Applikation der  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate hohe  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentrationen im Blut: 3 h p.i. waren diese mit 18 % ID/g mehr als doppelt so hoch als 1 h p.i. (6,8 % ID/g). Die höchste  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration im Blut wurde 1 d p.i. (21,4 % ID/g) mit anschließender kontinuierlicher Abnahme bis 7 d p.i. (9,6 % ID/g) gemessen. Die massive Zunahme der  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration im Blut 3 h nach  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Applikation zeigte sich ähnlich nach i.p. Applikation nicht tumorspezifischer  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugate bei Mäusen mit früher Peritonealkarzinose. Diese Parallelität zwischen i.p. applizierten  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugaten bei Mäusen ohne Peritonealkarzinose und i.p. applizierten  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugaten bei Mäusen mit Peritonealkarzinose bezüglich der  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentrationen im Blut legt nahe, dass die Retention der  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate eindeutig durch die Bindung an die i.p. inokulierten HSC45-M2 Zellen verursacht wurde.

Die Ursache für die hohen  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentrationen i.p. applizierter  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugate im Blut über den gesamten Untersuchungszeitraum von 7 d, welcher ca. einer HWZ von  $^{177}\text{Lu}$  entspricht, war das hohe Molekulargewicht der RIK. Im Blut befindliche Antikörper, wie z. B. d9MAk bzw. d8MAk können unter physiologischen Bedingungen aufgrund ihres Molekulargewicht von ca. 150 kDa nicht in den Glomeruli der Niere filtriert und damit nicht ausgeschieden werden. Lediglich Proteine <65 kDa passieren die glomerulären Membranen und erscheinen im Ultrafiltrat. Peptide wie z. B. Octreotid (Molekulargewicht ca. 1 kDa), welches gekoppelt an Radionuklide in der Therapie neuroendokriner Tumore Anwendung findet, werden dagegen aufgrund ihres Molekulargewichtes <65 kDa rasch in den Glomeruli aus dem Blut filtriert. Beispielsweise betrug bei Schmid et al. (2003) die  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration im Blut von Mäusen mit s.c. Tumoren (kleinzellige Bronchialkarzinomzellen) 1 d nach i.v. Applikation von  $^{177}\text{Lu}$ -Octreotid 0,008 % ID/g. Bei Brouwers et al. (2004) war 1 d nach i.v. Applikation von  $^{177}\text{Lu}$ -cG250 Konjugaten die  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration im Blut von Mäusen mit s.c. Tumoren (Nierenzellkarzinomzellen) 21,0 % ID/g. Im Vergleich dazu zeigen eigene Ergebnisse 1 d nach i.v. Applikation von  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugaten bei tumorfreien Mäusen mit 20,9 % ID/g eine ähnliche  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration im Blut wie die Applikation von  $^{177}\text{Lu}$ -cG250 Konjugaten bei Brouwers et al. (2004).

Zwischen dem 1. Tag und 7. Tag nach i.p. Applikation und 1 h und 2 d nach i.v. Applikation veränderte sich die  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration in Milz und Leber nach Applikation von  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugaten bei tumorfreien Mäusen nur geringfügig. Dies spricht für eine Retention der  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugate in diesen Organen. Andere gut durchblutete Organe wie Herz, Lunge oder Niere zeigten dagegen entsprechend zur  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration im Blut eindeutig zu- bzw. abnehmende  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentrationen. Auffallend hohe Aktivitätskonzentrationen in Leber und Milz wurden vor allem nach Applikation von Radiometall gekoppelten Immunkonjugaten im Vergleich zu iodierten Immunkonjugaten beobachtet (Milenic et al., 2002, Koppe et al., 2004). In Organzellen, wie z. B. den Hepatozyten wird nach Internalisierung der RIK, wahrscheinlich durch Flüssigphasen-Endozytose, der Antikörper eines RIK in Lysosomen, aber auch in Endosomen enzymatisch abgebaut. Die verbleibenden, nicht abbaubaren Radionuklid-Chelatkomplex Reste werden intralysosomal an Aminosäuren gebunden und verlassen die Lysosomen nur langsam (Rogers et al., 1995, Duncan et al., 1997). Dagegen werden nicht metabolisierte Iod-Tyrosin Reste iodierter Immunkonjugate nach dem Abbau der MAk rasch aus den Lysosomen via Carrier vermittelten Transportsystemen ausgeschieden (Press et al., 1996). Koppe et al. (2004) führten daher die auffallend hohen  $^{88}\text{Y}$ -Konzentrationen in Milz und Leber über 7 d nach i.p. sowie i.v. Applikation von  $^{88}\text{Y}$ -MN-14 auf den intrazellulären Einschluss von  $^{88}\text{Y}$  infolge des Antikörperkatabolismus zurück. Der Abbau von Antikörpern in der Leber ist seit langem beschrieben (Waldmann, 1969). Warum trotz des Abbaus der RIK in der Leber und der Milz (Koppe et al., 2005) die  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentrationen im Blut auch nach 7 d mit fast 10 % ID/g noch relativ hoch war, ist jedoch ungeklärt. Möglicherweise ist die Ursache im Aufnahmesystem der Hepatozyten zu suchen, die für die Internalisierung der RIK verantwortlich sind.

Die Bestimmung der zerfallskorrigierten Ganzkörperaktivität über 7 d nach i.p. Applikation von  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugaten an Mäusen ohne Peritonealkarzinose zeigte nach einem initialen Abfall auf 77% der injizierten Aktivität nach 1 d p.i. bis zum 7. Tag p.i. einen nahezu unveränderten Verlauf der täglich gemessenen Ganzkörperaktivität (s. 4.8). Diese Ganzkörperretention der  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate könnte hierbei vermutlich Ausdruck der Retention von  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugaten in Leber und Milz gewesen sein.

Die starke Retention der  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate in der Leber spiegelte sich auch in der Organdosis wider, wonach die Leber mit 1,37 mSv/MBq das Organ mit der

höchsten Strahlendosis war. Das im Rahmen der histopathologischen Untersuchung festgestellte hepatozelluläre Karzinom in der Leber einer Maus, welcher 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate i.p. appliziert wurden (s. 4.12 Abb. 23 a), ist somit vermutlich auf eine Strahlenspätwirkung zurückzuführen. Außerdem ergab die Berechnung der absorbierten Organdosen, dass die Niere mit 1,19 mSv/MBq unmittelbar nach der Leber die zweithöchste Strahlendosis aufwies. Die histopathologischen Untersuchungen post mortem entnommener Nieren von Mäusen, welche mit 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk (n=6) bzw.  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk (n=1) i.p. therapiert wurden, zeigten milde bis schwere proliferative Glomerulonephritiden, die in einem Fall sogar mit einer Sklerose sowie mit einer tubulären Atrophie einherging (s. 4.12 Abb. 24). Die wahrscheinlichste Ursache dafür dürfte auch hier eine Strahlenschädigung sein. Da intakte im Blut befindliche  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugate in den Glomeruli nicht filtriert werden und eine Schädigung der Kapillarmembranen während des Durchflusses in den Glomeruli aufgrund der sehr kurzen Kontaktzeit auszuschließen ist, stellt sich die Frage auf welche Weise  $^{177}\text{Lu}$  eine Glomerulonephritis ausgelöst haben könnte.

Eine mögliche Erklärung berücksichtigt, dass  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate in vitro bei Inkubation in Serum instabil waren, d.h. bei einer Instabilität der RIK in vivo könnten neben freigesetztem  $^{177}\text{Lu}$ , welches neu an Serumproteine bindet auch  $^{177}\text{Lu}$  gekoppelte Antikörperfragmente entstehen.  $^{177}\text{Lu}$ -Antikörperfragmente würden z. B. bei Molekulargewichten <65 kDa in der Niere glomerulär filtriert werden. Von i.v. applizierten Peptid gekoppelten Radionukliden, wie z. B.  $^{111}\text{In}$ -DTPA-Octreotid, ist beispielsweise bekannt, dass diese in den Glomeruli filtriert und dann von proximalen Tubuluszellen aus dem Ultrafiltrat reabsorbiert werden (Duncan et al., 1997, Behr et al., 1998). Nach intrazellulärem Abbau des Peptidanteils in den Lysosomen, verbleibt der  $^{111}\text{In}$ -DTPA Rest intralysosomal gebunden an Aminosäuren, während die Metaboliten des Proteinabbaus dem Blut zugeführt werden (Duncan et al., 1997). Rogers et al. (1995) beobachteten den gleichen Mechanismus in der Niere auch für  $^{111}\text{In}$ -Antikörperfragmente. Demzufolge könnte die hier beobachtete Schädigung der Glomeruli bzw. der Tubuli bei anatomischer Nähe von Glomerulus und proximaler Tubuluszelle durch den intrazellulären Einschluss von  $^{177}\text{Lu}$  infolge der Aufnahme und des Abbaus von filtrierten  $^{177}\text{Lu}$  gekoppelten niedermolekularen Proteinen bzw. Antikörperfragmenten erklärt werden.

### 5.3.4 Biodistribution i.p. applizierter $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate im Vergleich zu $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk Konjugaten

Die i.p. Applikation sowohl von  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugaten als auch von  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk Konjugaten (Huber, 2003) führte an jedem Untersuchungszeitpunkt zu einer signifikant höheren Aktivitätskonzentration im Tumorgewebe im Vergleich zu i.p. applizierten nicht spezifischen  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk bzw.  $^{213}\text{Bi}$ -d8MAk Konjugaten. Jedoch waren die Tumor/Blut Quotienten 1 h p.i. bei Mäusen mit Peritonealkarzinose ohne Aszites bei  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk Konjugaten aufgrund der vergleichsweise niedrigeren  $^{213}\text{Bi}$ -Konzentration im Tumorgewebe geringer als bei  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugaten ( $^{213}\text{Bi}$ : 1,8 vs.  $^{177}\text{Lu}$ : 10,1). Der Vergleich der Aktivitätskonzentrationen im Tumorgewebe basierte hierbei auf der Annahme, dass ca. gleich große Tumormassen nach  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk bzw. nach  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk Applikation untersucht wurden, da die Aktivitätskonzentration im Tumorgewebe in Abhängigkeit von der untersuchten Tumorgröße variiert (s. 5.3.1). Die Blutkonzentrationen waren 1 h p.i. bei beiden RIK annähernd gleich (je ca. 5 % ID/g).  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate wären demnach aufgrund der höheren Retention im Tumorgewebe gegenüber  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk Konjugate vorteilhafter für die i.p. RIT. Aber unter klinischen Gesichtspunkten, welche die therapeutische Wirkung gegen ein mögliches strahlentoxisches Gefährdungspotential für gesunde Organe abwägen, sollten die  $^{213}\text{Bi}$ -Immunkonjugate den  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugaten für die i.p. RIT vorgezogen werden, da die  $^{213}\text{Bi}$ -Konzentration im Blut aufgrund der ca. 200-mal kürzeren HWZ gegenüber  $^{177}\text{Lu}$  vernachlässigt werden kann.

