

**TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN**

**Nuklearmedizinische Klinik**

**Klinikum rechts der Isar**

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

**Untersuchungen zur intraperitonealen  
Retention von Fab'-, IgG- und IgM-  
Radioimmunkonjugaten**

Christian Rauch

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

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Dr. R. Senekowitsch-Schmidtke
2. Priv.-Doz. Dr. A. K. Buck

Die Dissertation wurde am 11.12.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Medizin am 29.04.2009 angenommen.

Meinen Eltern

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>5</b>
1.1	Die Peritonealkarzinose .....	5
1.1.1	Epidemiologie .....	5
1.1.2	Stadien der Peritonealkarzinose .....	6
1.1.3	Krankheitsverlauf.....	6
1.1.4	Diagnose der Peritonealkarzinose .....	7
1.1.5	Therapie.....	7
1.2	Die Radioimmuntherapie .....	8
1.2.1	Transportmoleküle für die Radionuklid beziehungsweise Radioimmuntherapie.....	9
1.2.2	Geeignete Radionuklide für die Radioimmuntherapie/Radionuklidtherapie.....	11
1.2.2.1	Auger-Elektronen-Emitter.....	11
1.2.2.2	$\beta$ -Strahler.....	12
1.2.2.3	$\alpha$ -Strahler.....	12
1.2.3	Kopplung von Radionukliden an die Trägermoleküle .....	13
1.2.4	Radioimmuntherapie und Radionuklidtherapie mit $\alpha$ -Strahlern .....	14
<b>2</b>	<b>Zielsetzung .....</b>	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>17</b>
3.1	Materialien.....	17
3.1.1	Chemikalien und Medikamente .....	17
3.1.2	Lösungen .....	18
3.1.2.1	Anästhesie .....	18
3.1.2.2	Zellkultur.....	18
3.1.3	Geräte .....	18
3.1.4	Antikörper .....	19
3.1.4.1	Anti-delta 9-E-Cadherin Fab'-Fragmente.....	19
3.1.4.2	IgM-Antikörper.....	19
3.1.4.3	IgG-Antikörper.....	19
3.1.5	Bovines Serumalbumin (BSA).....	19
3.1.6	Radionuklide .....	19
3.1.6.1	Wismut-213 ( $^{213}\text{Bi}$ ) .....	19
3.1.6.2	$^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generator.....	20
3.1.6.3	Indium-111 ( $^{111}\text{In}$ ) .....	21
3.1.7	Magenkarzinomzelllinie HSC45-M2.....	21
3.2	Methoden.....	21
3.2.1	Chelatierung der Antikörper.....	21
3.2.2	Eluierung von $^{213}\text{Bi}$ aus dem $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generator .....	22
3.2.3	Radionuklidmarkierung der chelatierten Antikörper und Fragmente .....	22
3.2.3.1	Markierung mit $^{213}\text{Bi}$ .....	22
3.2.3.2	Markierung mit $^{111}\text{In}$ .....	23
3.2.4	Analyse der Stabilität von $^{213}\text{Bi}$ -IgM-Konjugaten in PBS und Serum und Analyse der Bindung von $^{213}\text{Bi}$ an Proteine des Serums.....	23
3.2.5	Kultivierung der Zellen.....	23
3.2.6	Bindungstests für die Radioimmunkonjugate .....	24
3.2.7	Klonogene Tests zur Ermittlung der Toxizität der $^{213}\text{Bi}$ - Radioimmunkonjugate.....	24
3.3	Tierexperimente .....	25
3.3.1	Versuchstiere und Haltung .....	25
3.3.2	Anästhesie und Tötung.....	25
3.3.3	Peritonealkarzinosemodell.....	26
3.3.3.1	Induktion der Peritonealkarzinose.....	26

3.3.3.2	Darstellung der Karzinose.....	26
3.3.3.2.1	In-Vivo-Kernspintomographie.....	26
3.3.3.2.2	In-Vivo-Positronenemissionstomographie.....	26
3.3.4	Biodistribution der Radioimmunkonjugate in der Maus.....	27
3.3.4.1	Ermittlung der Organverteilung.....	27
3.3.4.2	Analyse der Kinetik mittels Szintigraphie.....	28
3.3.4.3	Ermittlung der Ausscheidung der Radioimmunkonjugate mittels Bestimmung der Ganzkörperaktivität.....	29
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>30</b>
4.1	Qualitätskontrolle nach Eluierung beziehungsweise Kopplung der Radionuklide.....	30
4.2	Bindung von <sup>213</sup> Bi-IgM und <sup>213</sup> Bi-Fab' an HSC45-M2-Zellen.....	30
4.3	Klonogener Test zur Ermittlung der Toxizität von <sup>213</sup> Bi-Fab' und <sup>213</sup> Bi-BSA gegen HSC45-M2-Zellen.....	31
4.4	Stabilität von <sup>213</sup> Bi-IgM in Serum.....	33
4.5	Bindung von Bi-213 an Proteine des Serums.....	34
4.6	Tierexperimente.....	35
4.6.1	Induktion der Peritonealkarzinose.....	35
4.6.2	Techniken zur In-vivo-Darstellung der Tumoren.....	36
4.6.2.1	In-Vivo-Kernspintomographie.....	36
4.6.2.2	In-Vivo-Positronenemissionstomographie.....	36
4.6.3	Biodistribution der Radioimmunkonjugate in der Maus.....	37
4.6.3.1	Organverteilung von <sup>213</sup> Bi-Fab'.....	37
4.6.3.2	Organverteilung von <sup>213</sup> Bi-IgM / <sup>111</sup> In-IgM nach i.p.- Injektion.....	38
4.6.3.3	Organverteilung von <sup>213</sup> Bi-IgG / <sup>111</sup> In-IgG nach i.p.- Injektion.....	41
4.6.3.4	Organverteilung von <sup>111</sup> In-IgM nach i.v. Injektion im Vergleich zur i.p. Injektion.....	42
4.6.3.5	Organverteilung von <sup>111</sup> In-IgG nach i.v. Injektion im Vergleich zur i.p. Injektion.....	43
4.6.3.6	Vergleich der Organverteilung von <sup>111</sup> In-IgM und <sup>111</sup> In-IgG nach i.v. Injektion.....	43
4.6.3.7	Beobachtung der Kinetik mittels Szintigraphie.....	44
4.6.4	Ganzkörperausscheidung der Radioimmunkonjugate.....	48
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>50</b>
5.1	Peritonealkarzinosemodell.....	50
5.2	Biokinetik und Bindungseigenschaften der Antikörper beziehungsweise Antikörperfragmente.....	51
5.2.1	Biokinetik und Bindungseigenschaften von <sup>213</sup> Bi/ <sup>111</sup> In-Fab'.....	51
5.2.2	Biokinetik und Bindungseigenschaften von <sup>213</sup> Bi/ <sup>111</sup> In-IgM.....	55
5.2.3	Vergleich der Biokinetik von <sup>213</sup> Bi/ <sup>111</sup> In-IgM und <sup>213</sup> Bi/ <sup>111</sup> In-IgG.....	57
5.3	Überlegungen zur Therapie disseminierter Tumorzellen im Peritoneum.....	58
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>65</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>75</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>77</b>

# 1 Einleitung

Tumorerkrankungen stellen in Deutschland nach Erkrankungen des Herz- und Kreislaufsystems die 2. häufigste Todesursache dar (Statistisches Bundesamt, Todesursachenstatistik, 2005). Zirka jeder Vierte stirbt an den Folgen einer Tumorerkrankung. Die malignen Tumoren der Verdauungsorgane sind sowohl bei Frauen als auch bei Männern die häufigste Tumorerkrankung und für ungefähr ein Drittel der Todesfälle in der Gruppe der Neubildungen verantwortlich. Die Tendenz von Tumorzellen zur Ausbildung von Metastasen über den Blutweg, das Lymphsystem oder auch per continuitatem erschwert eine erfolgreiche Therapie. Das Vorhandensein von Fernmetastasen bei der Diagnose einer Tumorerkrankung stellt somit einen entscheidenden prognostischen Faktor dar und ist zumeist mit einer deutlich schlechteren Prognose verbunden. Neben den von Fernmetastasen häufig befallenen Organen, wie Gehirn, Knochen, Leber und Lunge, metastasieren bei bestimmten Tumorentitäten Tumorzellen auch in das Peritoneum. Die so genannte Peritonealkarzinose stellt eine große Herausforderung für die Therapie dar.

## 1.1 Die Peritonealkarzinose

### 1.1.1 Epidemiologie

Die Peritonealkarzinose wurde zuerst im Jahre 1931 von Sampson beschrieben. Er beobachtete die Entstehung als Folge einer regionalen Tumorzellstreuung beim Ovarialkarzinom. Heute ist bekannt, dass die Peritonealkarzinose auch beim Magenkarzinom, beim Pankreaskarzinom und beim kolorektalen Adenokarzinom auftritt. Sie entsteht sehr wahrscheinlich durch kavitäre Metastasierung, wobei der genaue Mechanismus der Streuung der Tumorzellen nicht bekannt ist. Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer Peritonealkarzinose ist auch abhängig von der Art des Primärtumors. Beispielsweise ist die Inzidenz für ein peritoneales Rezidiv beim kolorektalen Karzinom aufgrund eines geringen peritonealen Metastasierungspotentials viel niedriger als beim Magenkarzinom [Hara et al., 2007]. Daneben wird eine Peritonealkarzinose auch bei nichtabdominalen Tumoren wie dem Mammakarzinom und dem Melanom als Folge einer Fernmetastasierung beobachtet. In vielen Fällen einer Peritonealkarzinose kann jedoch der Primärtumor nicht diagnostiziert werden. Man spricht dann vom so genannten „cancer of unknown primary“ (CUP). In seltenen Fällen treten auch neoplastische Läsionen des Peritoneums auf, wie das peritoneale maligne Mesotheliom, die mesenteriale Fibromatose oder das Pseudomyxoma peritonei. Diese Neubildungen des Peritoneums haben jeweils eine unterschiedliche Prognose, die von sehr gut bis sehr schlecht reicht. Die Prognose von Patienten, die an Peritonealkarzinose als Folge disseminierter Tumorzellen erkrankt sind, ist relativ

schlecht. Je nach Erkrankungsstadium und zu Grunde liegendem Primärtumor ergibt sich ein Überleben von 0,1 bis 48 Monaten. Im Mittel beträgt es allerdings nur etwa 6 Monate [Sadeghi et al., 2000].

Eine Peritonealkarzinose kann auch durch eine peritoneale Ausbreitung von Tumorzellen im Verlauf einer kurativen Resektion eines Primärtumors entstehen: Zum einen können sich dabei freie Tumorzellen von serosalen Oberflächen ablösen, zum anderen können durch die Manipulation des Tumors im Zuge der Resektion Krebszellen freigesetzt werden.

### 1.1.2 Stadien der Peritonealkarzinose

Nach Gilly et al. [1994] wird die Peritonealkarzinose im Hinblick auf Ausbreitung und Dimension in 4 Stadien eingeteilt. Im Stadium 0 ist keine makroskopisch sichtbare Erkrankung vorhanden. Im Stadium I und II liegen Tumorknoten kleiner als 5 mm vor, wobei diese im Stadium I auf eine abdominale Region begrenzt sind und im Stadium II diffus über das gesamte Abdomen verteilt sind. Stadium III stellt Tumorknoten mit einem Durchmesser von 5 mm bis 2 cm dar. Im Stadium IV schließlich kommen Tumorplatten mit einer Ausdehnung größer als 2 cm vor (Tab. 1).

Stadium	Beschreibung der Peritonealkarzinose
Stadium 0	nicht makroskopisch sichtbar
Stadium I	< 5 mm, eine abdominelle Region
Stadium II	< 5 mm, diffus
Stadium III	5 mm bis 2 cm
Stadium IV	große Tumorplatte (> 2 cm)

**Tab. 1: Stadien der Peritonealkarzinose nach Gilly [1994]**

Von Bedeutung für die Wahl des geeigneten Therapieverfahrens ist, ob die Patienten noch im Stadium 0 oder schon in Stadium I sind. Im Stadium 0 sind die Tumorzellen, im Gegensatz zu Stadium I, nicht vaskularisiert.

### 1.1.3 Krankheitsverlauf

Nach der Einwanderung von Tumorzellen in die Peritonealhöhle setzen sich die Zellen dort fest und entwickeln sich zu makroskopisch sichtbaren Tumoren. Wird die Krankheit klinisch manifest kann es zur Entwicklung eines Subileus beziehungsweise eines Ileus und/oder von Aszites kommen. Durch fortschreitendes, verdrängendes beziehungsweise invasives Wachstum der Tumorzellmassen im Abdomen kommt es schließlich zur Darmobstruktion. Dies erfordert eine chirurgische Resektion des obstruierenden Darmabschnittes [Sadeghi et al.,

2000]. Der maligne Aszites beruht auf einem Ungleichgewicht zwischen Ein- und Ausstrom von Flüssigkeit am Peritoneum. Der erhöhte Influx wird vor allem durch die Ausschüttung von VEGF (vascular endothelial growth factor) durch Krebszellen induziert. Die Reduktion des Flüssigkeitsausstroms wird bedingt durch die Obstruktion der Lymphgefäße des Peritoneums durch die Tumorzellen. Die in diesen Stadien rein palliative Behandlung umfasst hier Parazentese, perito-venöse Shunts sowie systemische und intraperitoneale Chemotherapie [Adam et al., 2004]. Schließlich versterben die Patienten innerhalb kurzer Zeit.

#### 1.1.4 Diagnose der Peritonealkarzinose

Da es sich bei einem peritonealen Tumor meistens um eine Metastase handelt, fallen die Patienten durch Symptome des zugrunde liegenden Primärtumors (kolorektales Adenokarzinom, Magenkarzinom, Ovarialkarzinom, Pankreaskarzinom) auf. Symptome die von einer peritonealen Dissemination des Primärtumors verursacht werden können, wie abdominale Schmerzen oder zunehmende Obstipation, treten in frühen Stadien der Peritonealkarzinose oftmals noch nicht auf. Vielmehr wird der Befall des Bauchfells erst im Zuge der chirurgischen Entfernung des Primärtumors entdeckt. Für eine effektive Therapie ist es von großer Bedeutung, die Peritonealkarzinose in einem sehr frühen Stadium zu diagnostizieren. Mit nicht invasiven Methoden wie der Sonographie sowie der Computertomographie sind Tumorknoten erst ab einem Durchmesser von 2 cm beziehungsweise 5 mm detektierbar [Weill et al., 1990]. Die Laparoskopie mit Charakterisierung der darin vorhandenen Zellen und gegebenenfalls Biopsie ist der effektivste Weg der Diagnose. Aufgrund des minimal invasiven Eingriffs besteht jedoch die Gefahr, dass maligne Zellen in die Bauchhöhle austreten [Ketcham et al., 1970, Sheperd et al., 1995, Tarazona et al. 1998]. Die im Rahmen der chirurgischen Resektion des Primärtumors durchgeführte Peritoneallavage bietet eine gute Möglichkeit zur Diagnose disseminierter Tumorzellen.

#### 1.1.5 Therapie

Die Therapie der Peritonealkarzinose stellt eine große Herausforderung dar. So stellt die chirurgische Resektion von Tumorgewebe im fortgeschrittenen Stadium der Krankheit oft nur noch eine palliative Maßnahme dar. Die systemische Chemotherapie wird abhängig von der Primärtumorart, mit dem jeweilig aktuellen Therapieregime, eingesetzt. Deren Wirksamkeit ist in der Regel begrenzt, da die Konzentrationen des zytotoxischen Therapeutikums in der Bauchhöhle, bedingt durch die Art der Applikation, gering sind. Zudem sind disseminierte Tumorzellen, die nicht vaskularisiert sind, mit systemischer Chemotherapie nicht zu erreichen. Die intraperitoneale Chemotherapie ermöglicht weitaus höhere Konzentrationen des

Therapeutikums in der Bauchhöhle und verspricht somit eine bessere therapeutische Effizienz. Bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom konnte mit einer Kombination aus intravenöser und intraperitonealer Chemotherapie eine Verlängerung des medianen Überlebens von 49,7 auf 65,6 Monate im Vergleich zu nur intravenös chemotherapierten Patientinnen erreicht werden [Armstrong et al., 2006]. Ein weiteres multimodales Konzept zur Therapie der Peritonealkarzinose basiert auf Arbeiten von Sugarbaker [1995]. Es verbindet die elektrochirurgische Resektion befallener Bauchfellanteile mit einer hyperthermen intraperitonealen Chemotherapie (HIPEC). Durch Erwärmung des Zytostatikums auf 40°C soll der zytostatische Effekt verstärkt und das Erreichen tiefer liegender Tumorzellschichten verbessert werden.

Die therapeutische Effizienz der Chemotherapie ist einerseits abhängig von der Zellzyklusphase in der sich die Tumorzelle befindet andererseits vom Grad der Hypoxie der Zellen. Die Effizienz einer Chemotherapie wird durch die so genannte „multi drug resistance“ von Tumorzellen, bei der die zytotoxischen Stoffe bevor sie wirken können wieder aus der Zelle ausgeschleußt werden, stark vermindert.

Einen neuen Ansatz bietet der Einsatz von Antikörpern zur Therapie. In der klinischen Entwicklung sind derzeit so genannte trifunktionale Antikörper. Diese können mit 3 unterschiedliche Bindungsstellen, das heißt auch am Fc Teil, eine Tumorzelle, eine T-Zelle und eine akzessorische Zelle (Makrophage, dendritische Zelle, natürliche Killerzelle (NK Zelle)) binden und so eine verstärkte Immunantwort gegen Tumoren erreichen. Die trifunktionalen Antikörper gegen EpCAM und CD3 beziehungsweise Her2/neu und CD3 wurden von Heiss et al. [2005] bereits erfolgreich, im Sinne eines Parazentese freien Weiterlebens, bei Patienten mit malignem Aszites aufgrund einer Peritonealkarzinose angewendet. Ein weiteres viel versprechendes Verfahren zur Therapie der Peritonealkarzinose ist die Radioimmuntherapie. Im Tiermodell [Borchardt et al., 2000, Milenic et al., 2005, Qu et al., 2005, Elgqvist et al., 2006, Beck et al., 2007] zerstören Konjugate aus tumorspezifischen Antikörpern und Radionuklid nach i.p. Applikation gezielt einzelne Tumorzellen oder kleinere Tumorzellcluster. Versuche zur Anwendung von IgM-Radioimmunkonjugaten zur Therapie einer Peritonealkarzinose werden in der vorliegenden Arbeit untersucht und diskutiert.

## **1.2 Die Radioimmuntherapie**

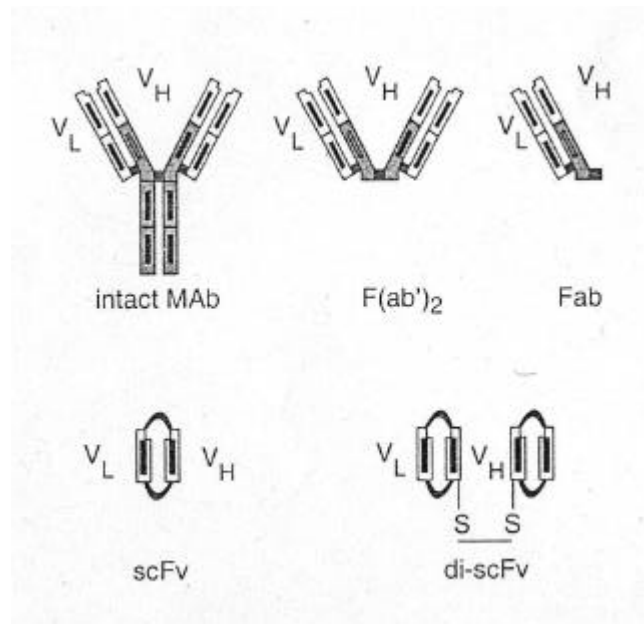
Die Radioimmuntherapie als innovatives Verfahren für die Therapie verschiedener Tumorerkrankungen befindet sich im Fokus nuklearmedizinischer Forschung. Beim Menschen wird Radioimmuntherapie bei Leukämien und beim multiplen Myelom vor der Stammzelltransplantation, beziehungsweise bei Non-Hodgkin-Lymphomen und bei neuroendokrinen Tumo-



ren eingesetzt. Bei den eingesetzten Antikörpern unterscheidet man tumorspezifische Antikörper, die ausschließlich an Tumorzellen binden von tumorassoziierten Antikörpern deren Zielantigen vermehrt auf Tumorzellen, aber auch auf anderen Zellen des menschlichen Organismus vorkommt. Der Einsatz von Radioimmuntherapie mit Radioimmunkonjugaten bestehend aus  $\alpha$ -Strahlern wird unter anderem im Rahmen von klinischen Studien am Menschen untersucht [Jurcic et al. 2002, Allen et al., 2005, Zalutsky, 2005]. Die Untersuchung von neuen Radioimmunkonjugaten im Hinblick auf ihre therapeutische Effizienz und deren Einsatz ist Gegenstand der aktuellen Forschung [Imam et al., 2001, Couturier et al., 2005, Goldenberg et al., 2006].

### 1.2.1 Transportmoleküle für die Radionuklid beziehungsweise Radioimmuntherapie

Als Transportmoleküle für die Radioimmuntherapie werden Antikörper beziehungsweise verschiedene Antikörperfragmente eingesetzt. Das klassische Transportmolekül für Radionuklide in der Radioimmuntherapie stellen monoklonale Antikörper der Klasse IgG dar. Das nächst kleinere Molekül ist das  $F(ab')_2$ -Fragment. Es besteht aus zwei mittels Disulfidbrücken verbundenen Fab-Fragmenten und wird durch Pepsin-Spaltung hergestellt.  $F(ab')_2$ -Fragmente besitzen wie intakte Antikörper zwei Antigenbindungsstellen (Abb. 1). Fab'-Fragmente, hergestellt mittels Papain-Spaltung beziehungsweise gentechnisch, besitzen ein Molekulargewicht von zirka 50 kDa und bestehen aus der leichten Kette ( $V_L + C_L$ ) sowie dem  $V_H + C_H1$  Teil der schweren Kette eines IgG-Antikörpers. Die Biodistribution eines Fab'-Fragments wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht. Antikörperfragmente mit dem geringsten Molekulargewicht sind gentechnisch hergestellte single-chain Fv (scFv) Fragmente (Abb. 1) (Molekulargewicht zirka 25 kDa), die nur aus den variablen Domänen der schweren und der leichten Kette bestehen, die über einen Peptidlinker verbunden sind. Die Penetration dieser Moleküle (spezifisch gegen Kolonkarzinomzellen) in subkutane Tumoren aus Kolonkarzinomzellen bei Mäusen wurde unter anderem von Yokota et al. [1992] untersucht. Das scFv zeigt schon 0,5 Stunden p.i. die tiefste Tumorpenetration, die von einem intakten IgG Antikörper erst 48 bis 96 Stunden nach Injektion erreicht wird [Yokota et al., 1992]. Des Weiteren werden auch noch kleinere Moleküle als mögliche Transporter untersucht. Durch den Einsatz kleinerer Moleküle soll eine bessere Penetration in solide Tumorgewebe erreicht werden. Eingesetzt werden hier unter anderem Biotin bei Mäusen mit subkutanen Tumoren bestehend aus humanen Epidermoidkarzinomzellen [Yao et al., 2004] oder Plasminogen Aktivator Inhibitor Typ 2 (PAI2) bei mit Pankreaskarzinomzellen xenotransplantierten Mäusen [Qu et al., 2005].



**Abb. 1: Struktur von Antikörper (*IgG*) und Antikörperfragmenten zum Einsatz als Transportmolekül in der Radioimmuntherapie (Einzelheiten siehe Text) [Senekowitsch-Schmidtke, 2000].**

Die größten Antikörpermoleküle sind *IgM*-Antikörper. Sie bestehen aus fünf *IgG*-Molekülen (Abb. 2) und werden für disseminierte Tumorzellen eingesetzt. Aufgrund ihrer Größe sind *IgM*-Antikörper nicht für die Therapie solider Tumoren geeignet, da sie mehrschichtige Tumorgewebe nicht durchdringen können.



**Abb. 2: Antikörper der Klasse *IgG* und *IgM*. *IgM* ist ein Pentamer bestehend aus fünf *IgG* Molekülen.**

Zytotoxizität und Biodistribution von *IgM*-Radioimmunkonjugaten wurden in dieser Arbeit untersucht.

## 1.2.2 Geeignete Radionuklide für die Radioimmuntherapie/Radionuklidtherapie

Die Auswahl des geeigneten Radionuklids wird bestimmt durch das Behandlungsziel. Zur Therapie solider Tumoren werden  $\beta$ -Strahler mit einer Reichweite im Bereich von einigen Millimetern verwendet. Damit können aufgrund des Crossfire-Effekts auch Zellen eliminiert werden an die das Radioimmunkonjugat nicht bindet, die sich entweder im Zentrum des Tumors befinden oder die das Zielantigen gar nicht exprimieren [Imam, 2001]. Zur Abtötung von Einzelzellen oder aus wenigen Zellen bestehenden Mikrometastasen sind  $\alpha$ -Emitter mit geringer Reichweite sowie mit hohem linearem Energietransfer (LET) und hoher relativer biologischer Wirksamkeit (RBW) besser geeignet [Imam, 2001, Mattes, 2002]. Neben Qualität der Strahlung und Energie der Strahlung sind die Halbwertszeit [Srivastava, 1996] sowie die Zerfallsprodukte des eingesetzten Radionuklids bei der Auswahl für eine Therapie zu berücksichtigen [Imam, 2001]. Neben  $\beta$ -Strahlern und  $\alpha$ -Strahlern werden auch Auger-Elektronen-Emitter in der Radioimmuntherapie eingesetzt.

### 1.2.2.1 Auger-Elektronen-Emitter

Die Auger-Elektronen-Emitter  $^{125}\text{I}$  und  $^{111}\text{In}$  zerfallen durch Elektroneneinfang zu  $^{125}\text{Te}$  beziehungsweise  $^{111}\text{Cd}$ . Der Atomkern dieser Strahler fängt ein Elektron aus der Atomhülle, meist aus der innersten Schale (K-Schale), ein. Im Kern bewirkt das Elektron, dass ein Proton in ein Neutron und ein Neutrino umgewandelt wird. Somit nimmt die Kernladungszahl ab. Das entstandene Loch der tief gelegenen Schale der Elektronenhülle wird durch ein Elektron aus einer höheren Schale wieder besetzt. Dadurch entsteht eine Energiedifferenz, die auf andere Elektronen übertragen werden kann, welche dann als so genannte Auger-Elektronen aus dem Atom freigesetzt werden [Kriehuber und Simkó, 2000, Senekowitsch-Schmidtke, 2000]. Auger-Elektronen besitzen nur eine Energie von 10 - 30 keV [Mattes, 2002] bei einer Reichweite von wenigen Nanometern, das heißt hoher linearer Energietransfer vergleichbar mit dem von  $\alpha$ -Emittern [Senekowitsch-Schmidtke, 2000]. Eine Schädigung der zellulären DNA tritt daher nur auf, wenn die Auger-Elektronen in unmittelbarer Nähe des DNA Doppelstrangs emittiert werden [Daghighian et al., 1996, Mattes, 2002]. Aus diesem Grund werden die Auger-Elektronen-Emitter an Transportmoleküle gekoppelt, welche selektiv in Tumorzellen aufgenommen und dort in die DNA integriert werden. Von Buchegger et al. [2003] wird zum Beispiel  $^{125}\text{I}$ -Iododeoxyuridin an Mäusen mit humanen Glioblastomtumoren untersucht.

### 1.2.2.2 $\beta$ -Strahler

$\beta$ -Strahler, wie zum Beispiel  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{177}\text{Lu}$  oder  $^{188}\text{Re}$ , sind die am häufigsten in der Radioimmuntherapie verwendeten Nuklide. Sie emittieren Elektronen aus dem Atomkern mit einem kontinuierlichen Energiespektrum. Aufgrund relativ großer mittlerer Reichweiten im Gewebe von 0,8 mm für  $^{131}\text{I}$  und 5,3 mm für  $^{90}\text{Y}$  sind diese  $\beta$ -Emitter für die Therapie von Tumoren mit einem Durchmesser zwischen 2,5 - 5 mm beziehungsweise 28 - 42 mm am besten geeignet [Illidge und Brock, 2000].  $\beta$ -Emitter-Immunkonjugate schädigen aufgrund ihrer Reichweite auch benachbarte Zellen an die der Antikörper nicht bindet. Dieser so genannte Crossfire-Effekt führt zu guten Therapieerfolgen bei Tumoren mit heterogener Antigenexpression [Imam, 2001]. Aufgrund des Crossfire-Effekts sind  $\beta$ -Emitter auch dann wirksam, wenn das Radioimmunkonjugat schlecht durch das Tumorgewebe penetriert und somit nicht in allen Bereichen des Tumors gleichmäßig verteilt ist [Buchsbaum, 2000]. Jedoch ist durch die Bestrahlung des die Tumorzellen umgebenden Normalgewebes eine unspezifische Toxizität gegeben (negativer Crossfire-Effekt) [Mattes, 2002]. Zur Abtötung von Zellverbänden, wie Mikrometastasen, oder von einzelnen Zellen, wie hämatologische Tumoren, ist aufgrund des relativ niedrigen LET der  $\beta$ -Strahler eine große Anzahl von Nukliden pro Zelle nötig. Aufgrund der erfolgreichen Therapieversuche beim Lymphom wurde Zevalin<sup>®</sup>, als Beispiel für ein  $\beta$ -Emitter Immunkonjugat, für die Radioimmuntherapie eines rezidivierenden oder refraktären CD20-positiven folliculären B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphoms Anfang des Jahres 2004 zur Therapie am Menschen, auch für die ambulante Anwendung, zugelassen. Hier wird ein Antikörper gegen CD20-Antigen mit dem  $\beta$ -Strahler  $^{90}\text{Y}$  gekoppelt und zur Therapie intravenös appliziert.

### 1.2.2.3 $\alpha$ -Strahler

$\alpha$ -Partikel sind hochenergetische Heliumkerne mit hohem LET und geringer Reichweite von 30 - 80  $\mu\text{m}$  in Gewebe [Senekowitsch-Schmidtke, 2000]. In Tierversuchen wurden vor allem  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Bi}$  und  $^{213}\text{Bi}$ , gekoppelt an geeignete Transportmoleküle, untersucht, von denen  $^{211}\text{At}$  und  $^{213}\text{Bi}$  auch am Menschen eingesetzt wurden. In Tab. 2 sind einige aufgrund von Halbwertszeit, Zerfallsprodukten und Verfügbarkeit prinzipiell zur Therapie geeignete  $\alpha$ -Strahler aufgeführt. Aufgrund ihrer geringen Reichweite sind  $\alpha$ -Strahler besonders zur Therapie mikroskopischer Tumorknoten mit einem Durchmesser von 1 bis 2 mm geeignet [Couturier et al., 2005]. Aufgrund des hohen LET der  $\alpha$ -Emitter von etwa 100 keV/ $\mu\text{m}$  tritt etwa alle 10 nm ein ionisierendes Ereignis auf. Da der Abstand der DNA-Stränge in der Doppelhelix 10 nm beträgt, induzieren  $\alpha$ -Partikel relativ häufig Doppelstrangbrüche [Imam, 2001]. Die therapeutische Effizienz von  $\alpha$ -Emittern ist auch unabhängig von der Zellzyklusphase sowie

dem Sauerstoffgehalt einer Tumorzelle. So können sowohl normal oxigenierte als auch hypoxische Zellen zerstört werden [Imam, 2001]. Mittels Comet Assay konnte gezeigt werden, dass die durch  $\alpha$ -Partikel induzierten DNA-Schäden zirka 2,5-fach höher sind als die durch  $\gamma$ -Strahler ( $^{137}\text{Cs}$ ) induzierten [Rössler et al., 2006].

Nuklid	$t_{1/2}$	$E_{\alpha}$	Reichweite im Gewebe ( $\mu\text{m}$ )
$^{211}\text{At}$	7,2 h	6,8	65
$^{212}\text{Bi}$	1,1 h	6,0	54
$^{213}\text{Bi}$	46 min	8,2	72
$^{149}\text{Tb}$	4,1 h	4,0	28
$^{225}\text{Ac}$	10 d	5,8	54

**Tab. 2:  $\alpha$ -Emitter für die Radioimmuntherapie.**

Aufgrund ihrer geringen Reichweite wurden  $\alpha$ -Strahler, gekoppelt an geeignete Carrier zur Therapie hämatologischer Tumoren, Mikrometastasen und Tumoren, die sich entlang innerer Oberflächen ausbreiten (zum Beispiel neoplastische Meningitis, residuale Tumorzellen nach Glioblastom-Operation, Peritonealkarzinose) eingesetzt [Imam, 2001]. Neuere Studien weisen aber darauf hin, dass  $\alpha$ -Strahler nur bei kleinen Zielvolumina und Mikrometastasen therapeutisch optimal effektiv sind. In der Ansicht von Burke et al. [2002] sind bei Leukämien demnach  $\beta$ -Strahler eher in der Lage eine Totalremission herbeizuführen, wobei dann mehr systemische Nebenwirkungen auftreten. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von  $^{213}\text{Bi}$  und der langen Zirkulationszeit im Blut erreicht bei systemischer Anwendung nur ein Teil der Radioimmunkonjugate die Zielzellen. Bei der lokoregionalen Applikation von  $^{213}\text{Bi}$ -Immunkonjugaten dagegen bindet der überwiegende Teil unmittelbar an die Zielzellen. Dadurch wird auch die systemische Toxizität reduziert.

### 1.2.3 Kopplung von Radionukliden an die Trägermoleküle

Eine stabile und schnelle Kopplung von Radionukliden an ihre jeweiligen Transportmoleküle ist von großer Bedeutung für die effektive, nebenwirkungsarme Radioimmuntherapie. Unterschiedliche Kopplungsmethoden werden abhängig von den chemischen Eigenschaften des jeweiligen Nuklids angewandt. Iod-Isotope können an Tyrosinreste des Trägermoleküls kovalent gekoppelt werden, wohingegen Metall-Radionuklide nur mittels geeigneter Chelatoren an Carrier gebunden werden können. Für metallische Radionuklide haben sich DOTA und DTPA bewährt [Zalutsky und Vaidyanathan, 2000]. Aufgrund des Chelatierungsprozesses von DOTA, der entweder lange dauert, oder Temperaturen von über  $60^{\circ}\text{C}$  erfordert, beides ist für  $^{213}\text{Bi}$ -Immunkonjugate nicht praktikabel, wird die weniger stabile Bindung mittels SCN-

CHX-A"-DTPA eingesetzt. Für  $^{213}\text{Bi}$ -Radionuklide hat sich die Verwendung von SCN-CHX-A"-DTPA bewährt, da die Verbindung stabiler ist als mit DTPA. Die Stabilität dieses SCN-CHX-A"-DTPA-Konstruktes ist bei der HWZ von 45,6 min für  $^{213}\text{Bi}$  mit einem in vitro-Release von weniger als 5 % über 2 Tage ausreichend [Nikula et al., 1999]. Als gute Alternative zu DOTA für die Chelatierung wird auch von Milenic et al. [2001] CHX-A-DTPA beschrieben.

#### 1.2.4 Radioimmuntherapie und Radionuklidtherapie mit $\alpha$ -Strahlern

Der Einsatz von  $\alpha$ -Strahlen emittierenden Radioimmunkonjugaten zur Therapie im Mausmodell wurde erstmals 1988 beschrieben. Hier wurde ein  $^{212}\text{Bi}$ -markierter IgM-Antikörper intraperitoneal injiziert [Macklis et al., 1988b]. Mit der Produktion des  $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generators ab 1997 wurde  $^{213}\text{Bi}$  für klinische und in-vivo beziehungsweise in-vitro Studien verfügbar. Die Anwendung von  $\alpha$ -Strahlern in der Radioimmuntherapie bei metastasierenden Tumoren ist eine viel versprechende Option zur Therapie von malignen Einzelzellen und für prä-angiogenetische Läsionen [Allen, 1999]. So wurden unter anderem Mikrometastasen in der Lunge, induziert durch i.v. Injektion von Mammakarzinomzellen, im Mausmodell mit  $^{213}\text{Bi}$ -markierten 201B-Antikörpern (gegen murines Thrombomodulin, spezifisch für Blutgefäße) behandelt. Nach intravenöser Injektion reichert sich die Radioaktivität in der Lunge an und kann dort Tumorzellen abtöten. Das Überleben der Mäuse konnte mittels dieser Therapie von 14 auf bis zu 100 Tage verlängert werden [Kennel und Mirzadeh, 1998, Kennel et al., 1999a]. Auch zur Therapie der Peritonealkarzinose ist der Einsatz von  $\alpha$ -Emitter-Konjugaten viel versprechend. Im Mausmodell nach i.p. Inokulation von Magenkarzinomzellen wurde mit  $^{213}\text{Bi}$ -Immunkonjugaten gegen ein tumorzellspezifisches Antigen (d9-E-Cad) eine deutliche Verlängerung des Überlebens erreicht [Huber et al., 2003b, Bloechl et al., 2005, Beck et al., 2007]. Neben Antikörpern werden auch andere Transportmoleküle für  $\alpha$ -Strahler verwendet. So wurde von Yao et al. [2004] mit  $^{213}\text{Bi}$  markiertes Biotin Therapie eingesetzt. Das mediane Überleben von subkutan Epidermoidkarzinomzelltumoren tragenden Mäusen konnte hier von 7 auf bis zu 83 Tage verlängert werden [Yao et al., 2004]. Auch zur Therapie von Leukämien bietet der Einsatz von  $\alpha$ -Strahlern interessante Perspektiven. So wurden  $\alpha$ -Partikel am Menschen als erstes bei Leukämiepatienten untersucht:  $^{213}\text{Bi}$ -markierte Anti-CD33-Antikörper, die spezifisch an bestimmte Leukämiezellen binden, wurden zur Analyse von Pharmakokinetik und Dosimetrie bei Leukämiepatienten eingesetzt [Sgouros et al., 1999].  $^{213}\text{Bi}$ -HuM195 (Antikörper gegen CD33) wurden von Jurcic et al. [2002] erfolgreich bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie zur Reduktion der Myeloblasten eingesetzt. Schließlich werden die  $^{213}\text{Bi}$ -Immunkonjugate auch zur Therapie von Hautkrebs eingesetzt.  $^{213}\text{Bi}$  markierte Antikörper

(9.2.27) gegen Melanomzellen wurden intraläsional im Rahmen einer klinischen Phase 1 Studie erfolgreich an Melanompatienten eingesetzt [Allen et al., 2004].

## 2 Zielsetzung

Das Ziel der Arbeit war die Untersuchung der intraperitonealen Retention von  $^{213}\text{Bi}$ - bzw.  $^{111}\text{In}$ -Radioimmunkonjugaten mit unterschiedlichen Molekulargewichten hinsichtlich der Optimierung der Effizienz der lokoregionalen  $\alpha$ -Emitter-Radioimmuntherapie intraperitoneal disseminierter Tumorzellen. Da die Effizienz der Abtötung von Tumorzellen mit der Verweilzeit der  $\alpha$ -Emitter-Immunkonjugate im Intraperitonealraum korreliert, sollten geeignete Konjugate diesbezüglich selektiert werden.

Dazu wurde zunächst *in vitro* die Bindung von  $^{213}\text{Bi}$ -Fab', gerichtet gegen mutiertes d9-E-Cadherin, sowie von unspezifischem  $^{213}\text{Bi}$ -IgM an HSC45-M2 Magenkarzinomzellen mit Expression von d9-E-Cadherin untersucht. Zusätzlich wurde die spezifische Zytotoxizität der  $^{213}\text{Bi}$ -Immunkonjugate gegen HSC45-M2-Zellen ermittelt.

*In vivo* wurde die Biodistribution der  $^{213}\text{Bi}$ - bzw.  $^{111}\text{In}$ -Radioimmunkonjugate (Fab', IgG, IgM) an tumorfreien Mäusen nach *i.p.* Injektion zur Beurteilung der Retention im Peritonealraum sowie der Zirkulation im Blut untersucht. Zusätzlich wurden die Anreicherung der Radioimmunkonjugate in ausgewählten Organen und die Ganzkörperverteilung mittels Szintigrammen sowohl nach *i.v.* als auch nach *i.p.* Injektion analysiert. Zur Berechnung der biologischen Halbwertszeiten der verschiedenen Radioimmunkonjugate wurden Ganzkörperaktivitätsmessungen herangezogen. Die therapeutische Effizienz soll in Abhängigkeit von der Retention im Intraperitonealraum in nachfolgenden Therapiestudien in Tiermodellen verifiziert werden.



### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Chemikalien und Medikamente

Ammoniumacetat	Sigma, Steinheim
Ascorbinsäure	Sigma, Steinheim
Augensalbe, Vidisic <sup>®</sup>	Dr. Mann Pharma, Berlin
Chelating Resin (Iminodiacetic Acid)	Sigma, Steinheim
Chelex 100	Sigma, Steinheim
EDTA 1% in PBS ohne Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	c.c. pro, Neustadt
Ethanol 96%	Merck, Darmstadt
FCS (fetales Kälberserum)	Biochrom, Berlin
FDG (2-[ <sup>18</sup> F]Fluor-2-Deoxy-Glucose) (FDG TUM)	Technische Universität, München
Isofluran, Forene <sup>®</sup>	Abbott, Wiesbaden
ITLC SG (Instant thin-layer chromatography paper)	Gelman Sciences, Michigan, USA
Ketavet <sup>®</sup> (100mg/ml Ketaminhydrochlorid)	Pharmacia & Upjohn, Erlangen
NaCl- Lösung, 0,9%	Delta-Pharma, Pfullingen
Natrium-Jodid (ACS Reagens)	Sigma, Steinheim
PD-10 Desaltin columns Sephadex	GE Healthcare, Schweden
Penicillin/ Streptomycin	Biochrom, Berlin
Rompun <sup>®</sup> (2% Xylazinhydrochlorid)	Bayer Vital, Leverkusen
Salzsäure 30% (ultrapure)	Merck, Darmstadt
SCN-CHX-A"-DTPA (2-(4-isothiocyanatobenzyl)- Cyclohexyl-Diethylentriaminpentaessigsäure)	Macrocyclics, Dallas, U.S.A
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat 0,05M pH 5,5	Merck, Darmstadt

### 3.1.2 Lösungen

#### 3.1.2.1 Anästhesie

##### Ketavet-Rompun Narkotikum:

82% physiologische NaCl-Lösung, 0,9%

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

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

#### 3.1.2.2 Zellkultur

##### DULBECCO'S MEM (Biochrom, Berlin):

NaHCO<sub>3</sub> (3,7 g/l); D-Glucose (4,5 g/l); N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamin (1,028 g/l)

##### Phosphatpuffer (PBS) (Biochrom, Berlin):

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> x 12 H<sub>2</sub>O (2,85 g/l); pH 7,2

### 3.1.3 Geräte

Aktivimeter capintec CRC-15R	Ramsey, NJ, U.S.A
Analysenwaage Sartorius, Typ LA 230S-OCE	Sartorius, Göttingen
Biofuge 13 Heraeus	Sepatech, Osterode
Cell Counter, CASY <sup>®</sup> Modell TT	Schärfe, Reutlingen
Gamma-Counter TYP 1480 Wizard TM 3	Wallac , Finnland
Gamma-Kamera Forte	ADAC/Philips, Niederlande
Kernspintomograph Sonata 1,5 Tesla	Siemens, Erlangen
Kleintier-PET: MOSAIC (small animal PET scanner)	Philips, Niederlande
Laborwaage Sartorius, Typ BL 1500W	Sartorius, Göttingen
Laminar-Flow-Arbeitsbank	Heraeus-Instrumente, Osterode
Lichtmikroskop Typ ID 03	Zeiss, Oberkochen
Megafuge 1,0 R Heraeus	Sepatech, Osterode

### 3.1.4 Antikörper

#### 3.1.4.1 *Anti-delta 9-E-Cadherin Fab'-Fragmente*

Die Herstellung der Fragmente erfolgte gentechnisch unter Verwendung der Nukleotidsequenz des variablen Abschnitts des Antikörpers 7E6 (IgG1) [Mages, 2005]. Das Fragment gegen d9-E-Cadherin wurde uns freundlicher Weise überlassen von dem Lehrstuhl für Biologische Chemie, Technische Universität München (Weihenstephan), Prof. Dr. A. Skerra.

#### 3.1.4.2 *IgM-Antikörper*

Die verwendeten Antikörper der Klasse IgM wurden bezogen von Pierce Biotechnology, Rockford, U.S.A.. Es handelt sich dabei um humane, unkonjugierte Myelomantikörper (Human IgM (Myeloma), Whole Molecule, ImmunoPure<sup>®</sup>).

#### 3.1.4.3 *IgG-Antikörper*

Der Antikörper 6H8 (IgG2a) gegen d9-E-Cadherin [Becker et al., 1999] wurde uns freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von dem Institut für Pathologie, Technische Universität München, PD Dr. K.F. Becker.

### 3.1.5 Bovines Serumalbumin (BSA)

Das bovine Serumalbumin wurde bezogen von der Firma Biorad, München. <sup>213</sup>Bi-BSA-Konjugate wurden als unspezifische Kontrolle in klonogenen Tests zur Ermittlung der durch <sup>213</sup>Bi-Radioimmunkonjugate verursachten Toxizität verwendet.

### 3.1.6 Radionuklide

#### 3.1.6.1 *Wismut-213 (<sup>213</sup>Bi)*

Wismut-213 (<sup>213</sup>Bi) ist ein Zerfallsprodukt von <sup>225</sup>Ac (Abb. 3). Mit einer Halbwertszeit (HWZ) von 45,6 min zerfallen 98 % des <sup>213</sup>Bi unter Elektronenemission zu <sup>213</sup>Po ( $\beta^-$ -Zerfall) und 2 % zu <sup>209</sup>Tl unter Emission von  $\alpha$ -Partikeln. <sup>213</sup>Po zerfällt mit einer HWZ von 4,2  $\mu$ s zu <sup>209</sup>Pb, wobei  $\alpha$ -Partikel mit einer Energie von 8,54 MeV emittiert werden. <sup>209</sup>Tl zerfällt unter Elektronenemission ( $\beta^-$ -Zerfall) weiter zu <sup>209</sup>Pb, welches schließlich unter  $\beta^-$ -Zerfall (HWZ von 3,3 h) zu stabilem <sup>209</sup>Bi wird (Abb. 3). Die beim <sup>213</sup>Bi-Zerfall auftretende  $\gamma$ -Strahlung hat ihr Energiemaximum bei 440 keV. Diese  $\gamma$ -Linie wird genutzt zur Detektion des Radionuk-

lids, sowohl zur Szintigraphie als auch für die Bestimmung der Organaktivitäten in Biodistributionsstudien.