## 5.4 Bewertung der Therapiestudien

Basierend auf den Ergebnissen der Therapiestudien, der Obduktionen sowie der Toxizitätsstudien wird die therapeutische Effizienz der  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate für die lokoregionale RIT der Peritonealkarzinose gastralen Ursprungs im Vergleich zu  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugaten im Folgenden bewertet.

Gegenüber untherapierten Kontrolltieren führte die i.p. Applikation von 1,85 MBq, 7,4 MBq bzw. 14,8 MBq des spezifischen  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugats zu einer hochsignifikanten Verlängerung des Überlebens bei Therapie 1 d sowie 8 d nach i.p. Tumorzellinokulation. Jedoch wurde auch nach i.p. Applikation von 7,4 MBq bzw. 14,8 MBq des unspezifischen  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugats an beiden Therapiezeitpunkten eine signifikante Überlebensverlängerung gegenüber untherapierten Tieren festgestellt. Die

therapeutische Wirkung der  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugate dürfte hierbei auf den Crossfire-Effekt zurückzuführen sein.

Beim Vergleich der Therapiegruppen, die mit spezifischen  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugaten vs. nicht spezifischen  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugaten behandelt wurden, spiegelte sich die Spezifität der  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate eindeutig in den Überlebenszeiten wider. 1 d nach Tumorzellinokulation überlebten die Tiere nach i.p. Applikation von 1,85 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk ca. 2-mal und nach 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk sogar 5-mal länger als die mit  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk therapierten Tiere. Auch 8 d nach Tumorzellinokulation führte die Applikation von 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk zu einem doppelt so langen Überleben der Tiere als die Applikation von 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk.

Im Gegensatz dazu wurde bei Huber (2003) im gleichen Tiermodell die Spezifität der  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk Konjugate nur bei Applikation 8 d nach Tumorzellinokulation und nicht bei Applikation nach 1 d festgestellt. Dies wurde auf das höhere Antigen/Antikörperverhältnis im fortgeschrittenen Tumorstadium zurückgeführt. Aufgrund der erhöhten Anzahl an Antigenen im progredienten Tumorstadium war bei gleicher applizierter Antikörpermenge der tumorzellgebundene Anteil an  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk Konjugaten bedeutend höher und der ungebundene Anteil an  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk Konjugaten geringer als im frühen Tumorstadium. Demzufolge war die zytotoxische Wirkung der  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk Konjugate im fortgeschrittenen Tumorstadium größtenteils durch zellgebundene RIK bedingt, wobei die unspezifische Zytotoxizität ungebundener RIK mittels Crossfire-Effekt eine geringe Rolle spielte. Bei i.p. Therapie 1 d nach Tumorzellinokulation bedingte dagegen der hohe Anteil ungebundener  $^{213}\text{Bi}$ -Immunkonjugate, aufgrund des Überschusses an Antikörpern, den fehlenden Nachweis der spezifischen Wirkung der  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk Konjugate im Vergleich zu  $^{213}\text{Bi}$ -d8MAk Konjugaten durch die unspezifische Tumorzytotoxizität. Auf den Zusammenhang zwischen dem Antigen/Antikörperverhältnis und der Spezifität der  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate weisen auch eigene Ergebnisse eines in vitro Versuchs hin (s. 4.3).

Die kürzeren Überlebenszeiten nach i.p. Therapie sowohl mit  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugaten als auch mit  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk Konjugaten am 8. Tag vs. am 1. Tag nach Tumorzellinokulation legen nahe, dass eine effektive Tumorzellabtötung durch RIK von einer möglichst maximalen Antigensättigung abhängt. Beispielsweise war das mittlere Überleben nach Applikation von 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk 8 d nach Tumorzellinokulation

um ca. 40% und nach Applikation von 7,4 MBq  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAK Konjugate um ca. 20% kürzer als nach Applikation 1 d nach Tumorzellinokulation.

Neben dem Ausmaß der Absättigung der Antigene mit RIK, das vom Antigen/Antikörperverhältnis sowie von der Affinitätskonstanten  $K_a$  des Antikörpers abhängt, beeinflusst die spezifische Aktivität der RIK die Zytotoxizität in der RIT (Nikula et al., 1999). Je höher die spezifische Aktivität, desto höher ist bei vollständiger Antigensättigung die Anzahl der gebundenen RIK an der Zelle. Somit wird bei hoher spezifischer Aktivität weniger applizierte Aktivität für die Tumorzelltötung benötigt. Bei niedrigeren spezifischen Aktivitäten ist bei vollständiger Antigensättigung die Anzahl der gebundenen RIK an der Zelle geringer als bei höheren spezifischen Aktivitäten. Für die Tumorzelltötung bedarf es dementsprechend mehr applizierte Aktivität. Eine Steigerung der applizierten Aktivität führt aber auch zu einer Zunahme der Antikörpermenge, wobei der Anteil der nicht tumorzellgebundenen RIK und die damit verbundene unspezifische Zytotoxizität mittels Crossfire-Effekt zunimmt.

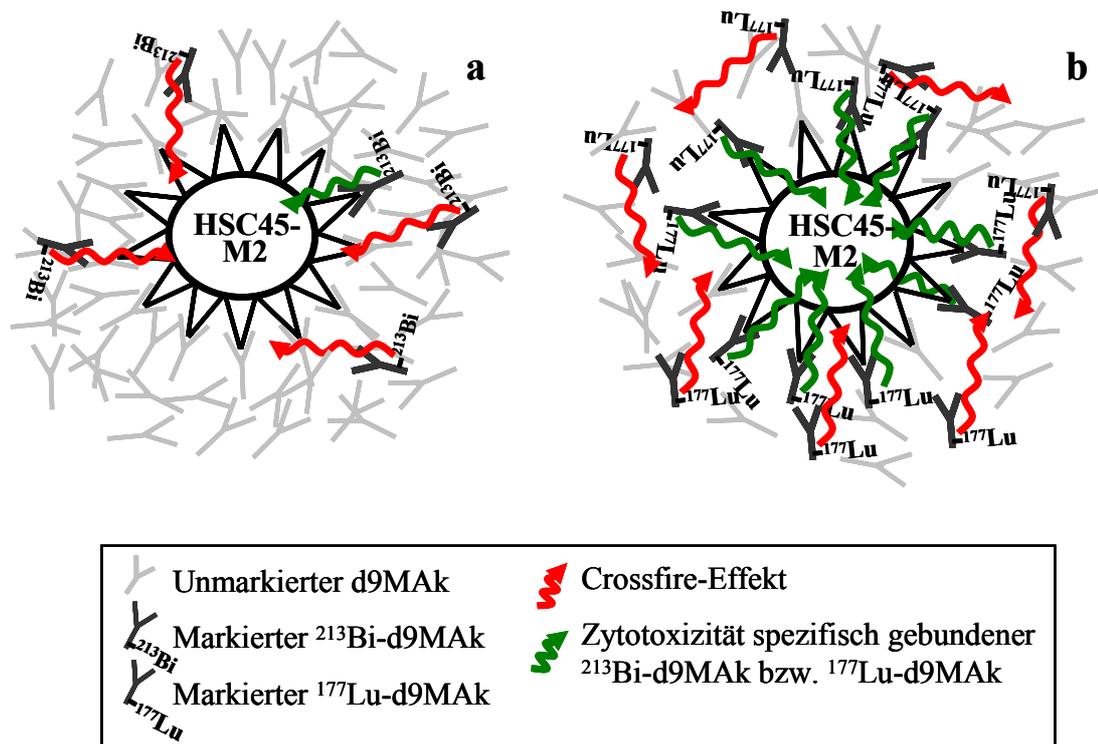
Die jeweilige spezifische Aktivität der  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAK bzw.  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAK Konjugate zum Zeitpunkt der Applikation und das daraus ableitbare Verhältnis aus  $^{177}\text{Lu}$  bzw.  $^{213}\text{Bi}$  markierten d9MAK zu nicht markierten d9MAK könnte eine mögliche Erklärung für den Nachweis der Spezifität bei i.p. Therapie mit  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAK im Vergleich zur i.p. Therapie mit  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAK 1 d nach Tumorzellinokulation sein. Die spezifische Aktivität für die  $^{177}\text{Lu}$ -Markierung des d9MAK betrug zum Zeitpunkt der Applikation im Mittel 637 MBq/mg. Dies entsprach einem Verhältnis von markierten  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAK zu unmarkierten d9MAK von 1:8. Bei Huber et al. (2003) betrug die *maximale* erreichbare spezifische Aktivität der  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAK Konjugate 1480 MBq/mg, wobei dies einem Verhältnis von markierten  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAK zu unmarkierten d9MAK von 1:685 entsprach. Die *mittlere* spezifische Aktivität der  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAK Konjugate zum Zeitpunkt der Applikation wurde von den Autoren nicht angegeben (Huber et al., 2003, Huber, 2003). Da sowohl gleiche Antikörpermengen (ca. 10  $\mu\text{g}$ ) als auch gleiche Aktivitäten (1,85 MBq bzw. 7,4 MBq) der  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAK bzw. der  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAK Konjugate pro Maus i.p. injiziert wurden, ist davon auszugehen, dass bei Huber (2003) eine gleiche *mittlere* spezifische Aktivität der  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAK Konjugate zum Zeitpunkt der Applikation vorlag wie bei  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAK Konjugaten. Bei gleicher spezifischer Aktivität der  $^{177}\text{Lu}$ - bzw. der  $^{213}\text{Bi}$ -Immunkonjugate von 637 MBq/mg würde das Verhältnis aus  $^{213}\text{Bi}$  markierten d9MAK zu nicht markierten d9MAK 1:1591 betragen.