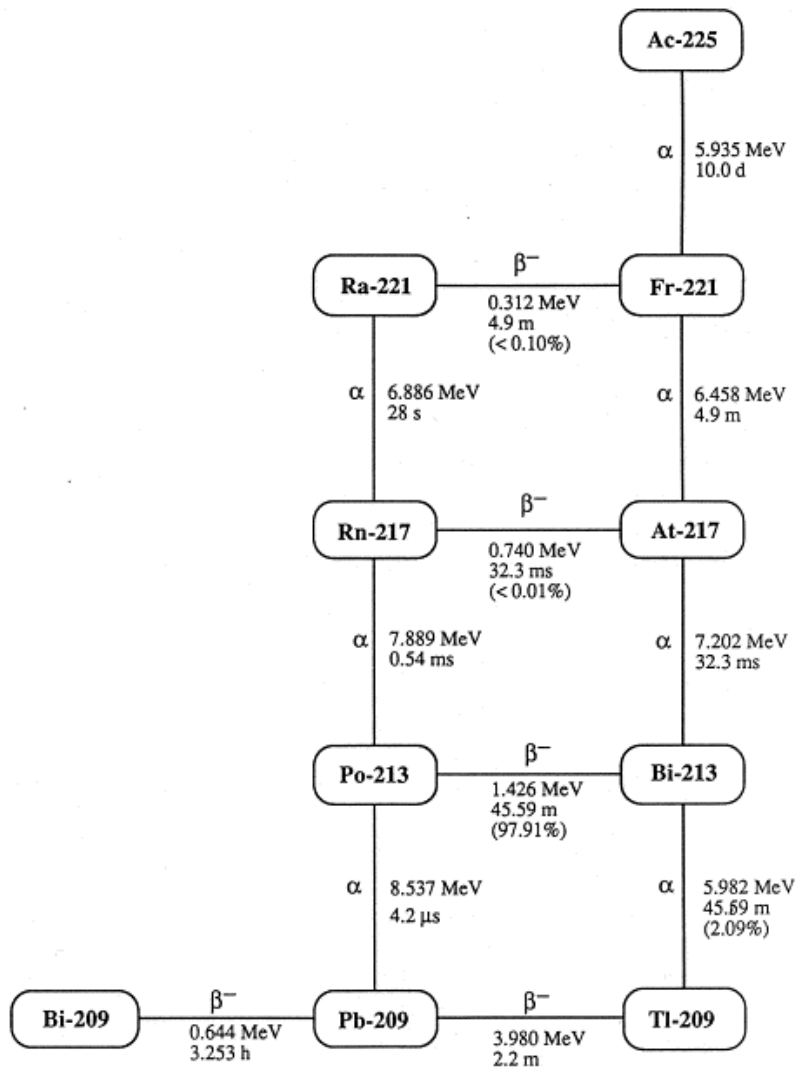


Abb. 3: Zerfallsreihe von  $^{225}\text{Ac}$  [nach McDevitt et al., 1999a]

### 3.1.6.2 $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generator

$^{213}\text{Bi}$  wird mit einem etablierten Verfahren aus einem  $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generator eluiert, der uns vom Institut für Transurane der Europäischen Kommission (ITU) zur Verfügung gestellt wurde. Das dafür benötigte  $^{225}\text{Ac}$  ist ein Produkt des natürlichen Zerfalls von  $^{233}\text{U}$  [Boll et al., 1997]. Eine alternative Methode zur Herstellung von  $^{225}\text{Ac}$  ist die Neutronenbestrahlung von  $^{226}\text{Ra}$  im Hochflussreaktor [Van Geel et al., 1994].  $^{225}\text{Ac}$  entsteht hier durch eine (n; 2n;  $\beta$ )-Reaktion. Als ökonomischste Möglichkeit zur Herstellung von  $^{225}\text{Ac}$  zeichnet sich der Beschuss von  $^{226}\text{Ra}$  im Zyklotron mit Protonen ab. Die Absorption eines Protons verursacht die Emission zweier Neutronen. Als Resultat dieser (p; 2n)-Reaktion entsteht  $^{225}\text{Ac}$ . Mit dieser Technik wurden am Kernforschungszentrum in Karlsruhe zirka 500 MBq  $^{225}\text{Ac}$  experimentell hergestellt [Apostolidis et al., 2005a].

Am Institut für Transurane der Europäischen Kommission in Karlsruhe wird  $^{225}\text{Ac}$  trägerfrei aus einem  $^{229}\text{Th}/^{225}\text{Ac}$ -Generator eluiert. Nach der Abtrennung von  $^{225}\text{Ra}$  mittels Chromatographie wurde das  $^{225}\text{Ac}$  aufgereinigt [McDevitt et al., 1998]. Zur Herstellung des  $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generators werden 370 MBq (10mCi) - 740 MBq (20 mCi)  $^{225}\text{Ac}$ -Nitrat an AGMP-50 Kationen-Austauschharz adsorbiert und in eine Fluorpolymer Säule (5,5 cm, r = 3,2 mm) überführt [McDevitt et al., 1999a, Apostolidis et al., 2005b].

### 3.1.6.3 Indium-111 ( $^{111}\text{In}$ )

$^{111}\text{In}$  wurde von GE Healthcare, Amersham, U.K. als  $^{111}\text{InCl}_3$  bezogen. Aufgrund der HWZ von 67 h und einer einfachen Kopplung an chelatierte Proteine eignet es sich gut für Biodistributionsstudien über längere Zeiträume. Die Emissionsmaxima der  $\gamma$ -Strahlung bei 172 keV und 246 keV werden dabei zur Detektion des Radionuklids herangezogen.

### 3.1.7 Magenkarzinomzelllinie HSC45-M2

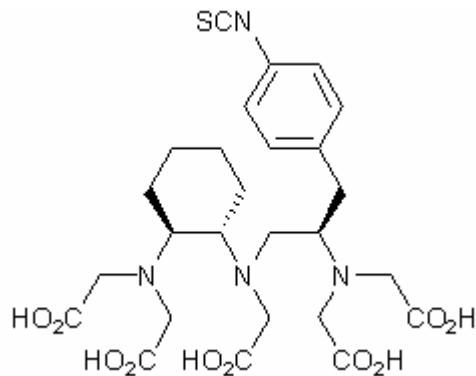
Die Zelllinie HSC45-M2 wurde aus einer japanischen Patientin mit diffusem Magenkarzinom isoliert [Yanagihara et al., 1993]. Es handelt sich um eine Magenkarzinomzelllinie vom Siegelringzelltyp, die mutiertes E-Cadherin mit Deletion des Exon 9 exprimiert [Fukodome et al., 2000].

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Chelatierung der Antikörper

Zur Chelatierung der Antikörper beziehungsweise von BSA wurde der bifunktionelle Chelator SCN-CHX-A"-DTPA (2-(4-isothiocyanatobenzyl)-Cyclohexyl-Diethylentriamin-pentaessigsäure) verwendet. Die Chelatierung von Antikörpern mit SCN-CHX-A"-DTPA verändert weder deren Bindungskinetik [Fischer, 2001] noch deren Biodistribution [Huneke et al., 1992]. Mit CHX-A-DTPA chelatierte Antikörper binden  $^{213}\text{Bi}$  innerhalb von 8 bis 10 min [McDevitt et al., 1999b]. Für alle Schritte zur Chelatierung der Antikörper wurden ausschließlich metallfreie Chemikalien und Reaktionsgefäße verwendet. Lösungen wurden mittels Chelex 100 entionisiert. Alle Glasgefäße wurden vor Benutzung mit 2 M Salzsäure gespült. CHX-A"-DTPA (Abb. 4) (0,5 mg) wurde über Nacht an die Antikörper *IgG*, *IgM*, die Antikörperfragmente beziehungsweise BSA (je zirka 5 mg) gekoppelt [Nikula et al., 1995]. Dabei reagiert die freie Thioharnstoffgruppe des Chelators mit freien  $\text{NH}_2$ -Gruppen von Lysinresten der Proteine zu stabilen Schwefelbrückenbindungen. Pro *IgG* Antikörpermolekül sollen nur etwa 3-5 Chelatmoleküle gebunden werden, pro Antikörperfragment nur 1-2 und pro *IgM* Antikör-

permolekül nur 18-30, damit die Bindungsfähigkeit des Antikörpers beziehungsweise des Antikörperfragmentes nicht beeinträchtigt wird.



**Abb. 4: SCN-CHX-A''-DTPA [von [www.macrolytics.com](http://www.macrolytics.com)]**

### 3.2.2 Eluierung von $^{213}\text{Bi}$ aus dem $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generator

Zur Eluierung von  $^{213}\text{Bi}$  wurden zunächst 600  $\mu\text{l}$  einer 0,1 M HCl/0,1 M NaI Lösung langsam über einen Polyethylenschlauch ( $r = 0,8 \text{ mm}$ ) in den Generator gespritzt und dort für 2 min mehrmals vor und zurück gepumpt zur effizienten Ablösung von  $^{213}\text{Bi}$  aus der Matrix. Das Eluat wird anschließend in einem Plastikröhrchen aufgefangen. Im Eluat finden sich  $(^{213}\text{BiI}_5)^{2-}$  Anionen, aus denen  $^{213}\text{Bi}$  im Chelat gebunden wird [Spivakov et al., 1979]. Fünf Stunden nach der Eluierung ist im Generator wieder das radioaktive Gleichgewicht zwischen  $^{225}\text{Ac}$  und  $^{213}\text{Bi}$  erreicht. 90 % der maximalen  $^{213}\text{Bi}$ -Radioaktivität liegen allerdings schon nach 150 Minuten vor. Zur effizienten Nutzung des Generators empfiehlt sich somit eine  $^{213}\text{Bi}$ -Gewinnung im Abstand von etwa 2 bis 2,5 h.

### 3.2.3 Radionuklidmarkierung der chelatierten Antikörper und Fragmente

#### 3.2.3.1 Markierung mit $^{213}\text{Bi}$

Das gewonnene  $^{213}\text{Bi}$ -Eluat (siehe 3.2.2) wurde mittels 100  $\mu\text{l}$  3 M Ammoniumazetat ( $\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$ ) auf einen pH Wert von zirka 5,3 gepuffert. Um den Antikörper vor Radiolyse zu schützen, wurden 100  $\mu\text{l}$  einer 4%igen L-Ascorbinsäurelösung zugesetzt. 50 bis 100  $\mu\text{g}$  (zirka 10-50  $\mu\text{l}$ ) der chelatierten Antikörper IgG und IgM, der chelatierten Antikörperfragmente beziehungsweise des chelatierten BSA wurden nun der Lösung zugesetzt und etwa 7 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die Separierung der radioaktiv markierten Proteine von nicht inkorporierten Radionukliden erfolgte mittels PD-10 Gelfiltrationssäule (Bettvolumen 2,5 ml, GE Healthcare). Dazu wurde der Markierungsansatz ad 2,5 ml mit PBS aufgefüllt und auf die

Säule aufgetragen, die vorher mit zirka 20 ml PBS äquilibriert worden war.  $^{213}\text{Bi}$  markierte Proteine wurden mit 2 ml PBS aus der Säule ausgespült. Die Markierungsausbeute wurde sowohl vor als auch nach der PD-10 Aufreinigung mittels Instant Thin Layer Chromatographie (ITLC) mit 0,05 M Tri-Natriumcitrat als Laufmittel analysiert.

### 3.2.3.2 Markierung mit $^{111}\text{In}$

In einem Gemisch aus 200  $\mu\text{l}$   $^{111}\text{In}$ -Chlorid (93 MBq), 250  $\mu\text{l}$  3M Ammoniumazetat und 500  $\mu\text{l}$  0,2M HCl wurden 300  $\mu\text{g}$  chelatierter Antikörper beziehungsweise Antikörperfragment pipettiert und die Lösung für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Separierung der  $^{111}\text{In}$  markierten Proteine von nicht inkorporierten Radionukliden erfolgte mittels PD-10 Gelfiltration wie unter 3.2.3.1 für  $^{213}\text{Bi}$  beschrieben. Die Markierungsausbeute wurde mittels ITLC überprüft.

### 3.2.4 Analyse der Stabilität von $^{213}\text{Bi}$ -IgM-Konjugaten in PBS und Serum und Analyse der Bindung von $^{213}\text{Bi}$ an Proteine des Serums

Jeweils 100  $\mu\text{l}$   $^{213}\text{Bi}$ -IgM-Konjugat-Lösung mit einer Aktivität von 2,22 MBq (60  $\mu\text{Ci}$ ) wurde in 900  $\mu\text{l}$  PBS beziehungsweise in 900  $\mu\text{l}$  humanem Serum bei 37° C inkubiert. Nach 0 min, 10 min, 30 min, 1 h, 2 h und 3 h wurde jeweils der Anteil von IgM gebundenem  $^{213}\text{Bi}$  mittels Instant Thin Layer Chromatographie ermittelt.

Jeweils 100  $\mu\text{l}$   $^{213}\text{Bi}$ -Lösung mit einer Aktivität von 2,5 MBq (68  $\mu\text{Ci}$ ) wurde in 900  $\mu\text{l}$  PBS beziehungsweise in 900  $\mu\text{l}$  humanem Serum bei 37° C inkubiert. Nach 0 min, 10 min, 30 min, 1 h, 2 h und 3 h wurde jeweils der Anteil des freien  $^{213}\text{Bi}$  mittels Instant Thin Layer Chromatographie ermittelt.

Um die intraindividuelle Korrelation der Messwerte über die Zeit berücksichtigen zu können, wurde für die statistische Auswertung ein GEE - Regressionsmodell gerechnet, mit den Einflussgrößen Zeit und Gruppe.

### 3.2.5 Kultivierung der Zellen

Die Zelllinie HSC45-M2 wurde in Dulbeccos Modified Eagle Medium (D-MEM, 4,5 g/l Glucose) mit 10 % FKS, 100 U/ml Penicillin und 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Streptomycin bei 37° C, 5 %  $\text{CO}_2$  und 100 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Der pH-abhängige Indikator im Medium zeigt durch Farbumschlag von rot nach gelb eine Anreicherung saurer Stoffwechselprodukte. Die Subkultivierung sowie das Ablösen der Zellen erfolgten unter antiseptischen Bedingungen in einer Laminar-Flow-Arbeitsbank. Die Zelllinien wurden bei einer Dichte von etwa  $1 \times 10^7$  Zellen pro Kulturflasche (175  $\text{cm}^2$ ) passagiert. Bei dieser Zelldichte befinden sich die Zellen in der

exponentiellen Wachstumsphase. Nach Absaugen des Kulturmediums wurden pro Kulturflasche 6 ml 1mM EDTA in PBS zugegeben und die Flasche für 10 min im Wärmeschrank inkubiert. Durch Beklopfen der Flaschen wurden die Zellen anschließend vollständig abgelöst. Sie wurden in sterile Zentrifugenröhrchen überführt und 3 min bei 1200 U/min (Megafuge 1,0 R, Heraeus) zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet entweder in FKS-haltigem Medium zur weiteren Passagierung oder in FKS-freiem Medium zur Injektion in Mäuse resuspendiert.

### 3.2.6 Bindungstests für die Radioimmunkonjugate

Die Bindung von  $^{213}\text{Bi}$ -Fab'- beziehungsweise von  $^{213}\text{Bi}$ -IgM-Immunkonjugaten an HSC45-M2-Zellen wurde wie folgt analysiert [modifiziert nach Nikula et al., 1999]: Je  $3 \times 10^6$  Zellen, bestimmt mit Hilfe des Cell Counter- und Analyser-Systems (CASY<sup>®</sup>), wurden in 500  $\mu\text{l}$  Zellkulturmedium 30 min auf Eis mit je 50 ng des entsprechenden  $^{213}\text{Bi}$ -Radioimmunkonjugats inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 ml PBS wurden die Zellen durch dreiminütige Zentrifugation bei 1200 U/min (Megafuge 1,0 R, Heraeus) vom Überstand separiert. Nach zweimaligem Waschen mit jeweils 0,5 ml PBS wurden die Aktivitäten sämtlicher Überstände sowie des Zellpellets im  $\gamma$ -Counter gemessen und die an die Zellen gebundene Aktivität in Prozent der zugegebenen Gesamtaktivität berechnet.

### 3.2.7 Klonogene Tests zur Ermittlung der Toxizität der $^{213}\text{Bi}$ -Radioimmunkonjugate

Sämtliche Experimente wurden mit 24-Well-Platten durchgeführt. Die HSC45-M2-Zellen wurden stets in 1 ml Medium pro Well inkubiert. In Vorversuchen wurde jeweils die optimale Zellzahl zur Aussaat für die beiden unterschiedlichen Versuchsansätze zu 100 beziehungsweise 500 Zellen pro Well ermittelt.

Im ersten Ansatz wurden die Zellen (je 100 pro Well) 24 Stunden nach Aussaat mit jeweils 0,37, 0,74 oder 1,48 MBq pro ml (10, 20 oder 40  $\mu\text{Ci}$  pro ml)  $^{213}\text{Bi}$ -Fab' inkubiert. Das entspricht Aktivitätskonzentrationen von 370 kBq/ml bis 1480 kBq/ml. Als Kontrolle dienten Zellen, die nicht mit Radioaktivität inkubiert wurden.

Im zweiten Ansatz wurden jeweils  $3 \times 10^6$  Zellen 3 Stunden lang im Eppendorfgesäß unter Schütteln bei 37° C mit 0,037, 0,074, 0,185, 0,37, 0,74, 1,48 MBq pro ml (1, 2, 5, 10, 20, 40  $\mu\text{Ci}$  pro ml)  $^{213}\text{Bi}$ -Fab' oder  $^{213}\text{Bi}$ -BSA inkubiert. Das entspricht Aktivitätskonzentrationen von 37 kBq/ml bis 1480 kBq/ml. Anschließend wurden jeweils 500 Zellen pro Well ausgesät. Als Kontrolle dienten wiederum Zellen, die nicht mit Radioaktivität inkubiert worden waren. Zirka 1-2 Wochen nach Inkubation, die Kontrollzellklone sollten zwischen 50-100 Zellen



aufweisen, wurde die Anzahl der Klone für alle Ansätze mikroskopisch bestimmt.

Die Ergebnisse des ersten Ansatzes wurden zuerst mittels ANOVA-Varianzanalyse auf signifikante Heterogenität der Versuchsgruppen untersucht. Anschließend wurde mittels POST-HOC Test (t-Test Bonferroni) auf signifikante Unterschiede zum (adjustierten) Signifikanzniveau von 1,67 % zwischen den Gruppen untersucht (jeweils  $p < 0,001$ ).

Die Ergebnisse des zweiten Ansatzes wurden zunächst mittels zweiseitigem t-Test auf signifikante Unterschiede zwischen  $^{213}\text{Bi-Fab}'$  und  $^{213}\text{Bi-BSA}$  untersucht (Signifikanzniveau: 1,67 %). Anschließend wurde auch hier wieder mittels ANOVA-Varianzanalyse und POST-HOC Test auf signifikante Unterschiede in den beiden Gruppen untersucht.

### **3.3 Tierexperimente**

#### **3.3.1 Versuchstiere und Haltung**

Weibliche Swiss nu/nu (Nacktmäuse) und weibliche Balb/c Mäuse wurden im Alter von 5 bzw. 7 Wochen aus pathogenfreier Zucht (Charles River, Frankreich bzw. Sulzfeld) bezogen und in Käfigen zu je 4-5 Tieren in einem Tierstall mit speziellem Lichtprogramm bei 26°C, 50-60 % Luftfeuchtigkeit gehalten und mit Mäusestandardfutter Altromin 1314 und Leitungswasser ad libitum versorgt. Die Einstellung der Tiere erfolgte mindestens 2 Wochen vor Versuchsbeginn. Swiss nu/nu Mäuse zeichnen sich durch Thymushypoplasie mit konsekventer Immundefizienz aus. Die humorale Immunität ist reduziert, während die zelluläre nahezu völlig fehlt. Dies ist die Voraussetzung für erfolgreiche Xenotransplantation von humanen Tumoren [Rygaard, 1981]. Balb/c Mäuse mit intaktem Immunsystem wurden für Biodistributionsstudien mit  $^{213}\text{Bi-}$  beziehungsweise  $^{111}\text{In-}$ Radioimmunkonjugaten verwendet.

Die Tierversuche, unter Einhaltung von Vorschriften des Tierschutzgesetzes, wurden mit Genehmigung von Tierversuchen der Regierung von Oberbayern, Geschäftszeichen 55.2-1-54-2531-82-02, durchgeführt.

#### **3.3.2 Anästhesie und Tötung**

Die Tiere wurden entweder mittels i.p. Injektion von 250 µl des Rompun-Ketamin-Gemisches (siehe 3.1.2.1) oder mittels kontinuierlicher Inhalationsnarkose mit Isofluran (Forene®) anästhesiert. Das letztgenannte Verfahren eignet sich aufgrund seiner guten zeitlichen Steuerbarkeit gut für Untersuchungen zur szintigraphischen Darstellung der Verteilung von RIK. Die Cornea wurde bei narkotisierten Tieren aufgrund des Fehlens des Lidschlußreflexes mit Vidsic® Augensalbe abgedeckt. Ein rasches Auskühlen der Tiere, insbesondere von Nacktmäusen, bei narkosebedingt reduziertem Stoffwechsel wurde durch Einsatz einer Infrarotlampe

oder durch körperwarme Wasserkissen verhindert. Zur i.v. Injektion der Radioimmunkonjugate in die Schwanzvene eignet sich am Besten eine Kurznarkose mit Isofluran.

Die Tötung der Tiere erfolgte nach Atemstillstand infolge der Betäubung mit CO<sub>2</sub> durch Eröffnung des Brustkorbs und Durchtrennung der Aorta im Bereich des Aortenbogens zum Entbluten der Organe.

### 3.3.3 Peritonealkarzinosemodell

#### 3.3.3.1 Induktion der Peritonealkarzinose

Zur Erzeugung einer Peritonealkarzinose wurden den swiss nu/nu Mäusen jeweils  $1 \times 10^7$  HSC45-M2-Zellen i.p. injiziert. Dieses Verfahren wurde von Senekowitsch et al. [2001] schon erfolgreich mit MDA-MB-435S-Zellen angewendet. Die Zellen wurden, unter Beachtung der Tierschutzrichtlinien, die eine Applikation von maximal 1 ml Flüssigkeit i.p. bei 20 g schweren Nagern zulassen, in einem Volumen von 0,5 ml serumfreien Medium injiziert. Die Injektionsstelle befand sich auf der Linea alba caudal des Nabels, zur Schonung der Leber. Die Injektion erfolgte, zur Vermeidung einer Milzpunktion, im 20°-30°-Winkel der 27G Kanüle nach rechts von der Linea alba abweichend nach cranial in die Peritonealhöhle.

#### 3.3.3.2 Darstellung der Karzinose

##### 3.3.3.2.1 In-Vivo-Kernspintomographie

Mit Ketavet-Rompun betäubte (siehe 3.1.2.1), tumortragende Nacktmäuse wurden axial zu den beiden Öffnungen auf dem Bauch liegend in der Handgelenkspule eines Siemens Sonata 1,5 Tesla Kernspintomographen gelagert. Zur Optimierung des Signals und zur Wärmung der Mäuse wurde ein mit warmem Wasser befüllter Einmalhandschuh verwendet. Die Aufnahme der Bilder erfolgte T<sub>2</sub>-gewichtet, bei einer Schichtdicke von 2 mm, einer Repetitionszeit Tr von 3580 ms und einem Voxelvolumen von 0,18 mm<sup>3</sup>.

##### 3.3.3.2.2 In-Vivo-Positronenemissionstomographie

Die Positronenemissionstomographie (PET) nutzt die Tatsache, dass sich beim Positronenzerfall ein aus dem Atomkern emittiertes Positron mit einem Elektron aus der Hülle rekombiniert. Wobei die Masse der beiden Teilchen in zwei  $\gamma$ -Quanten mit einer Energie von jeweils 0,511 MeV, die sich in diametral entgegengesetzter Richtung bewegen, umgewandelt wird. Ein geschlossener Detektorring, dessen Detektoren mit einer Koinzidenzschaltung miteinander verbunden sind, registriert das annähernd zeitgleiche Auftreffen zweier Photonen auf ge-

genüberliegenden Detektoren. Aufgrund dieses zeitgleichen Auftreffens kann der Ort der Vernichtung eines Positron-Elektron-Paares berechnet werden. Nach Applikation einer definierten Aktivitätsmenge des Tracers kann man ein Aktivitätsverteilungsmuster in transversaler, sagittaler und koronarer Schichtebene rekonstruieren [Reiser, 2004]. Am häufigsten wird als Tracer 2-[<sup>18</sup>F]Fluor-2-Deoxy-Glucose verwendet, da die Glucoseaufnahme in tumorös verändertem Gewebe gesteigert ist und das Radionuklid eine kurze Halbwertszeit besitzt und somit die Strahlenbelastung gering gehalten wird.

Ketavet-Rompun narkotisierten tumortragenden Mäusen wurde FDG mit einer Aktivität von 12-14 MBq (324-378 µCi) in die Schwanzvene injiziert. Dazu wurde der Schwanz für einige Sekunden in etwa 45° C warmes Wasser getaucht und anschließend abgetrocknet. Die so dilatierte Schwanzvene wurde mittels 27G Kanüle punktiert, und 100-200 µl der radioaktiven Substanz i.v. injiziert. Die statischen PET-Messungen erfolgten in Bauchlage in einem Kleintier-PET-Gerät mit einer räumlichen Auflösung von 2,5 mm 3 h nach Injektion des Tracers. Die Bilder wurden mit einem „fully three-dimensional iterative reconstruction algorithm“ (3D-RAMLA) rekonstruiert.

### 3.3.4 Biodistribution der Radioimmunkonjugate in der Maus

#### 3.3.4.1 Ermittlung der Organverteilung

Die Biodistribution, das heisst die Verteilung der RIK in den Organen der Versuchstiere, wurde sowohl nach i.p. als auch nach i.v. Applikation untersucht. Die orthotope Injektion der RIK erfolgte analog zur Tumorzellinokulation wie unter 3.3.3.1 beschrieben im Bolus ad 0,5 ml in PBS. Die i.v. Injektion erfolgte wie unter 3.3.3.2.2 beschrieben ebenfalls in Volumina zwischen 150-200 µl.

Die applizierte Aktivität war abhängig von der HWZ des verwendeten Radionuklids und dem Zeitpunkt der Bestimmung der Verteilung. Für Untersuchungen zur Biokinetik über längere Zeiträume wurde anstelle von <sup>213</sup>Bi <sup>111</sup>In verwendet. Für verlässliche Messungen im γ-Counter sind Impulsraten zwischen 1x10<sup>3</sup>-1x10<sup>6</sup> cpm pro min und Probe notwendig. Daher wurden zur Erfassung der Organverteilung von <sup>213</sup>Bi-Konjugaten nach 10 min, 30 min, 1 h beziehungsweise 1,5 h je 5,6 MBq (150 µCi) und zur Erfassung nach 3 h je 11,1 MBq (300 µCi) appliziert. Zur Bestimmung der Organverteilung von <sup>111</sup>In-Konjugaten nach 3 h beziehungsweise 24 h wurden 0,74 MBq (20 µCi), zur Erfassung nach 72h jeweils 5,55 MBq (150 µCi) appliziert. Zu den festgesetzten Zeitpunkten nach Injektion der Radioimmunkonjugate wurden die Tiere wie unter 3.3.2 beschrieben getötet und Blut, Herz, Lunge, Leber, Magen, Pankreas, Milz, Niere, Peritoneum und Muskel in γ-Probenröhrchen überführt. Serum wurde nach 5 min Zentrifugation bei 6000 U/min (Biofuge 13, Heraeus) (entspricht zirka

3000 g) aus Blut gewonnen. Die Gewichte sämtlicher Organproben wurden unverzüglich nach Entnahme mit einer Analysenwaage (Einteilung = 0,0001 g; Meßfehler = 0,0002 g) bestimmt.

Die Aktivitätsbestimmung sämtlicher Proben erfolgte in einem  $\gamma$ -Counter (Wallac). Dazu wurden in den Organproben  $^{111}\text{In}$ - beziehungsweise  $^{213}\text{Bi}$ -Aktivitäten in counts per minute (cpm) für jeweils 1 min bestimmt. Zur Auswertung wurden nur solche Zählraten herangezogen, die innerhalb des linearen Meßbereichs des  $\gamma$ -Counters ( $1 \times 10^3$ - $1 \times 10^6$  cpm) lagen. Daher wurden von Blut und Leber jeweils nur Teile gemessen. Die cpm-Werte der Gewebeproben wurden auf Prozent der injizierten Aktivität pro g Gewebe normiert (% ID/g). Der 1 % Standard-Wert wurde wie folgt bestimmt: Die pro Tier injizierte Aktivität wurde ad 100 ml mit PBS verdünnt und 1 ml Aliquots daraus im  $\gamma$ -Counter gemessen (5 identische Proben zur Bestimmung des Mittelwerts).

Für die statistische Auswertung wurden Mittelwertvergleiche quantitativer Größen mit Hilfe des Zwei - Stichproben T-Tests vorgenommen. Alle statistischen Auswertungen erfolgten zu einem Signifikanzniveau von 5 %.

#### 3.3.4.2 Analyse der Kinetik mittels Szintigraphie

Tumorfreen Balb/c Mäusen wurden jeweils 5,55 MBq (150  $\mu\text{Ci}$ )  $^{111}\text{In}$ -Immunkonjugate (IgG, IgM beziehungsweise Fab') i.p. (siehe 3.3.3.1) oder i.v. (siehe 3.3.3.2.2) appliziert. Die Verteilung von  $^{111}\text{In}$ -Fab' wurde 1 h, 4 h beziehungsweise 24 h nach Injektion, diejenige von  $^{111}\text{In}$ -IgG beziehungsweise -IgM wurde 3 h, 24 h, 48 h und 72 h nach Injektion jeweils mittels Szintigraphie dargestellt. Dazu wurden die Tiere jeweils mit Isofluran narkotisiert. Die Aufnahmen erfolgten in Bauchlage ventro-dorsal. Die Peaks von 172 keV und 246 keV wurden von einem ADAC (Philips) forte Gerät mit  $3/8''$  Kristall und einem Medium-Energy-General-Purpose-Collimator bei Aufnahmezeiten von 10-30 min erfasst. Mit der Bildbearbeitungssoftware „Pegasys X“ der verwendeten Kamera erfolgte die quantitative Auswertung der szintigraphischen Aufnahmen. Hierfür wurden jeweils ROIs über die gesamte Maus, den vorderen Teil der Maus (Kopf, Brustorgane und Leber) sowie das kaudale Abdomen (Bauchorgane kaudal der Leber und Beckenorgane) gelegt. Die Normierung der Messungen erfolgte mit Hilfe eines Standards, dessen Aktivität 10 % der injizierten Aktivität betrug. Somit konnten die unterschiedlichen Verteilungsmuster von  $^{111}\text{In}$ -IgG beziehungsweise  $^{111}\text{In}$ -IgM nach i.p. und i.v.-Injektion aufgrund quantitativer Berechnungen beurteilt werden.

### 3.3.4.3 Ermittlung der Ausscheidung der Radioimmunkonjugate mittels Bestimmung der Ganzkörperaktivität

Die Ganzkörperaktivität der für die Kinetikversuche mit  $^{111}\text{In-IgG}$  beziehungsweise  $^{111}\text{In-IgM}$  injizierten Mäuse wurde zudem in einem Aktivimeter (capintec) jeweils 0 h, 24 h, 48 h beziehungsweise 72 h nach Injektion bestimmt. Für  $^{111}\text{In-Fab'}$  erfolgte dies analog 0 h, 1 h, 4 h, 20 h, beziehungsweise 24 h nach Injektion. Somit konnte die Ausscheidung der verschiedenen RIK ermittelt werden. Anhand des linearen Verlaufs der Aktivitätskurven wurden mittels Geradengleichung die biologischen Halbwertszeiten für  $^{111}\text{In-IgG}$  beziehungsweise  $^{111}\text{In-IgM}$  berechnet.

Für die statistische Auswertung wurde auch hier wieder für  $^{111}\text{In-IgG}$  beziehungsweise  $^{111}\text{In-IgM}$  ein GEE - Regressionsmodell mit den Einflussgrößen Zeit und Gruppe gerechnet, um die intraindividuelle Korrelation der Messwerte über die Zeit zu berücksichtigen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Qualitätskontrolle nach Eluierung beziehungsweise Kopp- lung der Radionuklide

Abhängig von der Beladung und vom Alter des  $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generators wurden pro Eluierung zwischen 37 MBq (1 mCi) und 185 MBq (5 mCi) an  $^{213}\text{Bi}$  gewonnen.

Nach Inkubation des  $^{213}\text{Bi}$ -Eluats mit den chelatierten Antikörpern beziehungsweise Antikörperfragmenten betrug die Bindung des Radionuklids durchweg mehr als 80 %. Nach Abtrennung freier Radionuklide mittels PD-10 Gelfiltration wurden radiochemische Reinheiten von über 95 % erzielt. Für  $^{111}\text{In}$ -Radioimmunkonjugate waren die Ergebnisse ähnlich gut.

Die spezifische Aktivität für  $^{213}\text{Bi}$ -Fab' betrug bei den Biodistributionsversuchen zirka 1,9 GBq/mg. Das heißt, zirka jedes 1500. Antikörperfragmentmolekül war mit  $^{213}\text{Bi}$  markiert. Die spezifische Aktivität von  $^{213}\text{Bi}$ -IgG betrug 1,3 GBq/mg. Hier war zirka eins von 750 Antikörpermolekülen mit  $^{213}\text{Bi}$  markiert. Die spezifische Aktivität von  $^{213}\text{Bi}$ -IgM betrug bei den Biodistributionsversuchen 0,8 GBq/mg. Hier war aufgrund der Größe des Antikörpers zirka jedes 200. Molekül mit  $^{213}\text{Bi}$  markiert.

Die spezifischen Aktivitäten bei den  $^{111}\text{In}$ -Radioimmunkonjugaten betrugen zirka 0,2 GBq/mg für IgM, IgG und das Antikörperfragment. Somit war zirka jedes 9. IgM Molekül, jedes 46. IgG Molekül und jedes 180. Antikörperfragmentmolekül mit  $^{111}\text{In}$  markiert.

Die spezifische Aktivität von  $^{213}\text{Bi}$ -Fab' betrug im ersten Ansatz des klonogenen Tests 1,1 GBq/mg. Hier war ungefähr eins von 2700 Antikörperfragmentmolekülen mit  $^{213}\text{Bi}$  markiert. Im zweiten Ansatz betrug die spezifische Aktivität des  $^{213}\text{Bi}$ -Radioimmunkonjugats aufgrund der geringen Menge der benötigten Aktivität nur 0,1 GBq/mg. Hier war zirka eins von 27000 Antikörperfragmentmolekülen mit  $^{213}\text{Bi}$  markiert.

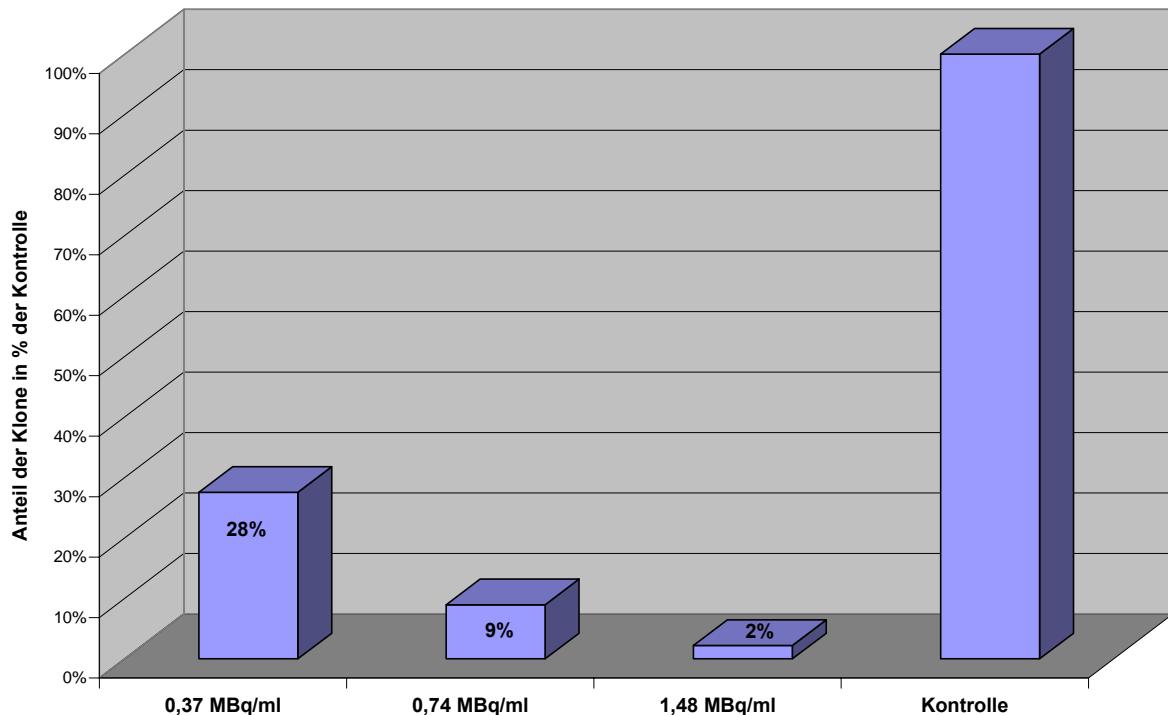
### 4.2 Bindung von $^{213}\text{Bi}$ -IgM und $^{213}\text{Bi}$ -Fab' an HSC45-M2-Zellen

Die Bindung von  $^{213}\text{Bi}$ -IgM an HSC45-M2-Zellen war mit  $0,87 \% \pm 0,1 \%$  (Mittelwert aus 3 Versuchen) wie erwartet sehr gering, da die HSC45-M2-Zellen keine IgM spezifischen Antigene exprimieren.

Die Bindung von  $^{213}\text{Bi}$ -Fab' gegen d9-E-Cadherin an HSC45-M2-Zellen mit d9-E-Cadherin-Expression fiel mit  $2,5 \% \pm 0,24 \%$  unerwartet gering aus. In der Western Blot Analyse gegen d9-E-Cadherin dagegen zeigten die Fab'-Fragmente (ähnlich wie der intakte Antikörper) ein eindeutig positives Signal [Becker, persönliche Mitteilung].

### 4.3 Klonogener Test zur Ermittlung der Toxizität von $^{213}\text{Bi}$ -Fab' und $^{213}\text{Bi}$ -BSA gegen HSC45-M2-Zellen

Im ersten Ansatz (siehe 3.2.7) wurden 100 HSC45-M2-Zellen pro Well 24 Stunden nach Aussaat mit unterschiedlichen Aktivitätskonzentrationen von  $^{213}\text{Bi}$ -Fab' inkubiert. Als Kontrolle dienten entsprechend ausgesäte Zellen, die keine Radioaktivität erhielten. Hier waren im Mittel zirka 50 Zellklone nachweisbar.



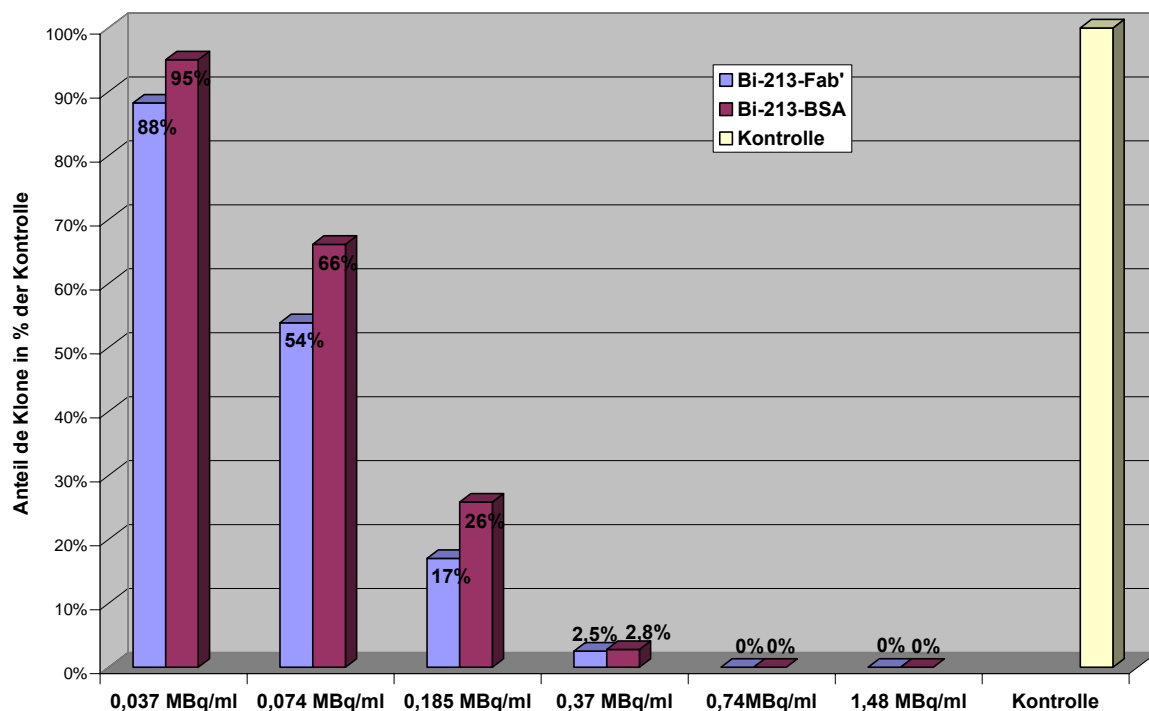
**Abb. 5: Klonogener Test adhärenter Zellen: Toxizität von  $^{213}\text{Bi}$ -Fab' gegen HSC45-M2-Zellen nach Inkubation mit 0,37 MBq/ml (10  $\mu\text{Ci/ml}$ ), 0,74 MBq/ml (20  $\mu\text{Ci/ml}$ ), 1,48 MBq/ml (40  $\mu\text{Ci/ml}$ ) (jeweils  $n = 15$ ) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ( $n = 24$ )**

Abb. 5 zeigt eine deutliche Abnahme der Klonanzahl nach Inkubation der Zellen mit  $^{213}\text{Bi}$ -Fab'. Bereits die Inkubation mit 0,37 MBq/ml (10  $\mu\text{Ci/ml}$ ) senkt den Anteil der überlebenden Klone auf 28 %. Die Inkubation mit 1,48 MBq/ml tötet nahezu sämtliche Zellen mit einem Anteil von 2 % überlebenden Klonen.

Die statistische Auswertung ergab signifikante Unterschiede des klonogenen Überlebens zwischen den mit 0,37 MBq/ml (10  $\mu\text{Ci/ml}$ ) und 0,74 MBq/ml (20  $\mu\text{Ci/ml}$ ) beziehungsweise zwischen den mit 0,37 MBq/ml (10  $\mu\text{Ci/ml}$ ) und 1,48 MBq/ml (40  $\mu\text{Ci/ml}$ ) behandelten Zellen.

Im zweiten Ansatz (siehe 3.2.7) wurden,  $3 \times 10^6$  Zellen durch kontinuierliches Schütteln in Suspension gehalten, mit  $^{213}\text{Bi}$ -Fab' beziehungsweise  $^{213}\text{Bi}$ -BSA inkubiert. Anschließend wurden pro Well 500 Zellen ausgesät und die Klonzahl im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ermittelt. Nach der Inkubation der Zellen mit 0,037, 0,074, 0,185, 0,37, 0,74 und 1,48

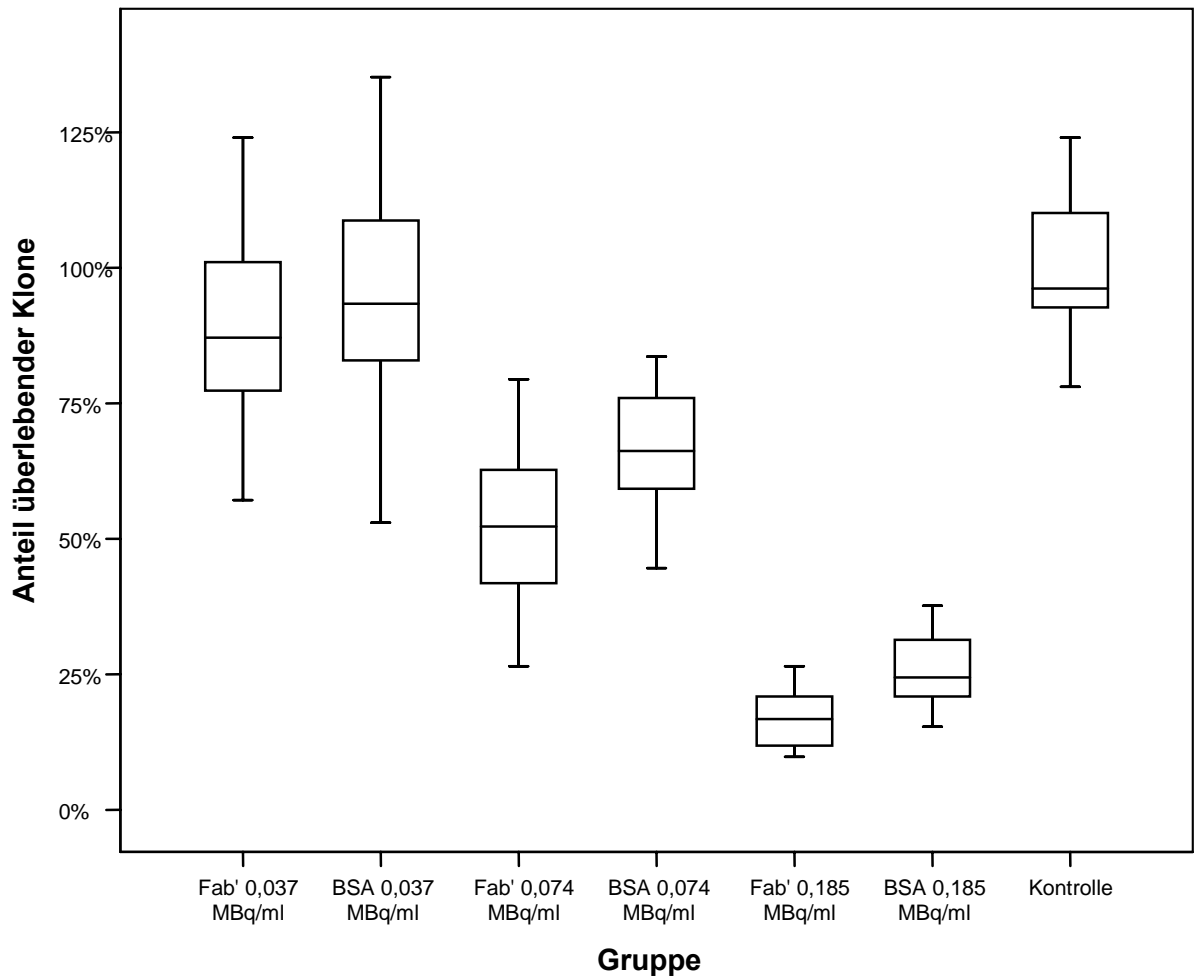
MBq/ml (1, 2, 5, 10, 20 und 40  $\mu\text{Ci/ml}$ )  $^{213}\text{Bi-Fab'}$  beziehungsweise -BSA wuchsen ab den mit 0,74 MBq/ml (20  $\mu\text{Ci/ml}$ ) behandelten Ansätzen keine Zellklone mehr. Bei den mit 0,37 MBq/ml (10  $\mu\text{Ci/ml}$ ) behandelten Ansätzen ergab sich für  $^{213}\text{Bi-Fab'}$  beziehungsweise -BSA ein Anteil von zirka 3 % überlebender Klone. Die Inkubation der Zellen mit 0,037, 0,074, 0,185 MBq/ml (1, 2, 5  $\mu\text{Ci/ml}$ )  $^{213}\text{Bi-Fab'}$  beziehungsweise -BSA ergibt einen größeren Anteil überlebender Klone mit einem Unterschied zwischen  $^{213}\text{Bi-Fab'}$  und  $^{213}\text{Bi-BSA}$ . Abb. 6 zeigt eine deutliche Abnahme des klonogenen Überlebens mit der Zunahme der applizierten Aktivität, wobei nach Applikation von  $^{213}\text{Bi-BSA}$  jeweils geringfügig mehr Zellen überlebten als nach Applikation von  $^{213}\text{Bi-Fab'}$ .