Die Ursache für das deutlich bessere Verhältnis aus  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk zu nicht markierten d9MAk im Vergleich zu  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk zu nicht markierten d9MAk bei gleicher spezifischer Aktivität ist auf die HWZ von  $^{177}\text{Lu}$  bzw.  $^{213}\text{Bi}$  zurückzuführen. Wie die Rechnung nach Gleichung (2) (s. 3.6.2.2) zeigte, ist die Anzahl der  $^{177}\text{Lu}$ - bzw.  $^{213}\text{Bi}$ -Atome bei gleicher Aktivität von der HWZ abhängig, die bei  $^{177}\text{Lu}$  etwa 200-mal länger ist als bei  $^{213}\text{Bi}$ . Bei 637 MBq  $^{177}\text{Lu}$  beträgt die Anzahl der  $^{177}\text{Lu}$ -Atome ca.  $5,3 \times 10^{14}$ , bei 637 MBq  $^{213}\text{Bi}$  beträgt die Anzahl der  $^{213}\text{Bi}$ -Atome dagegen nur ca.  $2,5 \times 10^{12}$ . Bei gleicher spezifischer Aktivität war daher der Anteil an  $^{177}\text{Lu}$  markierten d9MAk bei einer Antikörpermenge von 1 mg, die nach Gleichung (1) (s. 3.6.2.2)  $4 \times 10^{15}$  d9MAk Moleküle entsprach, ca. 200-mal höher als der Anteil an  $^{213}\text{Bi}$  markierten d9MAk.

Für die spezifische Tötung einer Tumorzelle mittels  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk Konjugaten sollten ca. 5 RIK an die Zelle binden (Macklis et al., 1992). Mittels  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugaten werden hingegen um den Faktor 1000 mehr gebundene RIK benötigt, um eine Zelle zu töten, da die LET der  $\beta$ -Partikel deutlich geringer ist als die der  $\alpha$ -Partikel (Imam, 2001). Eine HSC45-M2 Zelle exprimiert ca.  $3 \times 10^5$  Antigene d9-E-Cad, dass sind bei  $1 \times 10^7$  i.p. inokulierten Zellen ca.  $3 \times 10^{12}$  Antigene. Dabei kann bei i.p. Therapie 1 d nach Tumorzellinokulation aufgrund der Adaptation der Zellen an das veränderte Milieu in vivo von einer etwa gleich bleibenden oder auch verminderten Zellzahl ausgegangen werden. Die Wahrscheinlichkeit, dass bei einer spezifischen Aktivität von 637 MBq/mg mindestens 5 zur Zelltötung benötigte  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk Konjugate pro Tumorzelle binden, erscheint aufgrund des Verhältnisses aus  $^{213}\text{Bi}$  markierten d9MAk zu nicht markierten d9MAk von 1:1591 gering zu sein. Daher dürfte die Tumorzelltötung vor allem auf die nicht gebundenen  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk Konjugate mittels Crossfire-Effekt zurückzuführen sein. Die mittleren Überlebenszeiten der 1 d nach Tumorzellinokulation mit  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk therapierten Tiere, die sich nicht signifikant von den Überlebenszeiten der mit  $^{213}\text{Bi}$ -d8MAk therapierten Tiere unterschieden (Huber, 2003), waren dabei vermutlich Ausdruck der stärkeren unspezifischen Zytotoxizität der ungebundenen  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk Konjugate im Vergleich zur spezifischen Zytotoxizität der gebundenen  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk Konjugate.

Die Wahrscheinlichkeit, dass bei einer spezifischen Aktivität von 637 MBq/mg etwa 5000 zur Zelltötung benötigte  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate pro Tumorzelle binden, erscheint aufgrund des Verhältnisses aus  $^{177}\text{Lu}$  markierten d9MAk zu nicht markierten d9MAk von 1:8 höher zu sein. Der Crossfire-Effekt dürfte daher eine geringere Rolle gespielt haben als die Zytotoxizität der gebundenen  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate. Dies

würde auch das signifikant längere Überleben der mit  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAK 1 d nach Tumorzellinokulation behandelten Tiere gegenüber  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAK behandelten Tieren erklären. Abbildung 25 veranschaulicht den Zusammenhang zwischen dem Verhältnis aus Radionuklid markierten d9MAK zu nicht markierten d9MAK und der Tumorzelltötung mittels gebundener RIK bzw. nicht gebundener RIK bei gleicher spezifischer Aktivität i.p. applizierter  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAK bzw.  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAK Konjugate.



**Abb 25.:** Vereinfachte Darstellung der Zytotoxizität i.p. applizierter  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAK (a) bzw.  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAK Konjugate (b) bei i.p. Therapie 1 d nach Tumorzellinokulation. Bei gleicher spezifischer Aktivität des  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAK bzw.  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAK Konjugats von 637 MBq/mg war der Anteil an  $^{177}\text{Lu}$  markiertem d9MAK ca. 200× höher als bei  $^{213}\text{Bi}$  markiertem d9MAK. Ursache war die längere HWZ von  $^{177}\text{Lu}$  (~6,7 d) gegenüber  $^{213}\text{Bi}$  (~46 min), da bei gleicher Aktivität die Anzahl der Atome von der HWZ abhängt. a) Das Verhältnis von  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAK zu nicht markierten d9MAK beträgt 1:1591. Die Wahrscheinlichkeit mit der mindestens 5  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAK an die Zelle binden ist gering, weshalb die Zelltötung durch ungebundene  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAK mittels des Crossfire-Effekts eine größere Rolle spielt als durch gebundene  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAK. b) Das Verhältnis von  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAK zu nicht markierten d9MAK beträgt 1:8, weshalb hier die Tumorzelltötung durch ca. 5000 gebundene  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAK eine größere Rolle spielt als durch nicht gebundene  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAK.

Um die spezifische Wirkung i.p. applizierter  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$  Konjugate im Vergleich zu  $^{213}\text{Bi-d8MAk}$  Konjugaten auch bei Therapie 1 d nach Tumorzellinokulation erzielen zu können, sollte der Anteil der ungebundenen  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$  Konjugate und damit die Wirkung des Crossfire-Effekts reduziert werden. Dies ist zwar durch die Applikation einer geringeren Antikörpermenge möglich, bedeutet bei gleicher spezifischer Aktivität aber auch eine Reduktion der applizierten Aktivität der  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$  Konjugate. Hierzu zeigte Bloechl et al. (2005) am gleichen Tumormodell, dass die i.p. Applikation von  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$  Konjugaten 1 d nach Tumorzellinokulation mit Aktivitäten  $<1,85$  MBq zwar zu einem signifikant längeren Überleben gegenüber untherapierten Kontrollen führte, aber im Vergleich zur i.p. Applikation von  $\geq 1,85$  MBq  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$  (Huber, 2003) war das Überleben dieser Tiere deutlich verkürzt. Beispielsweise betrug das mediane Überleben nach i.p. Therapie 1 d nach Tumorzellinokulation 48 d (MW: 51 d) bei  $0,37$  MBq  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$  (Bloechl et al., 2005) vs. 214 d (MW, da kein Median ermittelbar war) bei  $1,85$  MBq  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$  (Huber, 2003).

Eine effektivere Möglichkeit die Spezifität der  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$  Konjugate gegenüber  $^{213}\text{Bi-d8MAk}$  Konjugaten bei Therapie 1 d nach Tumorzellinokulation zu erzielen, wäre die Erhöhung der spezifischen Aktivität, da hierbei der Anteil an  $^{213}\text{Bi}$  markierten d9MAk Konjugaten gegenüber nicht markierten d9MAk zunimmt. Dadurch würde die Anzahl der gebundenen  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$  Konjugate pro Zelle zunehmen, weshalb die Zytotoxizität durch die gebundenen RIK eine größere Rolle spielt als die unspezifische Zytotoxizität der ungebundenen  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$  Konjugate mittels des Crossfire-Effekts.

Bei Applikation sehr hoher Aktivitäten verliert die spezifische Aktivität hinsichtlich der Zytotoxizität an Bedeutung, da der Crossfire-Effekt mit zunehmender Aktivität stärker wird. Ein Beispiel dafür war in der vorliegenden Arbeit die i.p. Therapie mit  $14,8$  MBq  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  1 d nach Tumorzellinokulation. Tiere dieser Therapiegruppe überlebten trotz der hohen spezifischen Aktivität im Vergleich zu Tieren, die mit  $14,8$  MBq des unspezifischen  $^{177}\text{Lu-d8MAk}$  Konjugats 1 d nach Tumorzellinokulation i.p. therapiert wurden, nicht signifikant länger. Das mediane Überleben betrug 29 d nach  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  Applikation vs. 28 d nach  $^{177}\text{Lu-d8MAk}$  Applikation. Gegenüber untherapierten Kontrolltieren (22 d) war jedoch ein geringer, aber signifikanter Überlebensvorteil festzustellen. Die Obduktion dieser Tiere unmittelbar nach dem jeweiligen Todeszeitpunkt ergab, dass die mit  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  behandelten Tiere in 10 von 10 Fällen makroskopisch ohne Zeichen einer Peritonealkarzinose waren, bei  $^{177}\text{Lu-d8MAk}$  behandelten Tieren hingegen nur 1 von 10 Fällen. Demnach konnte eine spezifische

Tumorzelltötung der  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  Konjugate gegenüber  $^{177}\text{Lu-d8MAk}$  Konjugaten auch bei Applikation von 14,8 MBq nachgewiesen werden. Der mit der Tumorzelltötung verbundene Überlebensvorteil, wie er z. B. bei Applikation von 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  vs.  $^{177}\text{Lu-d8MAk}$  beobachtet wurde, blieb jedoch aus. Daher wurde die toxische Wirkung der Strahlung insbesondere auf das hämatopoetische bzw. lymphatische System als Ursache für den Tod der Tiere angenommen. Darauf weisen vor allem die Blutbilder hin, die nach i.p. Applikation von 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu}$  eine starke Suppression der Leukozyten zeigten.

Den Zusammenhang zwischen therapeutischer Effizienz und applizierter Aktivität der spezifischen  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  Konjugate zeigen die Überlebenszeiten der Therapiegruppen, denen 0,37 MBq, 1,85 MBq, 7,4 MBq bzw. 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  i.p. appliziert wurden. Mit Ausnahme von 0,37 MBq führte jede i.p. applizierte  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivität zu einer signifikanten Überlebensverlängerung gegenüber untherapierten Kontrolltieren. Die mit 0,37 MBq  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  i.p. therapierten Tiere verstarben unabhängig von Applikationszeitpunkt nach Tumorzellinokulation ausnahmslos an einer ausgeprägten Peritonealkarzinose, wie die Obduktion nach dem jeweiligen Todeszeitpunkt zeigte. Mit zunehmender  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivität bis 7,4 MBq verlängerte sich das tumorfreie Überleben bei Applikation 1 d nach Tumorzellinokulation von 19 d bei 0,37 MBq  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  auf 235 d bei 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  und bei Applikation 8 d nach Tumorzellinokulation von 16 d bei 0,37 MBq  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  auf 69 d bei 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$ . Die Applikation von 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  verkürzte dagegen das Überleben der Tiere auf 29 d (1 d nach Tumorzellinokulation) bzw. 39 d (8 d nach Tumorzellinokulation) aufgrund der hohen Strahlentoxizität. 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  erwies sich somit zu beiden Therapiezeitpunkten nach Tumorzellinokulation als diejenige  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivität mit der höchsten therapeutischen Effizienz.

Die i.p. Applikationen von 1,85 MBq bzw. 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  1 d bzw. 8 d nach Tumorzellinokulation unterschieden sich im Hinblick auf das Überleben der Tiere nicht signifikant. Die Obduktion der Mäuse unmittelbar nach dem jeweiligen Todeszeitpunkt ergab bei 9 von 10 Tieren, die 1 d nach Tumorzellinokulation mit 1,85 MBq  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  behandelt wurden, makroskopisch eindeutige Zeichen einer Peritonealkarzinose. Demnach waren 1,85 MBq  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  nicht ausreichend für eine effektive Tumorzelltötung, denn im Vergleich zu untherapierten Kontrolltieren war das Tumorwachstum zwar supprimiert, aber progredient. Im Gegensatz dazu zeigte die Obduktion der Tiere, denen 1 d nach Tumorzellinokulation 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$

appliziert wurden, in keinem Fall eine Peritonealkarzinose. Daher war das drastisch verkürzte Überleben dieser Tiere im Vergleich zu Tieren, die mit 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk 1 d nach Tumorzellinokulation i.p. therapiert wurden, auf die Toxizität der Strahlung aufgrund einer zu hohen applizierten  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivität zurückzuführen (s. o.).

Der Therapiezeitpunkt, 1 d bzw. 8 d nach Tumorzellinokulation, beeinflusste das Überleben der mit 1,85 MBq, 7,4 MBq bzw. 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk i.p. therapierten Tiere nur bei 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk statistisch signifikant. Bei Applikation 1 d nach Tumorzellinokulation überlebten hierbei die Tiere 235 d, wobei 9 von 10 Mäusen am Ende der Beobachtungszeit (250 d) ohne Zeichen einer Peritonealkarzinose waren. Dagegen betrug das Überleben der Tiere nach Applikation von 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk 8 d nach Tumorzellinokulation 69 d, wobei nur 4 von 10 Mäusen am Ende der Beobachtungszeit tumorfrei waren. Je früher also die Therapie nach Tumorzellinokulation erfolgt, desto länger überleben die Tiere. Daher wäre eine erfolgreiche lokoregionale RIT mit tumorspezifischen  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugaten noch vor dem Auftreten erster Zeichen einer Peritonealkarzinose, beispielsweise im Anschluss an die Primärtherapie, denkbar. Vor allem der Nachweis von freien Tumorzellen mittels Peritoneallavage, der eine Prognoseverschlechterung darstellt (Rosenberg et al., 2006), würde eine sinnvolle Indikation für die lokoregionale RIT zur Prävention der Entwicklung einer Peritonealkarzinose sein.

## 5.5 Bewertung der Toxizitätsstudien

Jede Verabreichung von Therapeutika sollte stets unter Abwägung des therapeutischen Nutzens gegen eventuell gesundheitsschädliche Nebenwirkungen erfolgen. Zur frühzeitigen Erkennung einer strahlungsinduzierten Toxizität nach Applikation von  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugaten wurden die Mäuse hinsichtlich des Verhaltens, der Hautfarbe, des Hauttugors sowie vergrößerter Lymphknoten regelmäßig untersucht und das periphere Blutbild kontrolliert.

Nach dem Gesetz von Bergonie und Tribondeau (1906) ist die Strahlenempfindlichkeit von Geweben mit Ausnahme von Lymphozyten und Oozyten (Riede, 2004) umso größer, je höher deren Zellteilungsrate und je niedriger deren Differenzierungsgrad ist (Münter, 2004). Hämatopoetische Stammzellen des Knochenmarks bzw. des lymphatischen Systems reagieren deshalb empfindlicher auf Strahlung als die differenzierten Blutzellen. Die Untersuchung des Blutbildes stellt daher eine

wirkungsvolle Methode zur Beurteilung von  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk induzierten Schäden in diesen Systemen dar.

Im Untersuchungszeitraum von 50 d veränderte sich die Zahl der weißen Blutkörperchen in Abhängigkeit von der applizierten Aktivität der  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate. Mit steigender  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivität verringerten sich die Leukozytenzahlen drastischer und erholten sich langsamer. Während bei 0,37 MBq und 1,85 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk kein signifikanten Abfall der Leukozyten festzustellen war, resultierte die Applikation von 7,4 MBq bzw. 14,8 MBq jeweils in einem deutlichen Abfall um 33% bzw. 75% des Ausgangswertes bereits innerhalb der ersten 3 d p.i..

Unter den peripheren Blutzellen reagieren Lymphozyten bei Mäusen (Cronkite, 1973) sowie beim Menschen (Fritz-Niggli, 1997) am empfindlichsten auf die Einwirkung von Strahlung. Der schnelle Abfall der Leukozyten während der ersten 3 d nach Applikation von  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk könnte daher auf eine Schädigung der Lymphozyten zurückgeführt werden. Beim Menschen kann eine Lymphopenie infolge einer Lymphknotenschädigung schon ca. 1 h nach Strahlenexposition auftreten (Riede, 2004). Der weitere Abfall der Leukozyten bis zum 10. Tag (7,4 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk) bzw. 17. Tag (14,8 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk) p.i. ist vermutlich mit einem verminderten Nachschub neuer Blutzellen aus geschädigtem Knochenmarksgewebe bzw. lymphatischen Gewebe zu erklären. Dabei kann bei i.p. Applikation von 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu}$  eine sehr ausgeprägte Knochenmarksschädigung angenommen werden, da die Leukozytenwerte bis auf 5% des Ausgangswertes abnahmen. Zudem war nach Applikation von 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk bis zum Ende des Untersuchungszeitraums nach 50 d keine vollständige Regeneration der Leukozyten feststellbar, wohl aber nach Applikation von 7,4 MBq. Eine Verlängerung der Erholungszeit von Leukozyten mit zunehmender  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivität wurde auch in Toxizitätsstudien an Lewis Ratten beobachtet (Lewis et al., 2001).

Die Applikation von  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk Konjugaten führte ebenfalls zu einem Abfall der Leukozyten in Abhängigkeit von der i.p. applizierten Aktivität (Huber et al., 2003). Dabei war der stärkste Abfall der Leukozyten auf ca. 35% des Ausgangswertes 7 d nach i.p. Applikation von 22,2 MBq  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk zu beobachten. Danach konnte eine rasche Regeneration der Leukozyten bis zum 20. Tag p.i. nachgewiesen werden (Huber, 2003).

Unter der Annahme, dass die i.p. Applikation von 22,2 MBq  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk (Huber, 2003) bzw. 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk in der vorliegenden Arbeit die maximal tolerierbaren Aktivitäten (MTA) für die Mäuse im gleichen Tumormodell darstellen,

lassen sich  $^{213}\text{Bi}$ - und  $^{177}\text{Lu}$ -Ergebnisse vergleichen. Dabei dürfte der stärkere Abfall der Leukozyten zum späteren Zeitpunkt p.i. (auf 6% 17 d p.i.) sowie die protrahiert verlaufende Regeneration der Leukozyten nach i.p. Applikation von  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk gegenüber  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk mit der längeren HWZ und Reichweite von  $^{177}\text{Lu}$  im Vergleich zu  $^{213}\text{Bi}$  zu erklären sein. Aufgrund der vergleichsweise kurzen HWZ von  $^{213}\text{Bi}$  sollte die Exposition des Knochenmarks bzw. des lymphatischen Systems nach i.p. Applikation von  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk Konjugaten wesentlich geringer sein als nach i.p.  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Applikation. Auch das Ausmaß der Knochenmarksschädigung wäre aufgrund der kurzen Reichweite von  $^{213}\text{Bi}$  (80  $\mu\text{m}$ ) geringer als bei  $^{177}\text{Lu}$  (1,6 mm). In Übereinstimmung mit der geringeren Knochenmarkstoxizität von  $^{213}\text{Bi}$  nach i.p. Applikation ist auch die längere mediane Überlebenszeit von 119 d 1 d nach i.p. Therapie mit 22,2 MBq  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk im Vergleich zur i.p. Therapie mit 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk (29 d). Der Vergleich der Verläufe der Leukozytenzahlen bei gleicher therapeutischer Effizienz i.p. applizierter  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate (7,4 MBq) bzw.  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk Konjugate (1,85 MBq) zeigte ebenfalls einen deutlich geringeren Abfall der Leukozyten nach  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk Applikation als nach  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Applikation. Zum Beispiel waren die niedrigsten Leukozytenzahlen bei  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk Konjugaten (Huber, 2003) am 3. Tag p.i. bei ca. 50% des Ausgangswertes festzustellen, bei  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugaten aber erst am 10. Tag p.i. bei ca. 40% des Ausgangswertes.

Körperliche Veränderungen bzw. Verhaltensauffälligkeiten im Hinblick auf den Allgemein- und Ernährungszustand der Tiere wurden unmittelbar nach i.p. Tumorzellinokulation, im fortgeschrittenen Tumorstadium sowie einige Tage nach i.p. Applikation von 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu}$  beobachtet (s. 4.12). Nur bei Tieren, die mit 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk bzw.  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk i.p. therapiert wurden bzw. die im Rahmen der Toxizitätsstudien eine i.p. Applikation von 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk erhielten, zeigte sich ca. 1 Woche nach Injektion eine zunehmende Blässe der Haut sowie der Schleimhäute. Eine Normalisierung der Hautfarbe (rosig) wurde erst nach weiteren 2 Wochen beobachtet. Der Verdacht auf eine strahlungsbedingte Anämie wurde durch die Bestimmung der roten Blutkörperchen im Blut dieser Tiere erhärtet.