**Abb. 6: Klonogener Test (Zellen in Suspension): Vergleich der Toxizität von  $^{213}\text{Bi-Fab'}$  und  $^{213}\text{Bi-BSA}$  nach Inkubation von  $3 \times 10^6$  Zellen/ml mit 0,037, 0,074, 0,185, 0,37, 0,74 und 1,48 MBq/ml (jeweils  $n = 24$ ).**

Die statistische Auswertung dieses Versuchs ergab signifikante Unterschiede zwischen applizierten Aktivitätskonzentrationen von  $^{213}\text{Bi-Fab'}$  beziehungsweise  $^{213}\text{Bi-BSA}$ . Zudem zeigten sich auch signifikante Unterschiede zwischen den mit  $^{213}\text{Bi-Fab'}$  und mit  $^{213}\text{Bi-BSA}$  behandelten Zellen bei den Aktivitätskonzentrationen 0,074 MBq/ml und 0,185 MBq/ml (2  $\mu\text{Ci/ml}$  und 5  $\mu\text{Ci/ml}$ ) bei einem adjustierten Signifikanzniveau von 0,0167 (Abb. 7).

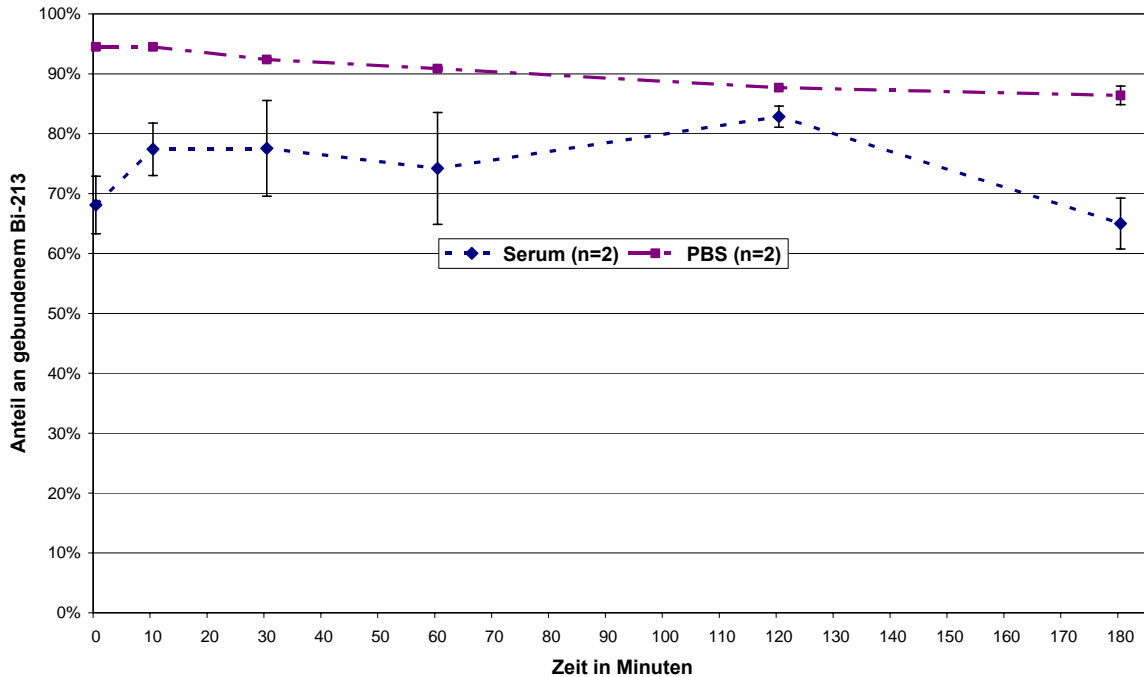




**Abb. 7: Statistische graphische Auswertung der Ergebnisse des klonogenen Tests aus Abb. 6 (jeweils n = 24)**

#### 4.4 Stabilität von $^{213}\text{Bi}$ -IgM in Serum

Die Freisetzung von  $^{213}\text{Bi}$  aus  $^{213}\text{Bi}$ -IgM-Radioimmunkonjugaten wurde vergleichend in Serum und PBS bestimmt. Bereits zum Zeitpunkt 0 (unmittelbar nach Zugabe von  $^{213}\text{Bi}$ -IgM in PBS beziehungsweise Serum) war der Anteil von gebundenem  $^{213}\text{Bi}$  in PBS um zirka 25 % höher als in Serum (Abb. 8). Im zeitlichen Verlauf blieb dieser Unterschied in etwa konstant. In PBS sank der Anteil des gebundenen  $^{213}\text{Bi}$  im Verlauf von 180 min von 95 % auf zirka 87 %.

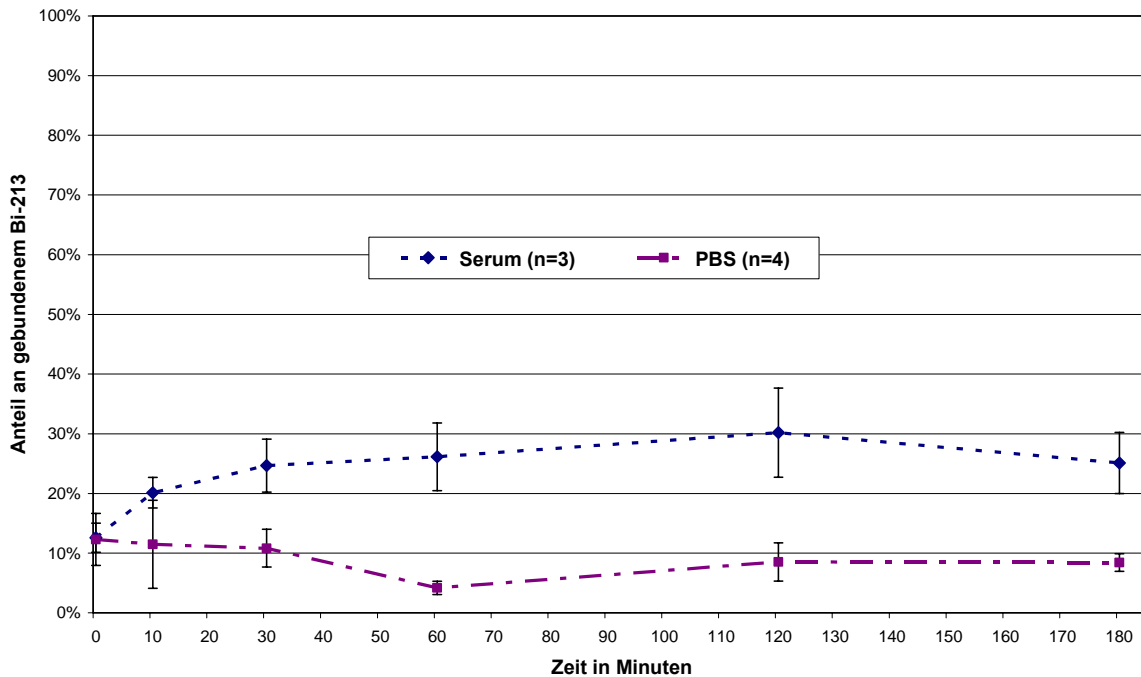


**Abb. 8: Kinetik der Stabilität von  $^{213}\text{Bi}$ -IgM in Serum und PBS**

Die statistische Auswertung der Ergebnisse zeigte signifikante Unterschiede der Messwerte in PBS beziehungsweise Serum ( $p < 0,001$ ), sowie eine signifikante Verringerung der Werte mit der Zeit ( $p < 0,001$ ).

#### 4.5 Bindung von Bi-213 an Proteine des Serums

Zur Analyse der nicht chelat-vermittelten Bindung von  $^{213}\text{Bi}$  an Proteine des Serums wurde freies  $^{213}\text{Bi}$  in Serum beziehungsweise PBS inkubiert und der Anteil der Retention von  $^{213}\text{Bi}$  zu verschiedenen Zeiten mittel ITLC Test bestimmt.



**Abb. 9: Bindung von freiem  $^{213}\text{Bi}$  durch Serum beziehungsweise PBS**

Unmittelbar nach der Inkubation des  $^{213}\text{Bi}$  mit dem Serum beziehungsweise PBS liegt gleich viel ungebundenes  $^{213}\text{Bi}$  vor. Im Zeitverlauf ergab sich ein Unterschied zwischen Serum und PBS von zirka 15-20 % (Abb. 9).  $^{213}\text{Bi}$  bindet an Proteine des Serums, wohingegen  $^{213}\text{Bi}$  in PBS ungebunden bleibt.

Auch hier ergab die statistische Auswertung signifikante Unterschiede der Messwerte zwischen den beiden Gruppen ( $p < 0,001$ ).

## 4.6 Tierexperimente

### 4.6.1 Induktion der Peritonealkarzinose

Die Manifestierung der Peritonealkarzinose durch orthotope Injektion von HSC45-M2-Zellen war trotz Verwendung weiblicher thymoshypoplasierter swiss nu/nu Nacktmäuse nicht hinreichend erfolgreich. Die typische Manifestierung wie sie bei Huber [2003a] beschrieben ist war nicht zu beobachten. Es entwickelten sich lediglich subkutane Tumoren an der Einstichstelle. Diese waren oft mit seröser, klarer Flüssigkeit gefüllt und nahmen über die Zeit an Größe zu. Ein vorzeitiges Versterben der Tiere als Folge der Tumorzellinjektion wurde lediglich bei einer Maus beobachtet. Intraperitoneale Tumoren wurden bei insgesamt sieben Tieren gefunden, wohingegen Aszites nur bei drei Mäusen feststellbar war. Eine klassische Manifestation der Peritonealkarzinose war somit nur bei einem von insgesamt 58 Tieren zu beobachten.

## 4.6.2 Techniken zur In-vivo-Darstellung der Tumoren

Die In-vivo-Darstellung von Tumoren war somit auf die ohnehin schon mit dem bloßen Auge erkennbaren subkutanen Tumoren beschränkt. Die verschiedenen Techniken zur In-vivo-Darstellung bestätigten die optisch sichtbaren subkutanen Tumoren, brachten aber keine weiteren Neoplasien der Tiere hervor.

### 4.6.2.1 In-Vivo-Kernspintomographie

Die In-Vivo-Kernspintomographie wurde zur Untersuchung der Manifestierung einer Peritonealkarzinose in swiss nu/nu Mäusen nach Inokulation von HSC45-M2-Zellen eingesetzt. Exemplarisch für die erhaltenen Ergebnisse sind 2 Mäuse aufgeführt (Abb. 10). Bei Maus 1 entwickelte sich beispielsweise an der Einstichstelle der Tumorzellinjektion ein derber subkutaner Tumor. Im Kernspintomogramm von Maus 2 ist ein mit Flüssigkeit gefüllter Tumor zu erkennen, welcher ebenfalls subkutan lokalisiert ist. In beiden Aufnahmen zeigen sich keinerlei Anzeichen einer Flüssigkeitsansammlung im Abdomen. Bei einer Peritonealkarzinose mit Aszites müssten in der T<sub>2</sub>-Wichtung deutlich helle Abschnitte zwischen den Eingeweiden erkennbar sein [Huber, 2003a].



**Abb. 10:** Kernspintomogramme (T<sub>2</sub>-gewichtete) zweier Nacktmäuse 7 Wochen nach Injektion von  $1 \times 10^7$  HSC45-M2-Zellen. Bei Maus 1 zeigt sich ein derber subkutaner Tumor (Pfeilspitze), bei Maus 2 ein flüssigkeitsgefüllter subkutaner Tumor (Pfeilspitze). Es sind jeweils keine Anzeichen eines Aszites zu erkennen.

### 4.6.2.2 In-Vivo-Positronenemissionstomographie

Zur weiteren Abklärung der Manifestation der Peritonealkarzinose wurden In-Vivo-Positronenemissionstomographien (PET) angefertigt. In der Kernspintomographie nicht detektierbare Tumoren sollten mittels PET aufgrund einer sehr hohen Auflösung erkennbar sein.

Die PET-Aufnahmen der in Abb. 10 mittels Kernspintomographie dargestellten Tiere bestätigen jedoch nur die schon erkennbaren Befunde. Es zeigt sich eine deutliche Anreicherung von FDG in den schon makroskopisch erkennbaren subkutanen Tumoren (Abb. 11).



**Abb. 11: Statische PET-Aufnahmen der in Abb. 10 dargestellten Mäuse. Die Aufnahmen wurden 3 h nach Injektion von jeweils 12-14 MBq (324-378  $\mu$ Ci) in die Schwanzvene gemacht. Es zeigt sich jeweils eine deutliche Anreicherung des Tracers im Tumor.**

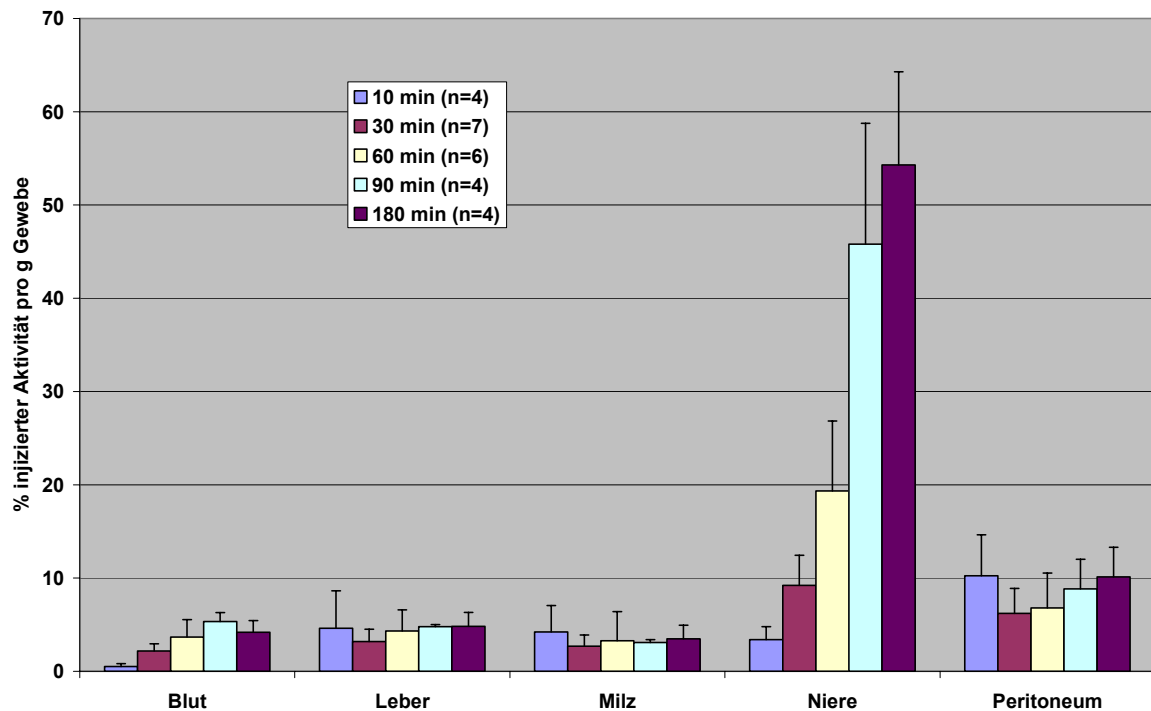
#### 4.6.3 Biodistribution der Radioimmunkonjugate in der Maus

Zur Abschätzung der therapeutischen Effizienz und von toxischen Nebenwirkungen sind Kenntnisse über die Verteilung der  $^{213}\text{Bi}$ -Radioimmunkonjugate in Geweben sowie über die biologische HWZ unabdingbar. Die Versuche wurden aufgrund der Tatsache, dass sich keine Peritonealkarzinose entwickelte, durchwegs an Mäusen durchgeführt, die keinen Tumor trugen. Die durchgeführten Biodistributionsstudien zeigen somit die Verteilung der Radioimmunkonjugate in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht und erlauben eine Aussage welche am besten geeignet erscheinen für die lokoregionale Radioimmuntherapie i.p. disseminierter Tumoren.

##### 4.6.3.1 Organverteilung von $^{213}\text{Bi}$ -Fab'

Tumorfreien Mäusen wurde  $^{213}\text{Bi}$ -Fab' intraperitoneal injiziert. Zu verschiedenen Zeiten nach Injektion (10 min bis 3 h) wurden die Tiere abgetötet, ausgewählte Organe entnommen und deren Radioaktivität im  $\gamma$ -Counter bestimmt. Die Verteilung von  $^{213}\text{Bi}$ -Fab' zeigt über den zeitlichen Verlauf einen Anstieg im Blut (Abb. 12). Das entspricht der Diffusion des RIK von der Peritonealhöhle in den Blutkreislauf. Auffallend ist die hohe Anreicherung des RIK in den Nieren. Diese nimmt über den zeitlichen Verlauf stetig zu und erreicht nach 180 min  $54,3\% \pm 9,98\%$  ID/g. Das bedeutet, dass sich 3 h p.i. ungefähr 20% der injizierten Aktivität in den Nieren befindet. In den übrigen Organen blieb die Anreicherung von  $^{213}\text{Bi}$ -Fab' zu verschiedenen Zeitpunkten konstant.  $^{213}\text{Bi}$ -Fab' geht aufgrund seiner geringen Größe sehr schnell in das Blut über und wird in der Niere retiniert. Aufgrund der hohen Akkumulation in den Nie-

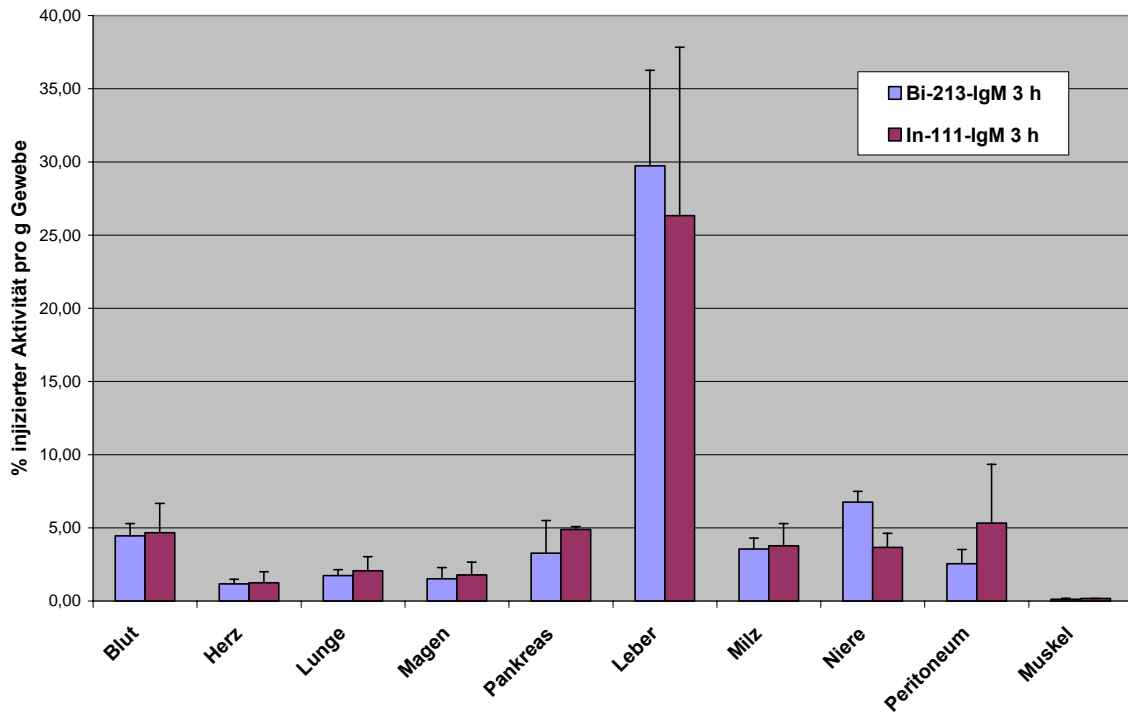
ren bereits 20 min p.i. und der schnellen Resorption aus dem Peritonealraum erscheint  $^{213}\text{Bi-Fab}'$  zur Therapie intraperitoneal disseminierter Tumorzellen als nicht geeignet.



**Abb. 12:** Aktivitätskonzentrationen von  $^{213}\text{Bi-Fab}'$  in ausgewählten Organen 10, 30, 60, 90, und 180 min nach i.p.-Injektion.

#### 4.6.3.2 Organverteilung von $^{213}\text{Bi-IgM}$ / $^{111}\text{In-IgM}$ nach i.p.- Injektion

Die Verweildauer eines Radioimmunkonjugats im Peritoneum ist abhängig vom Molekulargewicht der eingesetzten Substanz. Daher wurde die Biodistribution von IgM-Radioimmunkonjugaten untersucht. Antikörper der Klasse IgM besitzen ein zirka 6 fach höheres Molekulargewicht als IgG-Moleküle und ein zirka 18 fach höheres Molekulargewicht als Fab'-Fragmente. Zur Untersuchung der Verteilung des RIK im Organismus wurde tumorfreien Mäusen  $^{213}\text{Bi-IgM}$  und  $^{111}\text{In-IgM}$  i.p. appliziert und jeweils nach 45 min, 90 min und 3 h beziehungsweise nach 3 h, 24 h und 72 h die Organaktivitäten bestimmt. 3 h nach Injektion ergaben sich für  $^{213}\text{Bi-IgM}$  und  $^{111}\text{In-IgM}$  nahezu identische Organverteilungen. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Biodistribution von IgM nicht durch die Kopplung von  $^{213}\text{Bi}$  beziehungsweise  $^{111}\text{In}$  beeinflusst wird (Abb. 13).