Im Vergleich zur i.p. Applikation von 0,37 MBq, 1,85 MBq bzw. 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk wies nur die i.p. Applikation von 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk einen signifikanten Abfall der Erythrozytenzahlen auf. Dabei wurden die niedrigsten Erythrozytenwerte zwischen dem 17 d und 24 d p.i. gemessen und erklären damit die in diesem Zeitraum beobachtete anämische Veränderung der Hautfarbe. Ebenso wie bei den Leukozyten

war eine vollständige Regeneration der Erythrozyten am Ende des Untersuchungszeitraums von 50 d nicht feststellbar. Der deutlich geringere Abfall in der Anzahl der Erythrozyten auf 73% des Ausgangswertes im Vergleich zu 5% des Ausgangswertes bei den Leukozyten ist vermutlich auf die geringe Strahlensensibilität reifer Erythrozyten zurückzuführen. Eine Abnahme der Anzahl der Erythrozyten zeigte auch Janssen et al. (2003) nach i.p. Applikation von 6,3 MBq  $^{90}\text{Y}$ -HMFG1, 11,8 MBq  $^{186}\text{Re}$ -HMFG1 bzw. 20,3 MBq  $^{131}\text{I}$ -HMFG1 in tumorfreien Mäusen, wobei die jeweils applizierte Aktivität der zuvor bestimmten MTA entsprach. Beispielsweise wurde hier der niedrigste Erythrozytenwert nach i.p. Applikation der  $^{90}\text{Y}$ -Immunkonjugate auf ca. 30% des Ausgangswertes 2 Wochen p.i. ermittelt (Janssen et al., 2003). Auch nach i.p. Applikation von  $\alpha$ -Emitter gekoppelten MAk, z. B.  $^{213}\text{Bi}$ -HuM195, konnte bei einer  $^{213}\text{Bi}$ -Aktivität von 13,5 MBq ein geringer Abfall der Erythrozytenwerte im Vergleich zu Kontrolltieren nachgewiesen werden ( $23,6 \times 10^6/\mu\text{l}$  vs.  $26,7 \times 10^6/\mu\text{l}$ ), wie Toxizitätsstudien im Mausmodell bei Nikula et al. (1999) zeigten.

Die hohe Strahlentoxizität der  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate nach i.p. Applikation von 14,8 MBq, die sich in deutlich sichtbaren Veränderungen sowie einem stark pathologischen Blutbild äußerte, reduzierte das Überleben der Tiere drastisch im Vergleich zu Tieren, die mit 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk i.p. behandelt wurden. Daher entspricht die hier i.p. applizierte  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivität von 14,8 MBq sehr wahrscheinlich der MTA. In der Literatur beschriebene MTA nach i.p. bzw. i.v. Applikation von  $^{177}\text{Lu}$  gekoppelten MAk weisen ebenfalls darauf hin. Koppe et al. (2004) ermittelte nach i.p. Applikation von  $^{177}\text{Lu}$ -MN14 Konjugaten bei Nacktmäusen eine MTA von 16,7 MBq. Nach i.v. Applikation von  $^{177}\text{Lu}$ -cG250 Konjugaten an Nacktmäusen betrug die MTA 18,5 MBq (Brouwers et al., 2004). Die ähnlich hohen MTA nach i.p. bzw. nach i.v. Applikation ist mit der nach maximal 1 d nahezu gleich hohen Blutkonzentration von  $^{177}\text{Lu}$  zu erklären.

Strahleninduzierte Spätwirkungen Jahre nach externer Strahlenexposition, beispielsweise nach einer Strahlentherapie, sind beim Menschen bekannt. Neben degenerativen Veränderungen, z. B. einer arteriellen Gefäßsklerose mit nachfolgender Gewebischämie, ist das Auftreten maligner Neoplasien, z. B. einer akuten myeloischen Leukämie mit einer Latenz von ca. 5 Jahren, besonders schwerwiegend (Schaefer et al., 2004). Die Beobachtung der therapierten Tiere über einen Zeitraum von 250 d diente neben der Ermittlung der therapeutischen Wirkung der  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate daher auch der Erkennung möglicher  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk induzierter Spätwirkungen.

Bei 6 von 45 Tieren, denen 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  bzw.  $^{177}\text{Lu-d8MAk}$  i.p. injiziert wurde, sowie bei 2 von 65 Tieren, denen 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  i.p. injiziert wurde, war 119 d nach Therapie erstmals eine klinisch auffällige, generalisierte Lymphknotenschwellung festzustellen. Der Verdacht auf eine maligne Veränderung der Lymphknoten wurde durch die histopathologische Untersuchung der Gewebeproben bestätigt. Bei 4 der mit 14,8 MBq und 1 der mit 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu-Immunkonjugaten}$  behandelten Tiere wurde aufgrund der diffusen Infiltration von Leber, Nieren, Milz und Gehirn mit mittelgroßen blastenartigen Zellen die Diagnose lymphoblastisches Lymphom gestellt. Diese Erkrankung entwickelt sich aus den sehr frühen Vorläuferzellen der B- bzw. T-Lymphozyten im Knochenmark bzw. im Thymus und geht meist mit einem leukämischen Blutbild einher (Schaefer et al., 2004). Da aufgrund der Untersuchung des Blutbildes eine strahlentoxische Frühschädigung des Knochenmarks innerhalb der ersten 50 d p.i. angenommen werden konnte, wäre eine strahleninduzierte maligne Neoplasie ausgehend von den Vorläuferzellen der B-Zellen im Knochenmark als strahleninduzierte Spätwirkung denkbar.

Die histopathologische Untersuchung der Leber einer Maus, die 145 d nach i.p. Applikation von 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  aufgrund eines stark reduzierten Allgemeinzustandes euthanisiert wurde, ergab ein hepatozelluläres Karzinom. Außerdem waren in Nieren von Mäusen, denen 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  (n=5) bzw. 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  (n=1) i.p. injiziert wurde, unterschiedlich ausgeprägte proliferative Glomerulonephritiden mit teilweiser Sklerose und tubulärer Atrophie feststellbar. Diese Ergebnisse wurden bereits in 5.3.3 diskutiert und sind vermutlich ebenfalls als strahleninduzierte Spätwirkungen aufzufassen.

## **5.6 Therapeutische Effizienz und Toxizität von $^{177}\text{Lu-d9MAk}$ im Vergleich zu $^{213}\text{Bi-d9MAk}$**

Für die RIT kleiner Tumorknoten bzw. disseminierter Tumorzellen erscheint unter den  $\beta$ -Emittern  $^{177}\text{Lu}$ , unter den  $\alpha$ -Emittern  $^{213}\text{Bi}$  ein geeignetes Radionuklid zu sein. Die lokoregionale RIT führte sowohl mit  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  Konjugaten als auch mit  $^{213}\text{Bi-d9MAk}$  Konjugaten (Huber, 2003) bei Mäusen mit früher sowie mit fortgeschrittener Peritonealkarzinose zu einer Verlängerung des Überlebens gegenüber untherapierten Kontrolltieren. Die höchste therapeutische Effizienz erzielte die i.p. Therapie mit 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu-d9MAk}$  bei Mäusen mit früher Peritonealkarzinose, d.h. nach Applikation 1 d nach Tumorzellinokulation, wobei 9 von 10 therapierten Mäusen in gutem

Allgemein- und Ernährungszustand 250 d tumorfrei überlebten. Dabei beruhte die therapeutische Effizienz von  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk auf der spezifischen Bindung an das Tumorzellantigen d9-E-Cadherin wie der Vergleich zur i.p. Therapie mit nicht spezifischen  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk Konjugaten in 2 unabhängigen Studien zeigte.

Die beste therapeutische Effizienz i.p. applizierter  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk Konjugate wurde ebenfalls bei Mäusen mit früher Peritonealkarzinose erzielt. Nach i.p. Applikation von 1,85 MBq des  $^{213}\text{Bi}$ -Immunkonjugats überlebten 8 von 9 therapierten Tieren 250 d tumorfrei in gutem Allgemein- und Ernährungszustand (Huber, 2003). Die therapeutische Effizienz der  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk Konjugate war aber im Vergleich zu  $^{213}\text{Bi}$ -d8MAk Konjugaten nicht spezifisch, d.h. der Antitumoreffekt trat in gleichem Maße bei Applikation von nicht tumorspezifischen  $^{213}\text{Bi}$ -Immunkonjugaten auf. Eine Erklärung für die spezifische Wirkung der  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate im Vergleich zu  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk Konjugaten bei i.p. Therapie 1 d nach Tumorzellinokulation war bei gleicher spezifischer Aktivität vermutlich der um den Faktor 200 höhere Anteil an  $^{177}\text{Lu}$  markierten d9MAk als an  $^{213}\text{Bi}$  markierten d9MAk. Die Anzahl an gebundenem  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk pro Zelle war dadurch deutlich geringer war als die Anzahl an gebundenem  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk. Obwohl für die spezifische Tumorzelltötung mittels  $\alpha$ -Emitter-RIK ca. 1000-mal weniger RIK binden müssen als mittels  $\beta$ -Emitter-RIK, war die Anzahl an gebundenem  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk nicht ausreichend, weshalb die unspezifische Zytotoxizität durch nicht gebundenem  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk mittels Crossfire-Effekt bei i.p. Therapie 1 d nach Tumorzellinokulation eine größere Rolle spielte als bei  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugaten.

Die Strahlentoxizität war in Abhängigkeit von der applizierten Aktivität sowohl bei  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugaten als auch bei  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk Konjugaten innerhalb der ersten 50 d p.i. anhand pathologisch veränderter Leukozytenzahlen im Blutbild der Tiere beobachtbar. Dabei führte die i.p. Applikation von 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugaten nicht nur zu sehr niedrigen Leukozytenzahlen und einem sehr geringen Regenerationspotenzial der Leukozyten, sondern auch zu einer temporären Anämie. Demzufolge konnte eine ausgeprägte aktivitätsbedingte Knochenmarksschädigung vermutet werden. Schließlich resultierte die i.p. Applikation von 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk auch in einem drastisch verkürzten medianen Überleben der therapierten Tiere im Vergleich zur i.p. Applikation von 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk. Daher wurde 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk bzw.  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk als MTA angenommen. Trotz der nachweislich hohen Strahlentoxizität der  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate gegenüber dem hämatopoetischen bzw.

lymphatischen System wurde die höchste absorbierte Strahlendosis nicht im Knochenmark, sondern in Leber und Niere ermittelt.