**Abb. 13: Vergleich der Organverteilung von  $^{213}\text{Bi}$ -IgM beziehungsweise  $^{111}\text{In}$ -IgM 3 h nach i.p.-Injektion**

Die Verteilung von IgM-Radioimmunkonjugat in Abhängigkeit zu der Zeit nach i.p.-Injektion ergab eine Zunahme der Anreicherung im Blut bis 3 h nach Applikation. Nach 24 h beziehungsweise 72 h konnte im Blut kaum noch  $^{111}\text{In}$ -Aktivität detektiert werden (Abb. 14). Eine auffällige Akkumulation von IgM war in der Leber zu beobachten. 3 Stunden nach Applikation wurde ein Wert von  $29,7\% \pm 6,5\% \text{ ID/g}$  erreicht, was zirka 33 % der injizierten Gesamtaktivität entspricht. Im weiteren Verlauf reduzierte sich die Aktivitätskonzentration auf  $16,6\% \pm 2,2\%$  (24 h) beziehungsweise  $19,3\% \pm 4,4\%$  (72 h) ID/g, war damit aber immer noch deutlich höher als in den übrigen Organen. Die Verteilung auf die restlichen Organe zeigte Werte bis maximal zirka 5 % ID/g und nur geringe Schwankungen im Zeitverlauf.

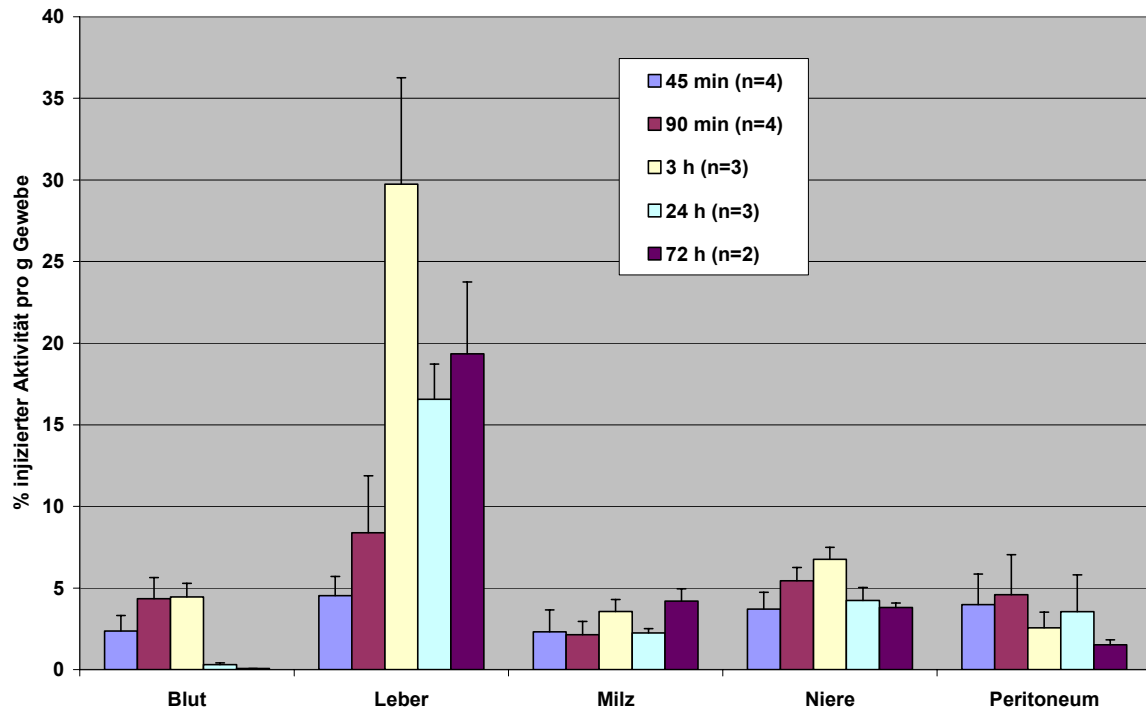


Abb. 14: Verteilung von  $^{213}\text{Bi}$ -IgM 45 min, 90 min und 3 h sowie von  $^{111}\text{In}$ -IgM 24 h und 72 h nach i.p. Injektion in Blut, Leber, Milz, Niere und Peritoneum



#### 4.6.3.3 Organverteilung von $^{213}\text{Bi-IgG}$ / $^{111}\text{In-IgG}$ nach i.p.- Injektion

Analog zu IgM wurde die Biodistribution von  $^{213}\text{Bi-IgG}$  45 min, 90 min beziehungsweise 3 h sowie von  $^{111}\text{In-IgG}$  24 h beziehungsweise 72 h nach i.p. Injektion in tumorfreien Balb/c Mäusen untersucht. Es zeigte sich eine rasche, hohe Anreicherung des IgG-Radioimmunkonjugats im Blut, die über 72 h konstant bei zirka 15 % ID/g blieb (Abb. 15). Dies entspricht in etwa 25 % der injizierten Gesamtaktivität. In den übrigen Organen, mit Ausnahme der Leber, zeigten sich durchweg höhere Aktivitäten als nach Injektion der IgM-Radioimmunkonjugate.

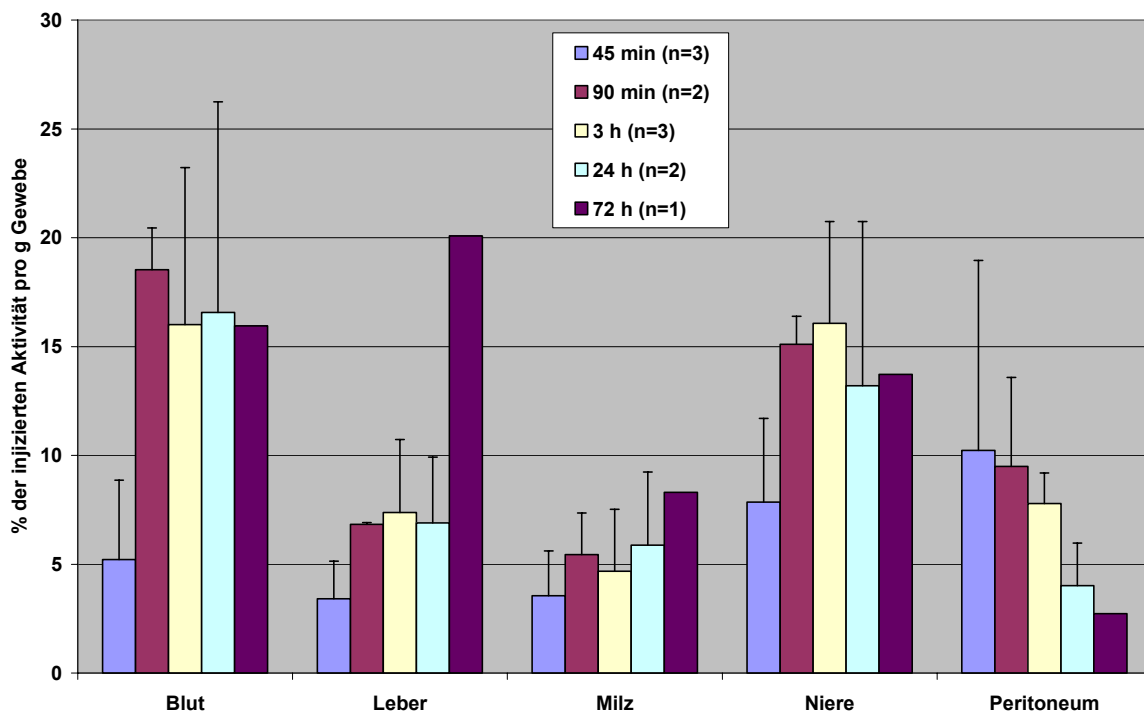
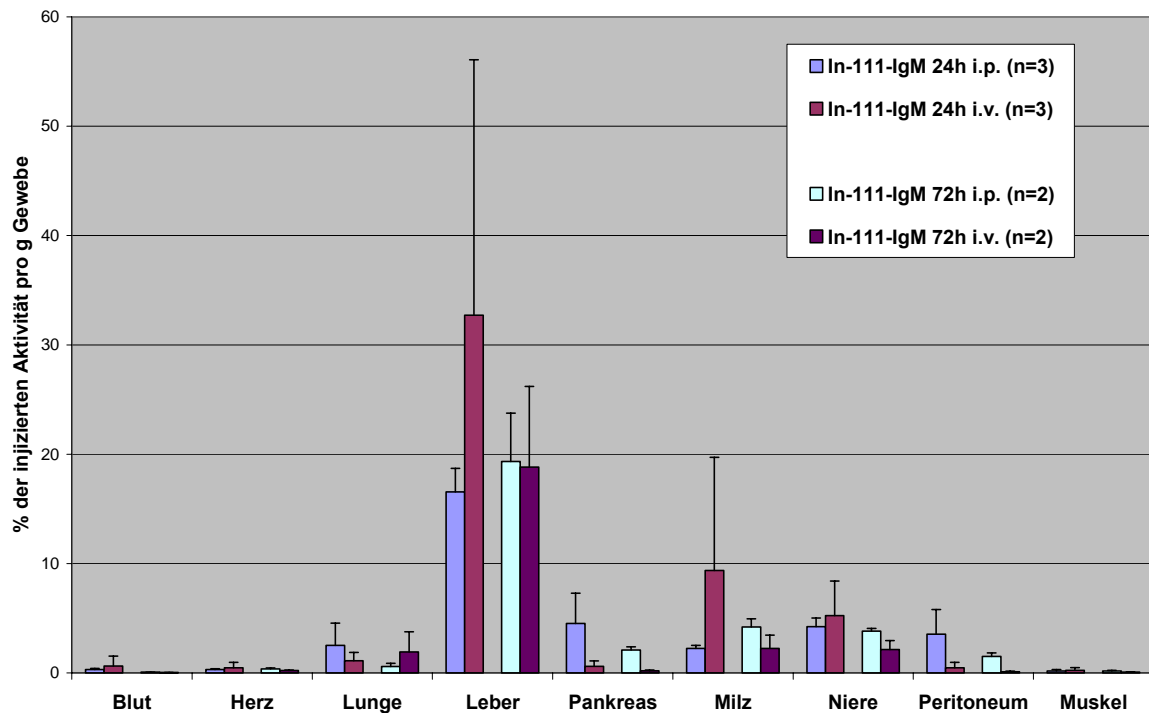


Abb. 15: Verteilung von  $^{213}\text{Bi-IgG}$  45 min, 90 min und 3 h sowie von  $^{111}\text{In-IgG}$  24 h und 72 h nach i.p. Injektion in Blut, Leber, Milz, Niere und Peritoneum

#### 4.6.3.4 Organverteilung von $^{111}\text{In-IgM}$ nach i.v. Injektion im Vergleich zur i.p. Injektion

Die Biodistribution von  $^{111}\text{In-IgM}$  wurde 24 h und 72 h nach i.v. Injektion in tumorfreien Balb/c Mäusen mit den entsprechenden Ergebnissen nach i.p. Injektion verglichen (Abb. 16).



**Abb. 16: Verteilung von  $^{111}\text{In-IgM}$  24 Stunden und 72 Stunden nach i.p. beziehungsweise i.v. Injektion in Blut, Herz, Lunge, Leber, Pankreas, Milz, Niere, Peritoneum, Muskel im Vergleich.**

24 Stunden nach Injektion von  $^{111}\text{In-IgM}$  ergaben sich deutliche Unterschiede zwischen i.p. und i.v. Injektion (Abb. 16). Auffallend waren die hohen Aktivitäten in Leber und Milz nach i.v. Injektion. 72 h nach Applikation näherten sich die Werte von i.v. und i.p. Injektion an und erreichten ein nahezu identisches Niveau mit Ausnahme des Peritoneums.

#### 4.6.3.5 Organverteilung von $^{111}\text{In-IgG}$ nach i.v. Injektion im Vergleich zur i.p. Injektion

Die Biodistribution von  $^{111}\text{In-IgG}$  wurde ebenfalls 24 h und 72 h nach i.v. Applikation im Vergleich zur i.p. Injektion untersucht. Dabei ergaben sich für alle untersuchten Organsysteme jeweils nahezu identische Aktivitätskonzentrationen sowohl nach 24 h als auch nach 72 h (Abb. 17).

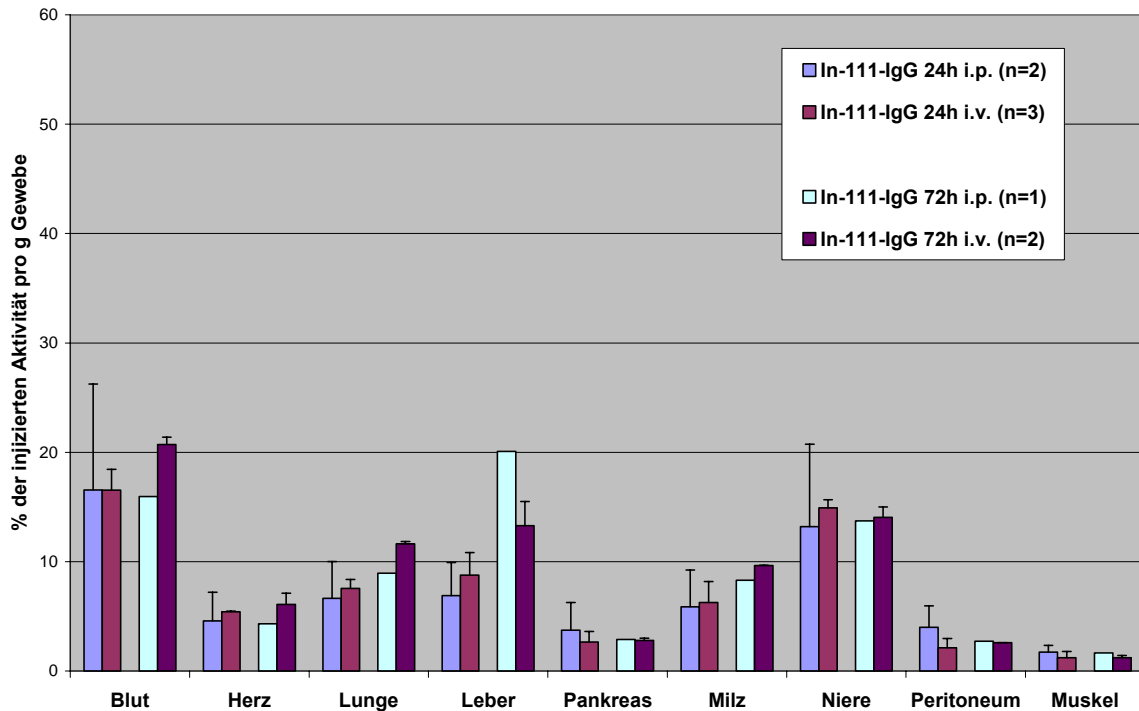


Abb. 17: Verteilung von  $^{111}\text{In-IgG}$  24 Stunden und 72 Stunden nach i.p. beziehungsweise i.v. Injektion in Blut, Herz, Lunge, Leber, Pankreas, Milz, Niere, Peritoneum, Muskel im Vergleich.

#### 4.6.3.6 Vergleich der Organverteilung von $^{111}\text{In-IgM}$ und $^{111}\text{In-IgG}$ nach i.v. Injektion

Hinsichtlich der Aktivitätskonzentrationen von  $^{111}\text{In-IgM}$  und  $^{111}\text{In-IgG}$  in Blut und Leber zeigten sich nach i.v. Injektion deutliche Unterschiede. Die schon unter 4.6.3.2 beschriebene starke Anreicherung von IgM nach i.p. Injektion in der Leber war auch nach i.v. Applikation beobachtbar und fiel bei IgM noch deutlich höher aus als bei IgG. Ein signifikanter Unterschied fand sich auch hinsichtlich der Verteilung der Radioimmunkonjugate im Blut: 24 h beziehungsweise 72 h nach  $^{111}\text{In-IgG}$ -Injektion befinden sich  $16,6\% \pm 1,9\%$  beziehungsweise  $20,7\% \pm 0,7\%$  ID/g im Blut, bei  $^{111}\text{In-IgM}$  dagegen nur  $0,64\% \pm 0,89\%$  beziehungsweise  $0,06\% \pm 0,01\%$  ID/g. Diese Befunde belegen eine im Vergleich zu IgG schnellere Elimination von IgM aus dem Blut und eine Akkumulation von IgM in der Leber.

#### 4.6.3.7 Beobachtung der Kinetik mittels Szintigraphie

Zur Überprüfung der in den Biodistributionsstudien gewonnenen Daten wurde die Verteilung von  $^{111}\text{In-IgM}$  beziehungsweise  $^{111}\text{In-IgG}$  auch nicht invasiv mittels Szintigraphie zu verschiedenen Zeitpunkten nach i.v. beziehungsweise i.p. Injektion analysiert.

Drei Stunden nach Injektion von  $^{111}\text{In-IgM}$  sieht man einen deutlichen Unterschied zwischen i.v. und i.p. Injektion. Nach i.p. Applikation ist Aktivität über dem kaudalen Abdomen messbar. Dieser Unterschied zwischen i.v. und i.p. Injektion bleibt über den gesamten Zeitverlauf erhalten und ist auch noch 72 h p.i. erkennbar. Die schon in der Biodistribution starke Anreicherung in der Leber nach i.v. sowie nach i.p. Applikation von  $^{111}\text{In-IgM}$  ist auch in den szintigraphischen Aufnahmen gut zu erkennen und stellt insbesondere nach i.v. Injektion den einzig erkennbaren Ort von Aktivitätsanreicherung dar (Abb. 18).

Nach i.v. beziehungsweise i.p. Injektion von  $^{111}\text{In-IgG}$  ist ein Unterschied nur 3 h p.i. erkennbar. Hier zeigt sich nach i.p. Applikation eine Aktivitätsretention im kaudalen Abdomen. Über den zeitlichen Verlauf ist dieser Unterschied jedoch nicht mehr auszumachen und es zeigt sich ein nahezu identisches Verteilungsmuster. Die höchste Aktivität findet sich nach i.v. sowie nach i.p. Injektion im Bereich des Thorax. Dies entspricht den blutgefüllten Organen Lunge beziehungsweise Herz, die, aufgrund der hohen Aktivitätskonzentration und der langen Verweildauer von  $^{111}\text{In-IgG}$  im Blut, eine hohe Aktivität im Szintigramm aufweisen. Das Verteilungsmuster der Biodistribution ist auch hier wieder gut mit den szintigraphischen Aufnahmen vereinbar (Abb. 18).

Zwischen der Verteilung von  $^{111}\text{In-IgM}$  und  $^{111}\text{In-IgG}$  sind in den szintigraphischen Aufnahmen auch deutliche Unterschiede zu erkennen. Bei  $^{111}\text{In-IgM}$  bleibt die höhere Aktivität im kaudalen Abdomen über den gesamten Zeitverlauf erhalten, bei  $^{111}\text{In-IgG}$  dagegen ist ein Unterschied zwischen i.v. und i.p. Injektion nur nach 3 h zu erkennen. Bei der Verteilung von  $^{111}\text{In-IgM}$  in der Maus zeigt sich die höchste Aktivität in der Leber, wohingegen die Verteilung von  $^{111}\text{In-IgG}$  eine Anreicherung im Bereich des Thorax aufweist. Des weiteren zeigen die Szintigramme von  $^{111}\text{In-IgG}$  eine Aktivität über dem gesamten Tierkörper, bei  $^{111}\text{In-IgM}$  ist die Aktivitätsanreicherung auf die Leber oder auf die Leber und das kaudale Abdomen begrenzt. Dies deutet wiederum auf eine schnellere Metabolisierung des IgM in der Leber, nach Übergang ins Blut, im Vergleich zu IgG hin (Abb. 18).

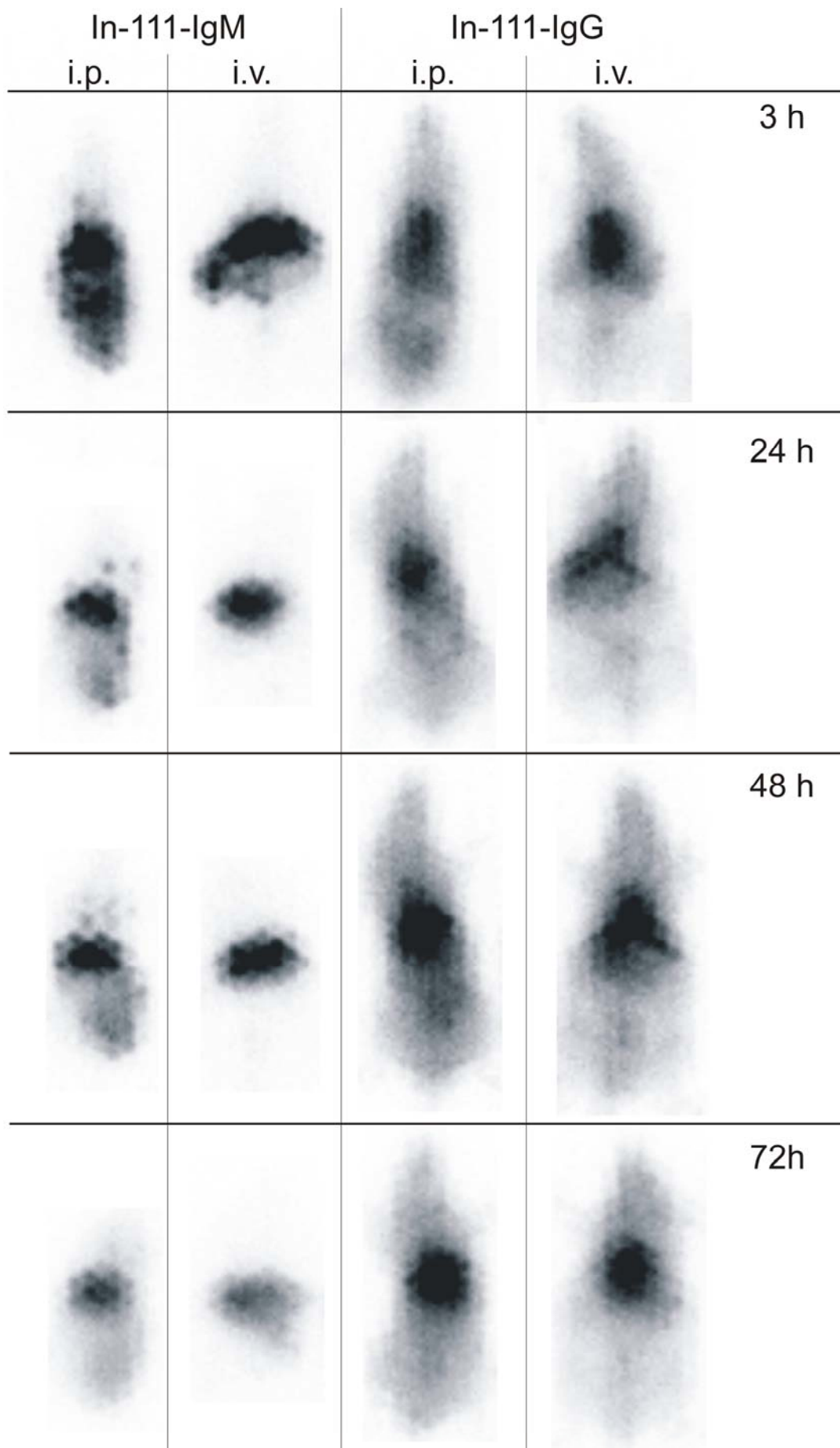
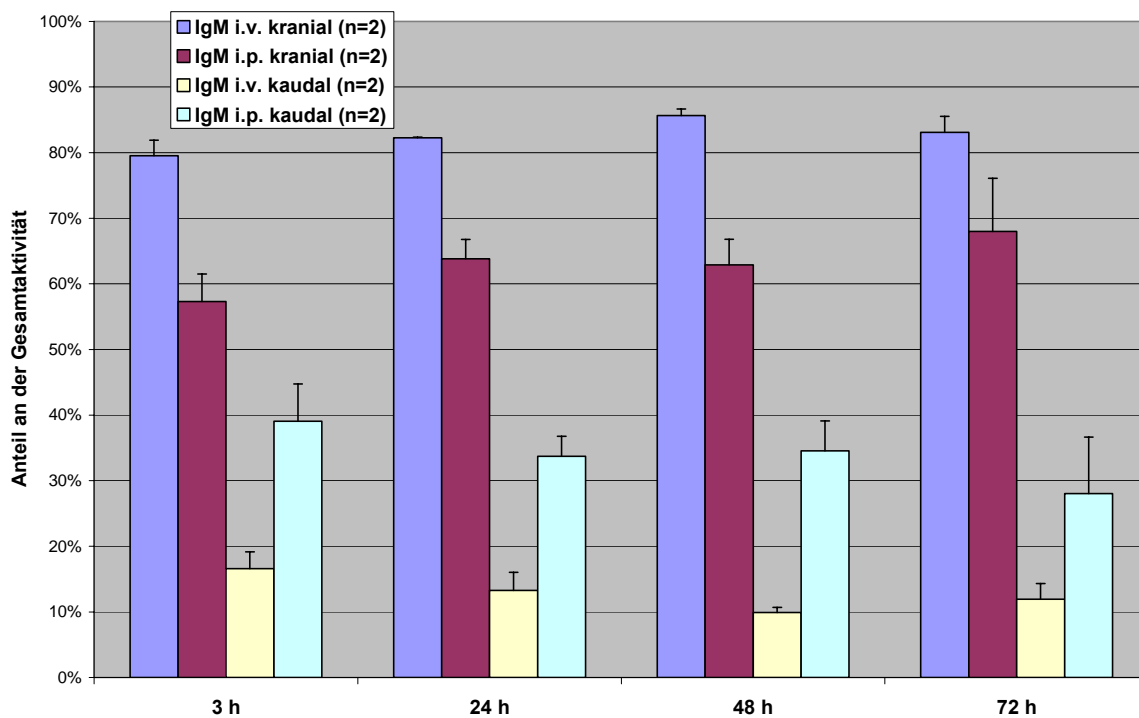


Abb. 18: Szintigramme 3 h, 24 h, 48 h und 72 h nach i.p. sowie i.v. Injektion von jeweils 5,55 MBq (150 µCi) <sup>111</sup>In-IgM beziehungsweise <sup>111</sup>In-IgG.