Auch nach i.p. Applikation von 22,2 MBq  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk Konjugate waren bei Huber et al. (2003) sehr niedrige Leukozytenwerte festzustellen. Die Regeneration der Leukozyten erfolgte jedoch relativ rasch innerhalb von 2 Wochen, weshalb in diesem Fall vermutlich keine ausgeprägte Knochenmarksschädigung vorlag. Das mittlere Überleben der mit 22,2 MBq  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk i.p. therapierten Tiere war im Vergleich zu Tieren, die mit 7,4 MBq  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk i.p. therapiert wurden dennoch um ca.  $\frac{1}{4}$  verkürzt. Die histologische Untersuchung von Nieren 5 therapiertter Mäuse, die zwischen 3 und 5 Monaten nach i.p. Applikation von 22,2 MBq  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk verstarben, zeigte bei 3 Tieren pathologische Veränderungen der Glomeruli sowie der Tubuli. Diese Schädigung wurde auf die Bestrahlung des Nierengewebes durch in Lysosomen der proximalen Tubuluszellen gespeichertes  $^{213}\text{Bi}$  zurückgeführt (Huber, 2003). Der Tod der mit 22,2 MBq  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk therapierten Tiere könnte somit Folge einer strahlungsbedingten Nierenschädigung gewesen sein. Derartige Nierenschäden waren nach Applikation von  $^{213}\text{Bi}$ -Aktivitäten  $<22,2$  MBq nicht nachzuweisen (Huber, 2003).

Das hohe Schädigungspotential der  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate gegenüber dem hämatopoetischen bzw. lymphatischen System äußerte sich außerdem vor allen nach i.p. Applikation von  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivitäten  $\geq 7,4$  MBq ca. 4 Monate p.i. in der Entwicklung eines lymphoblastischen Lymphoms, dessen Ursprung die frühen Vorläuferzellen der B- bzw. der T-Lymphozyten in Knochenmark bzw. Thymus sind. Derartige strahleninduzierte, maligne Spätwirkungen wurden nach keiner i.p. Applikation von  $^{213}\text{Bi}$ -Immunkonjugaten beschrieben (Huber, 2003). Die Ursache dafür dürfte die bedeutend längere HWZ sowie Reichweite von  $^{177}\text{Lu}$  im Vergleich zu  $^{213}\text{Bi}$  sein. Insbesondere bei hoher Aktivitätskonzentration im Blut, die nach i.p. Applikation von  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugaten über einen Zeitraum von 7 d ermittelt wurde, ist davon auszugehen, dass das Schädigungspotential von Radionukliden mit relativ langer HWZ gegenüber Normalgeweben verhältnismäßig hoch ist.

## 5.7 Schlussfolgerung

Trotz der viel versprechenden Ergebnisse, welche die vorliegende Arbeit in der lokoregionalen RIT der frühen Peritonealkarzinose des diffusen Magenkarzinoms mit 7,4 MBq des tumorspezifischen  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugats erzielte, muss die klinische

Anwendung kritisch überdacht werden. Denn bei allgemein guter Verträglichkeit war zumindest bei 1 von insgesamt 65 Tieren, die mit 7,4 MBq des spezifischen bzw. nicht spezifischen  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugats behandelten wurden, eine maligne Neoplasie festzustellen. Somit können bei einer RIT mit  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugaten auch bei höchster therapeutischer Effizienz strahleninduzierte maligne Spätwirkungen nicht ausgeschlossen werden.

Die lokoregionale RIT der frühen Peritonealkarzinose mit  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk Konjugaten wies bei i.p. Applikation von 1,85 MBq die höchste therapeutische Effizienz auf, obwohl die spezifische Wirkung der  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk Konjugate gegenüber  $^{213}\text{Bi}$ -d8MAk Konjugaten nicht eindeutig nachzuweisen war. Insbesondere im Hinblick auf die Toxizität sollten  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk Konjugate den  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugaten für die klinische Anwendung der lokoregionalen RIT vorgezogen werden, da bei sehr guter Verträglichkeit bisher keine malignen Pathologien nachgewiesen wurden. Das Risiko möglicher strahleninduzierter Nierenschäden kann hierbei durch die präventive Applikation kationischer Aminosäuren (Beer et al., 1997) bzw. geringer Konzentrationen des Plasmaexpanders Gelofusine (Vegt et al., 2006, Eerd et al., 2006) reduziert werden, da diese Substanzen die Reabsorption von filtrierten Radionuklid gekoppelten niedermolekularen Proteinen bzw. Antikörperfragmenten an den proximalen Tubuluszellen vermindern.

## 6 Zusammenfassung

### **Bewertung der lokoregionalen Radioimmuntherapie disseminierter Tumorzellen des diffusen Magenkarzinoms mit tumorspezifischen $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugaten im Mausmodell**

Bei ca. 10% der Patienten mit diffusem Magenkarzinom weisen die Tumorzellen eine mutierte Form des Oberflächenmoleküls E-Cadherin mit Deletion von Exon 9 auf, nicht aber normale Zellen. d9MAk ist ein monoklonaler Antikörper, der selektiv an mutiertes d9-E-Cadherin bindet. In dieser Arbeit wurde d9MAk an den  $\beta$ -Emitter  $^{177}\text{Lu}$  gekoppelt, der aufgrund seiner mittleren Reichweite von ca. 1,6 mm, Halbwertszeit (HWZ) von 6,71 d und begleitender  $\gamma$ -Strahlung gegenüber  $\beta$ -Emittern wie z. B.  $^{90}\text{Y}$  besonders für die Radioimmuntherapie (RIT) von Mikrometastasen bzw. disseminierten Tumorzellen geeignet erscheint. Für die Evaluierung der therapeutischen Effizienz und Toxizität lokoregional injizierter  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate, wurde die Tumorzell dissemination in Nacktmäusen imitiert, indem  $1 \times 10^7$  humane Magenkarzinomzellen mit d9-E-Cadherin Expression intraperitoneal (i.p.) injiziert wurden. Die Untersuchung der Spezifität der  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugate erfolgte in vitro und in vivo stets im Vergleich zu nicht antigenspezifischen Kontrollantikörpern ( $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk). Darüber hinaus wurde die therapeutische Effizienz und Toxizität des  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugats mit in der Literatur beschriebenen  $\alpha$ -Emitter  $^{213}\text{Bi}$  gekoppeltem d9MAk verglichen.

In vitro wurde die spezifische Bindung des  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugats an d9-E-Cadherin exprimierende Tumorzellen gegenüber  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk signifikant nachgewiesen. Die Inkubation des  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk in Humanserum zeigte nach 3 d eine um ca.  $\frac{1}{4}$  verminderte Bindungsstabilität, die aber im weiteren Verlauf unverändert blieb. Mittels der Biodistributionsstudien wurde nach i.p. und i.v. Applikation der  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugate die spezifische Bindung des  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk auch in vivo festgestellt, da die  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration im Tumor bei  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk deutlich höher war als bei  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk. Die i.p. Applikation des  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk führte zu deutlich stärkeren  $^{177}\text{Lu}$ -Retentionen im Tumor als die i.v. Applikation, weshalb die lokoregionale Applikation für die RIT der Peritonealkarzinose zu präferieren ist. Die Konzentration von i.p. bzw. i.v. appliziertem  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk im Blut war im Verlauf einer Woche, entsprechend einer HWZ von  $^{177}\text{Lu}$ , relativ hoch. Die höchste Strahlendosis wurde in Leber und Niere ermittelt.

Die höchste therapeutische Effizienz, die in Abhängigkeit von der applizierten Aktivität bei Mäusen mit unterschiedlichem Tumorstadium (1 d bzw. 8 d nach Tumorzellinokulation) erfasst wurde, erzielte die i.p. Therapie mit 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk 1 d nach Tumorzellinokulation. Das tumorfreie Überleben dieser Tiere war dabei mit 238 d deutlich länger als bei untherapierten Kontrolltieren (21 d) bzw. bei Applikation von 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk (47 d). Die i.p. Therapie am 8. Tag nach Tumorzellinokulation verlängerte das Überleben der Tiere auf 69 d bei  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk gegenüber 31 d bei  $^{177}\text{Lu}$ -d8MAk.

Die i.p. Applikation von 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk verkürzte das Überleben der Tiere drastisch im Vergleich zur 7,4 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Applikation. Zugleich waren die Leuko- bzw. Erythrozytenzahlen, die in Abhängigkeit von der i.p. applizierten Aktivität ermittelt wurden, bei 14,8 MBq am niedrigsten und erholten sich am langsamsten ohne den Ausgangswert zu erreichen.  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivitäten bis 7,4 MBq führten dagegen nur zu einem temporären Abfall der Leukozyten. 14,8 MBq  $^{177}\text{Lu}$  wurde daher als maximal tolerierbare Aktivität (MTA) für die RIT mit  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugaten angenommen.

Etwa 3 bis 4 Monate nach Applikation von 7,4 MBq bzw. 14,8 MBq der  $^{177}\text{Lu}$ -Immunkonjugate war bei einzelnen Mäusen eine auffällige Lymphknotenschwellung zu beobachten, deren histopathologische Untersuchung ein lymphoblastisches Lymphom ergab. Eine derartige maligne Gewebeveränderung war als strahleninduzierte Spätwirkung zu werten und ist demnach auch bei höchster therapeutischer Effizienz des  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugats nicht auszuschließen.