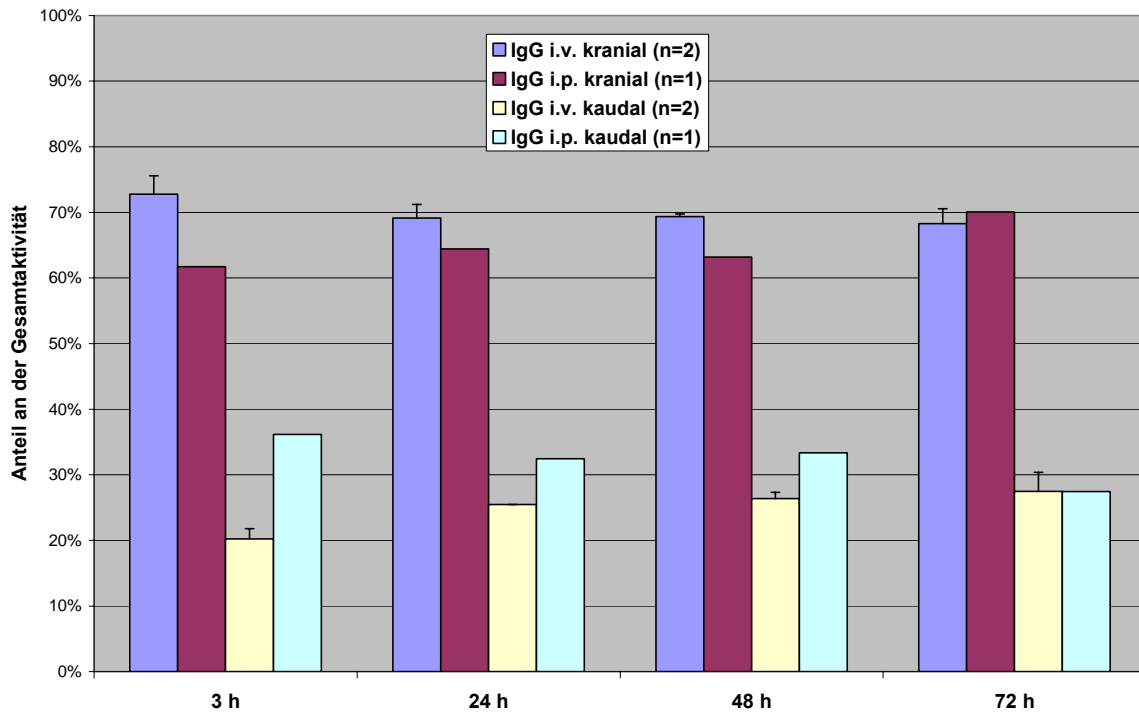
Die in Abb. 18 veranschaulichten Unterschiede hinsichtlich der Verteilung von  $^{111}\text{In-IgM}$  und  $^{111}\text{In-IgG}$  wurden mit Hilfe kranial und kaudal definierter ROIs, wie unter 3.3.4.2 beschrieben, quantifiziert. Die Grenze zwischen beiden ROIs wurde kaudal der gut erkennbaren Leber gezogen. Die angegebenen Werte entsprechen dem jeweiligen Anteil der für das gesamte Tier bestimmten Aktivität.

Die bereits in den Szintigrammen erkennbare unterschiedliche Verteilung von  $^{111}\text{In-IgM}$  nach i.p. beziehungsweise i.v. Injektion konnte mittels Quantifizierung bestätigt werden. Über den gesamten Verlauf der Messungen war in den kranialen ROIs nach i.v. Injektion eine höhere Aktivität als nach i.p. Injektion messbar (Abb. 19). In den kaudalen ROIs blieb die Aktivität durchweg höher (bis zu 2,7 fach) nach i.p. Injektion im Vergleich zur i.v. Injektion. Dieser Befund spricht für eine vergleichsweise lange Retention von IgM im Peritoneum nach i.p. Injektion.



**Abb. 19: Quantifizierung der mittels Szintigraphie veranschaulichten Verteilung von  $^{111}\text{In-IgM}$  nach i.p. sowie i.v. Injektion über kranial und kaudal definierten ROIs 3 h, 24 h, 48 h und 72 h p.i..**

3 Stunden nach Applikation von  $^{111}\text{In-IgG}$  zeigte sich in den kaudalen ROIs nach i.p. Injektion ein annähernd doppelt so hoher Wert als nach i.v. Injektion (Abb. 20). Mit zunehmender Zeit verringerte sich dieser Unterschied und war 72 h p.i. nicht mehr zu beobachten. Im kranialen Teil ist dieser Unterschied nicht so stark ausgeprägt und nahm ebenfalls über den Zeitverlauf ab, bis er 72 h p.i. nicht mehr vorhanden ist.



**Abb. 20: Quantifizierung der mittels Szintigraphie veranschaulichten Verteilung von  $^{111}\text{In-IgG}$  nach i.p. sowie i.v. Injektion über kranial und kaudal definierten ROIs 3 h, 24 h, 48 h und 72 h p.i..**

Die Verteilung von  $^{111}\text{In-Fab'}$  wurde ebenfalls nach i.p. beziehungsweise i.v. Injektion mittels Szintigraphie untersucht. Aufgrund ihres vergleichsweise geringen Molekulargewichts gelangen Fab'-Radioimmunkonjugate nach i.p. Applikation relativ schnell in den Blutkreislauf. Wie in Abb. 21 zu sehen ist, ist 1 h p.i. noch ein Unterschied zwischen i.p. und i.v. Injektion vorhanden, wohingegen 24 h p.i. die Unterschiede gering sind. Auffällig ist die in beiden Gruppen, schon nach 1 h gut erkennbare, starke Anreicherung von  $^{111}\text{In-Fab'}$  in den Nieren.

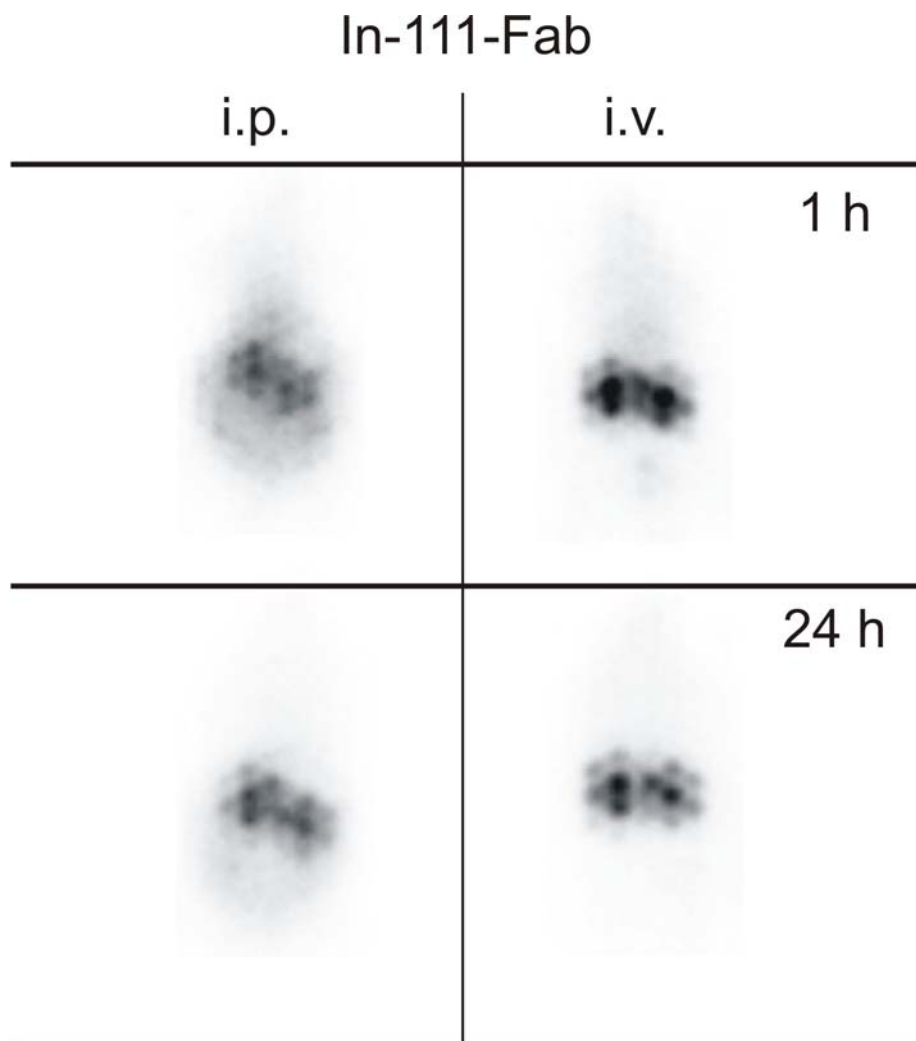


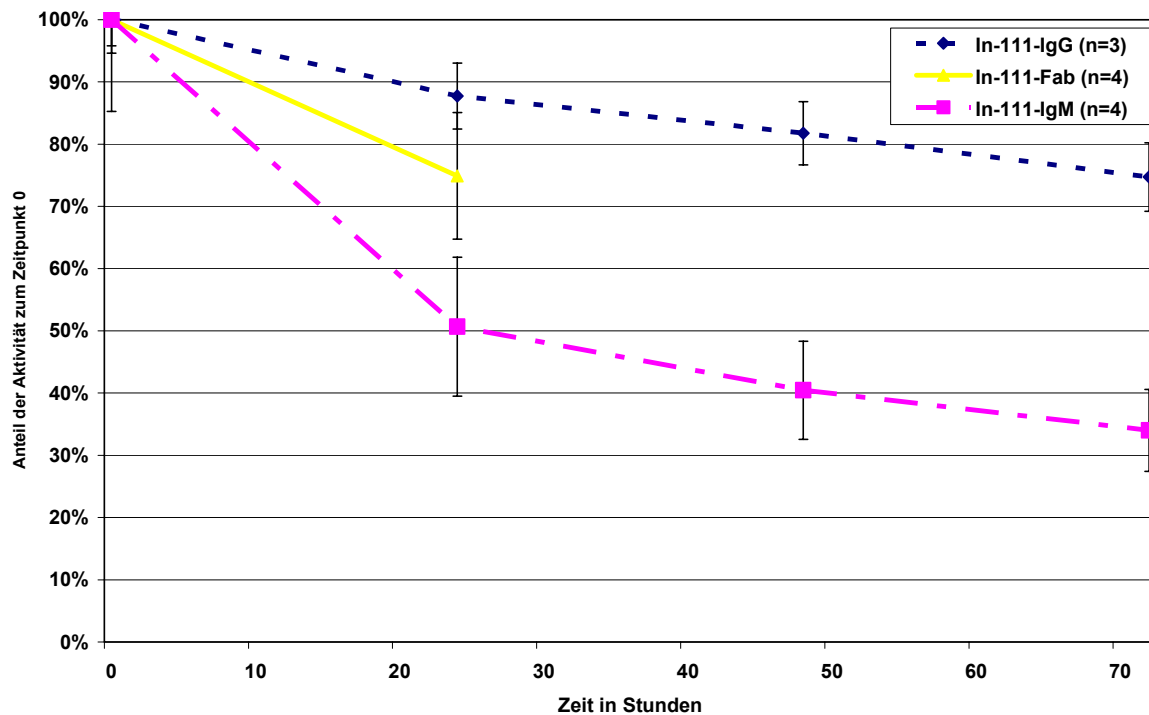
Abb. 21: Szintigramme 1 h und 24 h nach i.p. beziehungsweise i.v. Injektion von jeweils 5,55 MBq (150  $\mu$ Ci)  $^{111}\text{In-Fab}'$ .

#### 4.6.4 Ganzkörperausscheidung der Radioimmunkonjugate

Mittels Szintigraphie zeigten sich deutliche Unterschiede im Verteilungsmuster von  $^{111}\text{In-IgG}$  beziehungsweise  $^{111}\text{In-IgM}$  nach i.p. beziehungsweise i.v. Injektion. Zur Untersuchung der Ganzkörperausscheidung der beiden Radioimmunkonjugate, wurde jeweils zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion die Gesamtaktivität der Tiere gemessen. Dargestellt sind die Ergebnisse als prozentualer Anteil der Ganzkörperaktivität zum Zeitpunkt 0. Es zeigte sich eine wesentlich schnellere Ausscheidung von  $^{111}\text{In-IgM}$  als von  $^{111}\text{In-IgG}$ , wie bereits aufgrund der szintigraphisch ermittelten Ergebnisse vermutet werden konnte (Abb. 22). Die Aktivität von  $^{111}\text{In-IgM}$  verringerte sich (zerfallskorrigiert) innerhalb von 24 Stunden auf fast die Hälfte des Ausgangswertes (50,7 %). Bei  $^{111}\text{In-IgG}$  sank die zum Zeitpunkt 0 ermittelte Aktivität nach 24 h nur um zirka 12 % auf 87,7 % der ursprünglichen Aktivität ab. Zwischen 24 und 72 h verlief die Abnahme der Aktivität für  $^{111}\text{In-IgM}$  beziehungsweise  $^{111}\text{In-IgG}$  in etwa parallel und resultierte bei 34 % für IgM und 74,7 % für IgG. In der statistischen Auswertung mittels



GEE-Regressionsmodell ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen  $^{111}\text{In-IgG}$  und  $^{111}\text{In-IgM}$  ( $p < 0,001$ ), sowie eine signifikante Verringerung der Werte mit der Zeit ( $p < 0,001$ ).



**Abb. 22: Anteil der Ganzkörperaktivität (Verglichen mit der anfänglichen Aktivität) (zerfallskorrigiert) in Mäusen 0 h, 24 h, 48 h und 72 h nach Injektion von  $^{111}\text{In-IgG}$  (1 Maus i.p. und 2 Mäuse i.v.) beziehungsweise  $^{111}\text{In-IgM}$  (jeweils 2 Mäuse i.p. und i.v.) und in Mäusen 0 h und 24 h nach Injektion von  $^{111}\text{In-Fab}$  (jeweils 2 Mäuse i.p. und i.v.).**

Für  $^{111}\text{In-Fab}$  wurde die Ausscheidung 0 h, 1 h, 4 h, 20 h und 24 h nach Injektion ermittelt. Da die Punkte alle auf einer Geraden liegen, wurden in Abb. 22 nur Punkt 0 und 24 eingezeichnet. Die zum Zeitpunkt 0 gemessene Aktivität fiel nach 24 h um zirka 25 % auf einen Wert von 74,9 % ab. Die Ausscheidung von  $^{111}\text{In-Fab}$  ist somit geringer als diejenige von  $^{111}\text{In-IgM}$  und höher als diejenige von  $^{111}\text{In-IgG}$ .

Die berechneten biologischen Halbwertszeiten im Gesamtkörper betragen für  $^{111}\text{In-IgM}$  24 Stunden, für  $^{111}\text{In-Fab}$  45 Stunden und für  $^{111}\text{In-IgG}$  165 Stunden.

## 5 Diskussion

Die Peritonealkarzinose als Folge der kavitären Metastasierung des Ovarialkarzinoms, des Magenkarzinoms, des Pankreaskarzinoms und kolorektaler Karzinome stellt eine schwer zu behandelnde Komplikation dieser Erkrankungen dar. Das Vorhandensein einer Peritonealkarzinose geht mit einer deutlichen Verschlechterung der Gesamtprognose einher. Zum einen sind einzelne disseminierte Tumorzellen nur schwer nachzuweisen, zum anderen sind die Standardtherapien für dieses fortgeschrittene Krankheitsstadium nur unzureichend effizient. Da der Differenzierungsgrad des Primärtumors die Prognose der Patienten mit Peritonealkarzinose nicht beeinflusst, kommt der Therapie der metastasierten Zellen eine entscheidende Bedeutung zu.

### 5.1 Peritonealkarzinosemodell

Das Ziel war die Etablierung eines Peritonealkarzinosemodells mit humanen Magenkarzinomzellen, die eine Deletion im Exon 9 aufweisen um die Biokinetik des spezifischen Anti-delta 9-E-Cadherin Antikörperfragments zu analysieren. Hierzu wurde das von Senekowitsch et al. [2001] für MDA-MB-435S-Zellen etablierte und von Huber et al. [2003b] erfolgreich mit HSC45-M2-Zellen angewandte Peritonealkarzinosemodell verwendet. Es wurden wie beschrieben jeweils  $1 \times 10^7$  HSC45-M2-Zellen thymushypoplasiierten swiss nu/nu Nacktmäusen intraperitoneal injiziert. Insgesamt 58 Mäuse wurden in vier unabhängigen Experimenten mit HSC45-M2-Zellen xenotransplantiert.

Die Entstehung von subkutanen Tumoren an der Einstichstelle der Zellinjektion zeigt, dass die Tumorzellen noch proliferieren können. Die Etablierung eines Peritonealkarzinosemodells mit disseminierten Tumoren in der Peritonealhöhle, wie sie bei Huber et al. [2003b] und Bloechl et al. [2005] gezeigt wurde, war jedoch nicht zu erreichen. Es wurde somit nur ein unbefriedigendes Ergebnis erzielt. Verglichen mit anderen Magenkarzinomzelllinien, wie zum Beispiel HSC-41, HSC-57 oder HSC-60, besitzt die hier verwendete im Gegensatz das Potential zur peritonealen Zelldissemination und scheint somit für ein Karzinosemodell als geeignet. Allerdings wird die HSC45-Zelllinie hinsichtlich der peritonealen Invasivität noch von zwei anderen Magenkarzinomzelllinien, HSC-44PE und HSC-58, übertroffen [Yanigihara et al., 2004]. Diese beiden Zelllinien eines szirrhösen Magenkarzinoms besitzen überdies die Fähigkeit zur spontanen Metastasierung in die Lungen und in Lymphknoten nach subkutaner Injektion in Mäusen. Gegen eine Verwendung einer dieser beiden Zelllinien sprach zum einen das Fehlen des mutierten E-Cadherins bei den HSC-58-Zellen und zum anderen die mangelnde Verfügbarkeit der HSC-44-PE-Zellen. Eine Ursache für das Scheitern der intraperitonealen

Dissemination könnte eine Veränderung der HSC45-M2-Zellen im Zuge der Kultivierung gewesen sein. Durch die Isolierung von Tumorzellen aus dem Aszites von HSC-44PE beziehungsweise HSC-58 induzierten Magenkarzinomen werden diese aggressiver. Die so isolierten und nach Kultivierung erneut implantierten Tumorzellen führen in einem hohen Prozentsatz zu Peritonitis und blutigem Aszites [Yanagihara et al., 2005]. So könnte es umgekehrt denkbar sein, dass die Kultivierung der Zellen *in vitro* im Gegensatz zur Injektion *in vivo*, die Invasivität der Zellen herabsetzt, da die Tumorzellen keinen Abwehrmechanismen ausgesetzt sind.

Die ausbleibende Manifestierung der Peritonealkarzinose in dieser Arbeit könnte auch in Zusammenhang mit den thymushypoplasiierten *swiss nu/nu* Nacktmäusen stehen. So verhindert beispielsweise eine Virusinfektion der Mäuse eine erfolgreiche Manifestierung der Peritonealkarzinose [R. Beck, persönliche Mitteilung]. Da diese aber mit einer deutlichen Reduzierung des Allgemeinzustandes der Tiere verbunden ist, und dies bei den in dieser Arbeit verwendeten Tieren nicht der Fall war, ist speziell diese Ursache unwahrscheinlich. Es ist aber durchaus denkbar, dass eine makroskopisch nicht erkennbare Affektion der Mäuse eine erfolgreiche Manifestierung der Peritonealkarzinose verhindert hat. Auch bei der Anzahl der zu injizierenden Tumorzellen gibt es deutliche Unterschiede in der Literatur. Bei MKN-45-EGFP humanen Magenkarzinomzellen beispielsweise sind für eine erfolgreiche Manifestierung der Peritonealkarzinose nur  $1 \times 10^4$  Zellen bei BALB/c Nacktmäusen notwendig [Mori et al., 2005]. Dies zeigt die enorme Varianz und Unterschiedlichkeit bei Tiermodellen mit humanen Tumorzellen. Es sind vielfältige Ursachen für ein Scheitern eines Tumormodells in einem komplexen vitalen System denkbar, auch wenn objektiv auf sämtliche mögliche Fehlerquellen geachtet wurde. Aufgrund der Tatsache, dass keine Peritonealkarzinose erzeugt werden konnte, wurde die Biokinetik der Radioimmunkonjugate in dieser Arbeit an tumorfreien Mäusen untersucht.

## **5.2 Biokinetik und Bindungseigenschaften der Antikörper beziehungsweise Antikörperfragmente**

### **5.2.1 Biokinetik und Bindungseigenschaften von $^{213}\text{Bi}/^{111}\text{In}$ -Fab'**

Die viel versprechenden Ergebnisse der Therapiestudien mit spezifischen radioaktiv markierten Antikörpern [Huber et al., 2003b, Bloechl et al., 2005, Beck et al., 2007] zog eine weitere Entwicklung schneller zu synthetisierender Immunglobuline nach sich. Da die Sequenz von dem in den Therapiestudien verwendeten d9MAb (Anti-d9-E-Cadherin), Klon 6H8, IgG2a jedoch nicht zur Verfügung stand, wurden Fab'-Fragmente gentechnisch mit Hilfe der Se-

quenz des Klons 7E6 (IgG1) hergestellt. Der intakte 7E6 Antikörper zeigte im Western Blot eine etwas bessere Bindung gegen d9-E-Cadherin als der 6H8 Antikörper. Die synthetisierten 7E6 Fab'-Fragmente zeigten im Western Blot eine ähnlich gute Bindung wie der intakte 7E6 beziehungsweise 6H8 Antikörper gegen d9-E-Cadherin [K. F. Becker, persönliche Mitteilung]. Die für die Bindungsstudien verwendeten  $^{213}\text{Bi}$ -Fab'-Konjugate wiesen durchweg radiochemische Reinheiten von  $> 95\%$  auf.