Nach Literaturangaben wurde im gleichen Tumormodell die höchste therapeutische Effizienz i.p. applizierter  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk Konjugate ebenfalls bei Therapie 1 d nach Tumorzellinokulation erzielt, wodurch das Überleben der Tiere im Vergleich zu nicht therapierten Tieren auch hier deutlich verlängert wurde. Allerdings war der Unterschied im Überleben nach  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk bzw.  $^{213}\text{Bi}$ -d8MAk Applikation nicht signifikant. Dies könnte aber durch eine Erhöhung der spezifischen Aktivität der  $^{213}\text{Bi}$ -Immunkonjugate erreicht werden. Da bei allgemein sehr guter Verträglichkeit keine strahleninduzierten malignen Pathologien bei  $^{213}\text{Bi}$ -Immunkonjugaten beobachtet wurden, sollten  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAk Konjugate den  $^{177}\text{Lu}$ -d9MAk Konjugaten für die klinische Anwendung vorgezogen werden. Als optimaler Therapiezeitpunkt wäre dabei z. B. die lokoregionale Applikation im unmittelbaren Anschluss an eine chirurgische Primärtherapie zu empfehlen.

## 7 Literaturverzeichnis

Alvarez RD, Partridge EE, Khazaeli MB, Plott G, Austin M, Kilgore L, Russell CD, Liu T, Grizzle WE, Schlom J, LoBuglio AF, Meredith RF. Intraperitoneal radioimmunotherapy of ovarian cancer with  $^{177}\text{Lu}$ -CC49: a phase I/II study. *Gynecol Oncol.* 65 (1997) 94-101

Anver MR, Haines DC. Gerontology. *In: The Laboratory Mouse.* Elsevier Academic Press. London, 2004, 327-349

Beck R, Seidl C, Pfof B, Morgenstern A, Schwaiger M, Senekowitsch-Schmidtke R.  $^{213}\text{Bi}$ -Radioimmunotherapy defeats (early stage) disseminated gastric cancer in nude mice. Manuskript eingereicht bei *Clin Cancer Res.* (2006)

Becker KF, Kremmer E, Eulitz M, Becker I, Handschuh G, Schuhmacher C, Muller W, Gabbert HE, Ochiai A, Hirohashi S, Hofler H. Analysis of E-cadherin in diffuse-type gastric cancer using a mutation-specific monoclonal antibody. *Am J Pathol.* 155 (1999) 1803-1809

Behr TM, Becker WS, Sharkey RM, Juweid ME, Dunn RM, Bair HJ, Wolf FG, Goldenberg DM. Reduction of renal uptake of monoclonal antibody fragments by amino acid infusion. *J Nucl Med.* 37 (1996) 829-833

Behr TM, Memtsoudis S, Sharkey RM, Blumenthal RD, Dunn RM, Gratz S, Wieland E, Nebendahl K, Schmidberger H, Goldenberg DM, Becker W. Experimental studies on the role of antibody fragments in cancer radio-immunotherapy: Influence of radiation dose and dose rate on toxicity and anti-tumor efficacy. *Int J Cancer.* 77 (1998) 787-795

Behr TM, Sharkey RM, Sgouros G, Blumenthal RD, Dunn RM, Kolbert K, Griffiths GL, Siegel JA, Becker WS, Goldenberg DM. Overcoming the nephrotoxicity of radiometal-labeled immunoconjugates: improved cancer therapy administered to a nude mouse model in relation to the internal radiation dosimetry. *Cancer.* 80 (1997) 2591-2610

Bloechl S, Beck R, Seidl C, Morgenstern A, Schwaiger M, Senekowitsch-Schmidtke R. Fractionated locoregional low-dose radioimmunotherapy improves survival in a mouse model of diffuse-type gastric cancer using a  $^{213}\text{Bi}$ -conjugated monoclonal antibody. *Clin Cancer Res.* 11 (2005) 7070s-7074s

Borchardt PE, Quadri SM, Freedman RS, Vriesendorp HM. Intraperitoneal radioimmunotherapy with human monoclonal IGM in nude mice with peritoneal carcinomatosis. *Cancer Biother Radiopharm.* 15 (2000) 53-64

Breitz HB. How far have we come with solid (nonhematologic) tumor radioimmunotherapy? *J Nucl Med.* 41 (2000) 2011-2014

Brouwers AH, van Eerd JE, Frielink C, Oosterwijk E, Oyen WJ, Corstens FH, Boerman OC. Optimization of radioimmunotherapy of renal cell carcinoma: labeling of monoclonal antibody cG250 with  $^{131}\text{I}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ , or  $^{186}\text{Re}$ . *J Nucl Med.* 45 (2004) 327-337

Brown RP, Delp MD, Lindstedt SL, Rhomberg LR, Beliles RP. Physiological parameter values for physiologically based pharmacokinetic models. *Toxicol Ind Health.* 13 (1997) 407-484

Cronkite EP. Radiosensitivity of lymphocytes. *Strahlenschutz Forsch Prax.* 13 (1973) 13-23

- de Jong M, Barone R, Krenning E, Bernard B, Melis M, Visser T, Gekle M, Willnow TE, Walrand S, Jamar F, Pauwels S. Megalin is essential for renal proximal tubule reabsorption of  $^{111}\text{In}$ -DTPA-octreotide. *J Nucl Med.* 46 (2005) 1696-1700
- Duncan JR, Stephenson MT, Wu HP, Anderson CJ. Indium-111-diethylenetriaminepentaacetic acid-octreotide is delivered in vivo to pancreatic, tumor cell, renal, and hepatocyte lysosomes. *Cancer Res.* 57 (1997) 659-671
- Fritz-Niggli H. *Strahlengefährdung/Strahlenschutz.* Hans Huber Verlag Bern, 1997, 4. Auflage
- Fukudome Y, Yanagihara K, Takeichi M, Ito F, Shibamoto S. Characterization of a mutant E-cadherin protein encoded by a mutant gene frequently seen in diffuse-type human gastric carcinoma. *Int J Cancer.* 88 (2000) 579-583
- Gordon LI, Witzig T, Molina A, Czuczman M, Emmanouilides C, Joyce R, Vo K, Theuer C, Pohlman B, Bartlett N, Wiseman G, Darif M, White C. Yttrium 90-labeled ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy produces high response rates and durable remissions in patients with previously treated B-cell lymphoma. *Clin Lymphoma.* 5 (2004) 98-101
- Henning H, Sicker D, Franz J. *Grundlagen der Chemie für Mediziner.* Johann Ambrosius Barth Verlag Heidelberg, 2000, 6. Auflage
- Howell RW, Rao DV, Sastry KS. Macroscopic dosimetry for radioimmunotherapy: nonuniform activity distributions in solid tumors. *Med Phys.* 16 (1989) 66-74
- Huber R, Seidl C, Schmid E, Seidenschwang S, Becker KF, Schuhmacher C, Apostolidis C, Nikula T, Kremmer E, Schwaiger M, Senekowitsch-Schmidtke R. Locoregional alpha-radioimmunotherapy of intraperitoneal tumor cell dissemination using a tumor-specific monoclonal antibody. *Clin Cancer Res.* 9 (2003) 3922s-3928s
- Huber R. *Bewertung der lokoregionalen Radioimmuntherapie disseminierter Tumorzellen des diffusen Magenkarzinoms mit einem  $^{213}\text{Bi}$  gekoppelten tumorspezifischen Antikörper im Mausmodell.* Dissertation Ludwig-Maximilians-Universität München, 2003
- Imam SK. Advancements in cancer therapy with alpha-emitters: a review. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 51 (2001) 271-278
- Imam SK. Status of radioimmunotherapy in the new millennium. *Cancer Biother Radiopharm.* 16 (2001) 237-256
- Janssen ML, Pels W, Massuger LF, Oyen WJ, Boonstra H, Corstens FH, Boerman OC. Intraperitoneal radioimmunotherapy in an ovarian carcinoma mouse model: Effect of the radionuclide. *Int J Gynecol Cancer.* 13 (2003) 607-613
- Koppe MJ, Bleichrodt RP, Soede AC, Verhofstad AA, Goldenberg DM, Oyen WJ, Boerman OC. Biodistribution and therapeutic efficacy of  $^{125}\text{I}$ -,  $^{186}\text{Re}$ -,  $^{88}\text{Y}$ -, or  $^{177}\text{Lu}$ -labeled monoclonal antibody MN-14 to carcinoembryonic antigen in mice with small peritoneal metastases of colorectal origin. *J Nucl Med.* 45 (2004) 1224-1232
- Koppe MJ, Postema EJ, Aarts F, Oyen WJ, Bleichrodt RP, Boerman OC. Antibody-guided radiation therapy of cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 24 (2005) 539-567
- Koppe MJ, Soede AC, Pels W, Oyen WJ, Goldenberg DM, Bleichrodt RP, Boerman OC. Experimental radioimmunotherapy of small peritoneal metastases of colorectal origin. *Int J Cancer.* 106 (2003) 965-972

- Lewis JS, Wang M, Laforest R, Wang F, Erion JL, Bugaj JE, Srinivasan A, Anderson CJ. Toxicity and dosimetry of  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Y3-octreotate in a rat model. *Int J Cancer*. 94 (2001) 873-877
- Li WP, Ma DS, Higginbotham C, Hoffman T, Ketring AR, Cutler CS, Jurisson SS. Development of an in vitro model for assessing the in vivo stability of lanthanide chelates. *Nucl Med Biol*. 28 (2001) 145-154
- Lordick F, Peschel C, Siewert JR. Antibody-based targeted therapy for gastric cancer. *Gastric Cancer*. 8 (2005) 206-208
- Lordick F, Siewert JR. Recent advances in multimodal treatment for gastric cancer: a review. *Gastric Cancer*. 8 (2005) 78-85
- Macklis RM, Lin JY, Beresford B, Atcher RW, Hines JJ, Humm JL. Cellular kinetics, dosimetry, and radiobiology of alpha-particle radioimmunotherapy: induction of apoptosis. *Radiat Res*. 130 (1992) 220-226
- Milenic DE, Garmestani K, Brady ED, Albert PS, Ma D, Abdulla A, Brechbiel MW. Targeting of HER2 antigen for the treatment of disseminated peritoneal disease. *Clin Cancer Res*. 10 (2004) 7834-7841
- Milenic DE, Garmestani K, Chappell LL, Dadachova E, Yordanov A, Ma D, Schlom J, Brechbiel MW. In vivo comparison of macrocyclic and acyclic ligands for radiolabeling of monoclonal antibodies with  $^{177}\text{Lu}$  for radioimmunotherapeutic applications. *Nucl Med Biol*. 29 (2002) 431-442
- Müller WA, Linzner U, Schaffer EH. Organ distribution studies of lutetium-177 in mouse. *Int J Nucl Med Biol*. 5 (1978) 29-31
- Müller WA, Schaffer EH, Linzner U. Studies on incorporated short-lived beta-emitters with regard to the induction of late effects. *Radiat Environ Biophys*. 18 (1980) 1-11
- Münter M. Strahlenbiologie. *In: Radiologie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 2004, 25-54
- Muta H, Noguchi M, Kanai Y, Ochiai A, Nawata H, Hirohashi S. E-cadherin gene mutations in signet ring cell carcinoma of the stomach. *Jpn J Cancer Res*. 87 (1996) 843-848
- Nikula TK, McDevitt MR, Finn RD, Wu C, Kozak RW, Garmestani K, Brechbiel MW, Curcio MJ, Pippin CG, Tiffany-Jones L, Geerlings MW Sr, Apostolidis C, Molinet R, Geerlings MW Jr, Gansow OA, Scheinberg DA. Alpha-emitting bismuth cyclohexylbenzyl DTPA constructs of recombinant humanized anti-CD33 antibodies: pharmacokinetics, bioactivity, toxicity and chemistry. *J Nucl Med*. 40 (1999) 166-176
- O'Donoghue JA, Bardies M, Wheldon TE. Relationships between tumor size and curability for uniformly targeted therapy with beta-emitting radionuclides. *J Nucl Med*. 36 (1995) 1902-1909
- Postema EJ, Frielink C, Oyen WJ, Raemaekers JM, Goldenberg DM, Corstens FH, Boerman OC. Biodistribution of  $^{131}\text{I}$ -,  $^{186}\text{Re}$ -,  $^{177}\text{Lu}$ -, and  $^{88}\text{Y}$ -labeled hLL2 (Epratuzumab) in nude mice with CD22-positive lymphoma. *Cancer Biother Radiopharm*. 18 (2003) 525-533
- Press OW, Shan D, Howell-Clark J, Eary J, Appelbaum FR, Matthews D, King DJ, Haines AM, Hamann P, Hinman L, Shochat D, Bernstein ID. Comparative metabolism and retention of iodine-125, yttrium-90, and indium-111 radioimmunoconjugates by cancer cells. *Cancer Res*. 56 (1996) 2123-2129

- Riede UN. Störungen der Reizbeantwortung. *In: Allgemeine und spezielle Pathologie.* Georg Thieme Verlag Stuttgart, 2004, 5. Auflage, 117-156
- Rogers BE, Franano FN, Duncan JR, Edwards WB, Anderson CJ, Connett JM, Welch MJ. Identification of metabolites of <sup>111</sup>In-diethylenetriaminepentaacetic acid-monoclonal antibodies and antibody fragments in vivo. *Cancer Res.* 55 (1995) 5714s-5720s
- Rosenberg R, Nekarda H, Bauer P, Schenck U, Hoefler H, Siewert JR. Free peritoneal tumour cells are an independent prognostic factor in curatively resected stage IB gastric carcinoma. *Br J Surg.* 93 (2006) 325-331
- Sadeghi B, Arvieux C, Glehen O, Beaujard AC, Rivoire M, Baulieux J, Fontaumard E, Brachet A, Caillot JL, Faure JL, Porcheron J, Peix JL, Francois Y, Vignal J, Gilly FN. Peritoneal carcinomatosis from non-gynecologic malignancies: results of the EVOCAPE 1 multicentric prospective study. *Cancer.* 88 (2000) 358-363
- Schaefer HE, Müller-Hermelink HK, Rüdiger T, Marx A, Herbst EW, Riede UN. Hämatopoetisches und lymphatisches System. *In: Allgemeine und spezielle Pathologie.* Georg Thieme Verlag Stuttgart, 2004, 5. Auflage, 499-574
- Schipper ML, Weber A, Behe M, Goke R, Joba W, Schmidt H, Bert T, Simon B, Arnold R, Heufelder AE, Behr TM. Radioiodide treatment after sodium iodide symporter gene transfer is a highly effective therapy in neuroendocrine tumor cells. *Cancer Res.* 63 (2003) 1333-1338
- Schlom J, Siler K, Milenic DE, Eggenesperger D, Colcher D, Miller LS, Houchens D, Cheng R, Kaplan D, Goeckeler W. Monoclonal antibody-based therapy of a human tumor xenograft with a <sup>177</sup>Lutetium-labeled immunoconjugate. *Cancer Res.* 51 (1991) 2889-2896
- Schlom J. Basic principles and applications of monoclonal antibodies in the management of carcinomas: the Richard and Hinda Rosenthal Foundation award lecture. *Cancer Res.* 46 (1986) 3225-3238
- Schmitt A, Bernhardt P, Nilsson O, Ahlman H, Kolby L, Schmitt J, Forssel-Aronsson E. Biodistribution and dosimetry of <sup>177</sup>Lu-labeled [DOTA<sup>0</sup>,Tyr<sup>3</sup>]octreotate in male nude mice with human small cell lung cancer. *Cancer Biother Radiopharm* 18 (2003) 593-599
- Schott ME, Milenic DE, Yokota T, Whitlow M, Wood JF, Fordyce WA, Cheng RC, Schlom J. Differential metabolic patterns of iodinated versus radiometal chelated anticarcinoma single-chain Fv molecules. *Cancer Res.* 52 (1992) 6413-6417
- Schott ME, Schlom J, Siler K, Milenic DE, Eggenesperger D, Colcher D, Cheng R, Kruper WJ Jr, Fordyce W, Goeckeler W. Biodistribution and preclinical radioimmunotherapy studies using radiolanthanide-labeled immunoconjugates. *Cancer.* 73 (1994) 993-998
- Seidenschwang S. Untersuchungen zur In-Vitro-Zytotoxizität von <sup>213</sup>Bi-Immunkonjugaten. Dissertation an der Technischen Universität München, 2006
- Seidl C, Schrock H, Seidenschwang S, Beck R, Schmid E, Abend M, Becker KF, Apostolidis C, Nikula TK, Kremmer E, Schwaiger M, Senekowitsch-Schmidtke R. Cell death triggered by alpha-emitting <sup>213</sup>Bi-immunoconjugates in HSC45-M2 gastric cancer cells is different from apoptotic cell death. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 32 (2005) 274-285

- Sendler A, Prinz C, Janetschek P, Becker K, Grützner U, Lordick F, Schuhmacher C, Zimmermann F. Magenkarzinom. *In: Manual Gastrointestinale Tumoren*, W. Zuckschwerdt Verlag, München, Wien, New York, 2006, 7. Auflage, 1-273
- Sendler A, Siewert JR. Individualizing therapy in gastric cancer. *Expert Rev Anticancer Ther.* 3 (2003) 457-470
- Senekowitsch-Schmidtke R, Schuhmacher C, Becker KF, Nikula TK, Seidl C, Becker I, Miederer M, Apostolidis C, Adam C, Huber R, Kremmer E, Fischer K, Schwaiger M. Highly specific tumor binding of a <sup>213</sup>Bi-labeled monoclonal antibody against mutant E-cadherin suggests its usefulness for locoregional alpha-radioimmunotherapy of diffuse-type gastric cancer. *Cancer Res.* 61 (2001) 2804-2808.
- Siewert JR, Lordick F, Ott K, Brucher BL, Rosenberg R. Therapeutische Strategien bei lokoregionalen Rezidiven gastrointestinaler Tumoren. Palliation oder Kuration?. *Chirurg.* 77 (2006) 227-235
- Siewert JR, Sendler A. The current management of gastric cancer. *Adv Surg.* 33 (1999) 69-93
- Stein R, Govindan SV, Chen S, Reed L, Richel H, Griffiths GL, Hansen HJ, Goldenberg DM. Radioimmunotherapy of a human lung cancer xenograft with monoclonal antibody RS7: evaluation of <sup>177</sup>Lu and comparison of its efficacy with that of <sup>90</sup>Y and residualizing <sup>131</sup>I. *J Nucl Med.* 42 (2001) 967-974
- Stewart BW, Kleihues P. *World Cancer Report*. Lyon: WHO International Agency for Research on Cancer 2003, 1-351
- Stimmel JB, Kull FC Jr. Samarium-153 and lutetium-177 chelation properties of selected macrocyclic and acyclic ligands. *Nucl Med Biol.* 25 (1998) 117-125
- Sugarbaker PH, Yonemura Y. Clinical pathway for the management of resectable gastric cancer with peritoneal seeding: best palliation with a ray of hope for cure. *Oncology.* 58 (2000) 96-107
- van Eerd JE, Vegt E, Wetzels JF, Russel FG, Masereeuw R, Corstens FH, Oyen WJ, Boerman OC. Gelatin-based plasma expander effectively reduces renal uptake of <sup>111</sup>In-octreotide in mice and rats. *J Nucl Med.* 47 (2006) 528-533
- Vegt E, Wetzels JF, Russel FG, Masereeuw R, Boerman OC, van Eerd JE, Corstens FH, Oyen WJ. Renal uptake of radiolabeled octreotide in human subjects is efficiently inhibited by succinylated gelatin. *J Nucl Med.* 47 (2006) 432-436
- Volkert WA, Goeckeler WF, Ehrhardt GJ, Ketring AR. Therapeutic radionuclides: production and decay property considerations. *J Nucl Med.* 32 (1991) 174-185
- Waldmann TA, Strober W. Metabolism of immunoglobulins. *Prog Allergy.* 13 (1969) 1-110
- Yanagihara K, Ito A, Toge T, Numoto M. Antiproliferative effects of isoflavones on human cancer cell lines established from the gastrointestinal tract. *Cancer Res.* 53 (1993) 5815-5821

## Lebenslauf

Christine Anne Zöckler, geborene Koitzsch, geboren am 11.12.1975 in Räckelwitz

Schulbildung:	1981 – 1990	Sorbische Schule in Bautzen
	1990 – 1994	Sorbisches Gymnasium in Bautzen
Berufsausbildung:	1995 – 1998	Ausbildung zur Physiotherapeutin an der Medizinischen Berufsfachschule Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden
Studium:	1999 – 2001	Grundstudium der Humanmedizin an der Universität Leipzig
	2001 – 2005	Hauptstudium der Humanmedizin an der Technischen Universität München
	21.11.2005	Approbation als Ärztin
Dissertation:	2003 – 2006	Doktorandin an der Nuklearmedizinischen Klinik und Poliklinik am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München bei Frau Prof. Dr. Dr. Senekowitsch-Schmidtke
Berufstätigkeit:	seit 07/2006	Assistenzärztin in der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe an der Kreisklinik Altötting