Die Bindung von  $^{213}\text{Bi}$ -d9-Fab' an HSC45-M2-Zellen von  $2,5\%$  war im Vergleich zu der des intakten  $^{213}\text{Bi}$ -d9Mab (6H8) ( $25\%$ ) deutlich geringer und nur etwas höher als diejenige von  $^{213}\text{Bi}$ -BSA ( $0,5\%$ ) [Huber et al., 2003b]. Dies zeigt, dass die Qualität der Erkennung eines Antigens durch einen Antikörper in Abhängigkeit von der Untersuchungsmethode variieren kann. So erkennt der 7E6 Antikörper d9-E-Cadherin im Western Blot besser als der 6H8 Antikörper. In vivo allerdings scheint er sich jedoch anders zu verhalten. Ähnliches gilt, dementsprechend, wahrscheinlich für die Fab'-Fragmente. Ein weiterer Grund für die schlechte Bindung von  $^{213}\text{Bi}$ -d9-Fab' an HSC45-M2-Zellen ist die in der Regel schlechtere Bindung von Antikörperfragmenten als die von intakten Antikörpern. Auch die Chelatierung der Antikörperfragmente beeinträchtigt deren Bindungsverhalten: Da es sich um kleinere Moleküle handelt, wird hier öfter die Bindungsstelle maskiert als bei intakten Antikörpern. Zudem kann der  $^{213}\text{Bi}$ -Chelat-Komplex, der im Vergleich zum Fab'-Fragment relativ groß ist, die Bindung des Fragments eventuell negativ beeinflussen. Die spezifische Bindung des hier untersuchten Antikörperfragments ist in etwa mit der des unspezifischen Anti-Delta-8-Antikörpers von Huber et al. [2003b] von  $2\%$  vergleichbar. Auch mit einem  $^{213}\text{Bi}$ -RIK dieses Antikörpers konnte in Therapiestudien eine deutliche Verlängerung der Überlebenszeit xenotransplantierte Mäuse erreicht werden.

Zur Analyse der Zytotoxizität des  $^{213}\text{Bi}$ -d9-Fab' wurden klonogene Tests durchgeführt. Im ersten Ansatz (siehe 3.2.7), modifiziert nach Seidl et al. [2005], zeigte sich mit zunehmender  $^{213}\text{Bi}$ -Aktivitätskonzentration eine zunehmende Toxizität von  $^{213}\text{Bi}$ -Fab' gegenüber HSC45-M2-Zellen. Bei Verdopplung der Aktivitätskonzentration nahm die Klonanzahl jeweils um zirka  $70\%$  ab. Nach Inkubation mit  $1,48\text{ MBq/ml}$  überlebten nur noch  $2,2\%$  der Klone im Vergleich zur Kontrolle. Im zweiten Ansatz (siehe 3.2.7) wurde versucht, durch Schütteln der Zellen während der Inkubation mit dem RIK bei  $37^\circ\text{C}$  bei einem anderen Verhältnis von Antikörperfragment zu Antigen, eine spezifische Zytotoxizität von  $^{213}\text{Bi}$ -Fab' gegenüber HSC45-M2-Zellen zu beobachten. Durch das Schütteln wurden die Zellen per se schon sehr stark geschädigt, so dass zur Erreichung identischer Klonanzahlen in den Kontrollen fünfmal mehr Zellen pro Well ausgesät werden mussten als beim ersten Ansatz. Dementsprechend waren die Zellen nach Schütteln viel empfindlicher gegenüber der Inkubation mit  $^{213}\text{Bi}$ -

Immunkonjugaten: Für einen vergleichbaren zytotoxischen Effekt wurden im zweiten Ansatz nur 25 % bis 50 % der Aktivitätskonzentrationen des ersten Ansatzes benötigt.

Der Vergleich der Toxizität von  $^{213}\text{Bi}$ -Fab' mit  $^{213}\text{Bi}$ -BSA zeigte im zweiten Ansatz bei Aktivitätskonzentrationen zwischen 0,037 MBq/ml und 0,185 MBq/ml nur geringe Unterschiede. Das  $^{213}\text{Bi}$ -Fab'-Konjugat gegen d9-E-Cadherin zeigte bei jeder Aktivitätskonzentration eine um 7 % bis 12 % höhere Zytotoxizität. Ein nur geringer Unterschied bezüglich des Überlebens zwischen mit spezifischen  $^{213}\text{Bi}$ -d9-Antikörper-Konjugaten beziehungsweise unspezifischen  $^{213}\text{Bi}$ -d8-Antikörper-Konjugaten inkubierten HSC45-M2-Zellen, bei Aktivitätskonzentrationen zwischen 0,6 MBq/ml und 1 MBq/ml, wird auch von Seidenschwang [2006] bei klonogenen Tests beschrieben. Bei den Versuchen, die ähnlich der im ersten Ansatz dieser Arbeit (siehe 3.2.7) durchgeführt wurden, ergab sich ebenso eine geringfügig stärkere Schädigung der Zellen durch die spezifisch bindenden  $^{213}\text{Bi}$ -d9-Antikörper-Konjugate.

In einer anderen Arbeit wurde die Radiotoxizität von  $^{213}\text{Bi}$ -d9-MAb an MDA-MB-435S-Brustkrebszellen, transfiziert mit d9-E-Cadherin, mit Zellen, transfiziert mit wt-E-Cadherin, verglichen. Hier wurde bei der Inkubation von  $1 \times 10^4$  Zellen in 200  $\mu\text{l}$  Suspension über einen Aktivitätskonzentrationsbereich von 10 bis 1000 kBq/ml (zugegeben in einem Volumen von 50  $\mu\text{l}$ ) eine deutlich höhere Hemmung der Proliferation der Zellen mit d9-E-Cadherin Expression als derjenigen mit wt-E-Cadherin-Expression beobachtet [Miederer et al., 2003]. Hier ist durch die hohe Anzahl der Zellen pro Ansatz im Verhältnis mehr Antigen pro Antikörper vorhanden und es ist ein höherer zytotoxischer Effekt der spezifisch bindenden Antikörper erkennbar. Bei einem deutlich höheren Anteil an Antikörper im Vergleich zu der Anzahl von Antigenen zeigt ein spezifisch bindender Antikörper dagegen einen kaum höheren zytotoxischen Effekt. Da bei der Behandlung von disseminierten Tumorzellen in der Bauchhöhle mit einer im Verhältnis zu den Antigenen hohen Anzahl von Antikörpern gearbeitet wird und hierbei die spezifische Bindung der Antikörper keine entscheidende Rolle spielt, wurde von  $^{213}\text{Bi}$ -Fab' die in vivo Verteilung, im Hinblick auf einen therapeutischen Einsatz, im murinen Organismus mittels Biodistributionsversuchen untersucht.

Die Biodistributionsversuche mit  $^{213}\text{Bi}$ -Fab' wurden an swiss nu/nu Nacktmäusen durchgeführt. Den Tieren wurden drei Wochen zuvor jeweils  $1 \times 10^7$  HSC45-M2-Zellen intraperitoneal injiziert um eine Peritonealkarzinose zu induzieren und somit die Anreicherung des RIK im Tumorgewebe bestimmen zu können. Da sich jedoch i.p. Tumore nicht entwickelten (siehe 4.6.1) wurde die Biokinetik an tumorfreien Mäusen untersucht. Zur Beurteilung der Biokinetik des Antikörperfragments im Hinblick auf den Einsatz zur Radioimmuntherapie spielte dieser Umstand nur eine geringe Rolle.

Nach intraperitonealer Applikation von  $^{213}\text{Bi}$ -Fab' zeigte sich ein schnelles Ansteigen der Aktivität in der Niere. Drei Stunden p.i. befanden sich zirka 20 % der injizierten Aktivität in den Nieren. Dies entspricht einem Wert von 45,8 % der injizierten Aktivität pro Gramm Gewebe. Die hohe Anreicherung von Fab'-Fragmenten gegen TAG-72 Antigen in der Niere wird auch von Pavlinkiva et al. [1999] beschreiben. Hier wurden nach i.v. Injektion von  $^{131}\text{I}$ -Fab' in Mäuse, mit subkutanem Tumor aus humanen Kolonkarzinomzellen, 30 min p.i. 138 % ID/g und 4 h p.i. noch 22 % ID/g gemessen. Nach i.v. Injektion von  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  markiertem Anti-CEA-Fab' in tumorfreie BALB/c Mäuse beschreiben Behr et al. [1995b] eine mittlere maximale Anreicherung von 88,1 % ID/g in der Niere. Dies entspricht einer Menge von 18-35% der injizierten Aktivität in den Nieren.

Eine hohe Anreicherung von Aktivität in der Niere wird auch bei Biodistributionen mit den größeren  $\text{F}(\text{ab}')_2$ -Konjugaten beobachtet [Casey et al., 1996, 1999, Ugur et al., 1996]. Eine hohe Anreicherung von Radiokonjugaten in der Niere verursacht Störungen der Nierenfunktion bis zum Verlust der Funktion. Das Radioimmunkonjugat reichert sich schon nach kurzer Zeit in der Niere an und zeigt im Vergleich zu  $^{213}\text{Bi}$ -IgG eine schnelle Elimination aus dem Blut. Die Niere wird auch von Behr et al. [1999] bei der Biodistribution von  $^{90}\text{Y}$ - beziehungsweise  $^{213}\text{Bi}$ -markierten Antikörperfragmenten bei Mäusen, mit subkutanen Tumoren aus humanen Kolonkarzinomzellen, als dosislimitierendes Organ beschrieben. Auch die szintigraphische Analyse der Verteilung von  $^{111}\text{In}$ -Fab' zeigt eine schnelle Resorption ins Blut und eine hohe Anreicherung des Antikörperfragments in den Nieren. Nach 24 Stunden ist die Aktivität, sowohl nach i.p. als auch nach i.v. Injektion, vornehmlich in den Nieren lokalisiert.

Im Hinblick auf den Einsatz für die Therapie ist das hier untersuchte Fab'-Konjugat, wegen seiner schnellen Resorption vom Peritonealraum in das Blut und seiner Nierentoxizität, als ungeeignet einzustufen. Die Tatsache, dass nach intraperitonealer Injektion von  $^{213}\text{Bi}$ -Fab' nach 90 Minuten schon  $45,8\% \pm 12,9\%$  ID/g in der Niere zu finden sind deutet darauf hin, dass das RIK aufgrund seiner geringen Größe schnell aus dem Peritonealraum resorbiert wird. Somit gelangt ein großer Anteil der Aktivität schnell ins Blut und von dort in die Nieren. Das eingesetzte  $^{213}\text{Bi}$  zerfällt somit nicht intraperitoneal, wie es zur Therapie einer Peritonealkarzinose notwendig wäre. Die Akkumulation der injizierten Radioaktivität in den Nieren mit einer nur geringen Ausscheidung belegt auch die biologische Halbwertszeit von Fab'-RIK von 45 Stunden, die deutlich länger ist als die von IgM-RIK mit 24 Stunden. Bei IgM-RIK erfolgt, nachdem es ins Blut gelangt ist, die vergleichsweise schnelle Ausscheidung über die Leber. Die Ausscheidung von  $^{111}\text{In}$ -Fab' ist jedoch wesentlich schneller als die von  $^{111}\text{In}$ -IgG, welches erst nach 165 Stunden zur Hälfte eliminiert ist. Antikörperfragmente zeigen auch beim Menschen eine kürzere biologische Halbwertszeit als intakte IgG-Antikörper. Ermittelt wur-

den die biologischen Halbwertszeiten mittels Szintigraphie nach i.v. Injektion von  $^{99m}\text{Tc}$  markierten Anti-CEA-IgG-Antikörpern beziehungsweise  $\text{F(ab')}_2/\text{Fab}'$ -Gemischer. Mittels ROI-Technik wurde für *IgG* eine Halbwertszeit von 36 Stunden, für  $\text{F(ab')}_2$  eine Halbwertszeit von 16 Stunden und für  $\text{Fab}'$  eine Halbwertszeit von nur 4 Stunden bestimmt [Behr et al., 1995a].

Ein geringer Anteil der Aktivität in der Niere könnte durch freies  $^{213}\text{Bi}$  verursacht werden, welches sich in der Niere anreichert [Beck et al., 2007]. Ein Nierenschaden welcher sich nach Applikation von 22,2 MBq  $^{213}\text{Bi}$ -d9Mab entwickelt, äußert sich bei der Maus durch glomeruläre Sklerose, Tubulusatrophie und vernarbtes Interstitium [Beck et al., 2007]. Durch die wesentlich höhere Nierenanreicherung von  $^{213}\text{Bi}$ - $\text{Fab}'$  wäre bei dem in dieser Arbeit untersuchten Radioimmunkonjugat eine solche Nierenschädigung schon bei viel niedrigeren injizierten Aktivitäten zu erwarten. Beim Menschen führt der zunehmende Verlust der Nierenfunktion der nach einer Strahlenexposition der Niere beobachtet wird zu einer Glomerulosklerose und/oder einer tubulointerstitiellen Fibrose [Cohen et al., 2003]. Ähnliche Schäden könnten somit bei der Anwendung von  $^{213}\text{Bi}$ - $\text{Fab}'$  beim Menschen auftreten.

### 5.2.2 Biokinetik und Bindungseigenschaften von $^{213}\text{Bi}/^{111}\text{In}$ -IgM

Zur vollständigen Elimination von i.p. disseminierten Tumorzellen ist es notwendig einen deutlichen Überschuss an Radioimmunkonjugat-Molekülen im Vergleich zur Anzahl der Antigene auf den Zielzellen zu applizieren. Dabei trägt der Crossfire-Effekt von nicht zellgebundenen Radioimmunkonjugaten in hohem Maße zur therapeutischen Effizienz bei. Die therapeutische Effizienz ist daher auch abhängig von der Verweilzeit des Therapeutikums im Intraoperitonealraum (nach i.p. Applikation). Die spezifische Bindung des Radioimmunkonjugats an die Tumorzellen ist bei einem hohen Überschuss von Antikörpern im Vergleich zu Antigenen für die therapeutische Effizienz nicht von entscheidender Bedeutung [Beck et al., 2007]. Antikörper der Klasse IgM verbleiben aufgrund ihres hohen Molekulargewichts länger im Peritonealraum als *IgG*-Antikörper. Ein Vorteil eines Therapeutikums, das nicht über die Bindung an ein spezielles Antigen wirkt, wäre eine universelle Einsetzbarkeit bei disseminierter Peritonealkarzinose.

In dieser Arbeit wurde ein unkonjugierter, humaner Antikörper der Klasse IgM mit unbekannter Spezifität (Pierce Biotechnology) untersucht um den Einsatz gegenüber dem *IgG*-Antikörper zu prüfen. Wie erwartet lag die Bindung von  $^{213}\text{Bi}$ -IgM an HSC45-M2-Zellen mit 0,9 % ungefähr im Bereich von  $^{213}\text{Bi}$ -BSA (0,5 %) [Huber et al., 2003b]. Für Biodistributionsstudien wurde  $^{213}\text{Bi}$ -IgM für kürzere Zeitpunkte und  $^{111}\text{In}$ -IgM für längere Zeitpunkte verwendet. Identische Verteilungen von  $^{213}\text{Bi}$ -IgM beziehungsweise  $^{111}\text{In}$ -IgM 3 Stunden p.i. lassen auf eine gleiche Biokinetik der beiden Radioimmunkonjugate schließen. Eine gleiche

Verteilung von  $^{111}\text{In}$  beziehungsweise  $^{90}\text{Y}$  markiertem IgM, spezifisch bindend an humane Ovarialkarzinomzellen (SKOV3-NMP2), nach i.p. Injektion bestätigen auch Borchardt et al. [1998] bei Biodistributionsversuchen an Mäusen mit intraperitonealen Tumoren induziert durch Ovarialkarzinomzellen nach orthotoper Xenotransplantation.

Auffallend in unseren Studien war die hohe Anreicherung von  $^{213}\text{Bi}/^{111}\text{In}$ -IgM in der murinen Leber. 24 Stunden nach intraperitonealer Injektion waren  $16,6\% \pm 2,1\%$  ID/g, nach intravenöser Injektion sogar  $32,7\% \pm 23,4\%$  ID/g in der Leber vorhanden. Damit verbunden wurde  $^{111}\text{In}$ -IgM schnell aus dem Blut eliminiert. Nach anfänglichem Anstieg der Aktivität auf  $4,5\%$  ID/g 3 Stunden nach i.p. Injektion, ist schon 24 Stunden p.i. fast kein RIK (i.p.:  $0,3\%$ , i.v.:  $0,6\%$  ID/g) im Blut mehr nachzuweisen. Diese beiden Aspekte der Biokinetik sind auch in anderen Arbeiten mit Antikörpern der Klasse IgM zu finden: Bei Quadri et al. [1995] befinden sich 24 h nach i.v. Injektion von  $^{111}\text{In}$ -IgM (AC6C3-2B12) in Mäuse, mit subkutanen Tumoren aus humanen Kolonkarzinomzellen,  $50\%$  ID/g in der Leber, während im Blut fast kein RIK mehr nachzuweisen ist. Borchardt et al. [1998] beschreiben nach i.p. beziehungsweise i.v. Injektion von  $^{90}\text{Y}/^{111}\text{In}$ -IgM (AC6C3-2B12) in xenotransplantierte (Ovarialkarzinomzellen) Mäuse die höchsten Aktivitäten in Leber und Milz. Auch hier waren im Blut jeweils nur geringe Aktivitäten nachzuweisen.

In Übereinstimmung mit der schnellen Elimination von  $^{111}\text{In}$ -IgM über die Leber war die biologische Halbwertszeit auch geringer als die von  $^{111}\text{In}$ -IgG. Sie betrug 24 Stunden und war somit nur halb so lang wie die von  $^{111}\text{In}$ -Fab' und betrug sogar nur  $1/7$  der biologischen Halbwertszeit von  $^{111}\text{In}$ -IgG. Eine schnelle Eliminierung von IgM-Radioimmunkonjugat (CR4E8) und eine sehr niedrige Aufnahme in andere Gewebe wird auch von Borchardt et al. [1997, 2004] bei Untersuchungen an Mäusen mit subkutan induziertem humanem Plattenepithelkarzinom beschrieben. Nach subkutaner Injektion in die tumoröse Läsion ist systemisch kaum Aktivität messbar. 24 Stunden und 48 Stunden nach i.v. Injektion von  $^{111}\text{In}$ -IgM (CR4E8) ergeben sich hohe Aktivitäten in der Leber ( $35\%$  ID/g), wohingegen im Blut 24 Stunden p.i. nur noch  $1\%$  ID/g nachzuweisen sind [Borchardt et al., 1997].

Die schnelle Eliminierung von IgM-Radioimmunkonjugaten könnte auf die Expression von Poly-Ig-Rezeptoren in der Mausleber zurückzuführen sein, die sowohl für die Bindung als auch für den schnellen hepatobiliären Transport von Poly-IgA und von IgM verantwortlich sind [Delacroix et al., 1985, Koertge et al., 1986]. Die in unseren Studien ermittelte biologische Halbwertszeit für  $^{111}\text{In}$ -IgM ist mit 24 h deutlich länger als diejenige für  $^{125}\text{I}$ -VG-IgM (spezifischer Antikörper für Carcinoembryonales Antigen (CEA)) [Garambois et al., 2004]. Dort waren nach 24 Stunden nur noch  $20,5\%$   $^{125}\text{I}$ -VG-IgM (spezifischer Antikörper für Carcinoembryonales Antigen (CEA)) bei der Ganzkörpermessung der Maus ermittelt worden. In



der Arbeit von Garambois et al. [2004] wird zudem von teilweise spezifischen den einzelnen IgM-Antikörpern zuordenbaren Eigenschaften ausgegangen. So fehlt dem IgM-Antikörper (AC6C3-2B12) der von Borchardt et al. [1998] verwendet wird die J Kette und somit kann dieser Antikörper nicht an den Poly-Ig-Rezeptor binden. Die Annahme von speziellen Eigenschaften der IgM-Antikörper würde auch die teilweise von anderen Arbeiten abweichende Biokinetik des IgM-RIK dieser Arbeit erklären. Bei dem hier verwendeten unspezifischen IgM-Antikörper kommt es nicht zu einer hohen Aktivitätsanreicherung des Pankreas wie sie von Quadri et al. [1995] nach i.v. Injektion von  $^{111}\text{In}$ -IgM (AC6C3-2B12) in Mäusen beschrieben wird. Die gemessene Aktivität beträgt für das Pankreas in dieser Arbeit 0,6 % ID/g im Vergleich zu 20 % ID/g [Quadri et al., 1995] 24 Stunden nach i.v. Injektion.

### 5.2.3 Vergleich der Biokinetik von $^{213}\text{Bi}/^{111}\text{In}$ -IgM und $^{213}\text{Bi}/^{111}\text{In}$ -IgG

Zur qualitativen und quantitativen Beurteilung wurde die Verteilung von  $^{111}\text{In}$ -IgM-Konjugaten auch mittels Szintigraphie nach i.p. beziehungsweise i.v. Injektion analysiert, im Vergleich zu  $^{111}\text{In}$ -IgG-Konjugaten (d9-MAb). Auch hier galt das Hauptaugenmerk den Unterschieden in der Biokinetik nach intraperitonealer beziehungsweise intravenöser Applikation, auch hinsichtlich eines möglichen Einsatzes von  $^{213}\text{Bi}$ -IgM in der lokoregionalen Therapie der Peritonealkarzinose. Die mittels Biodistribution nachgewiesene Anreicherung von  $^{213}\text{Bi}/^{111}\text{In}$ -IgM in der Leber konnte auch mit Hilfe der Szintigraphie bestätigt werden. Zu dem Ergebnis der Anreicherung von  $^{111}\text{In}$ -IgM-Radioimmunkonjugat (spezifisch für Thy 1.2-Antigen) in der Immunszintigraphie im Bereich der Leber kommen auch Macklis et al. [1988a] in Mäusen die Thy1.2 exprimierende T-Zellen besitzen als auch in Mäusen mit T-Zellen die dieses Antigen nicht exprimieren. Das Thy Oberflächenantigen wird unter anderem bei verschiedenen murinen T-Zell-Erkrankungen an diesen überexprimiert [Bubenik et al., 1983].

Die im Szintigramm ermittelte Verteilung von  $^{111}\text{In}$ -IgG und  $^{111}\text{In}$ -IgM lieferte deutlich unterschiedliche Ergebnisse unabhängig von der jeweiligen Applikationsart:  $^{111}\text{In}$ -IgG verteilte sich über den ganzen Mausekörper und zeigte aufgrund der langen HWZ im Blut schon 3 h p.i. über den gesamten Beobachtungszeitraum eine Anreicherung der  $^{111}\text{In}$ -Aktivität im Bereich des Thorax in welchem sich die stark durchbluteten Organe Herz und Lungen befinden. Im Gegensatz dazu war  $^{111}\text{In}$ -IgM 3 h p.i. bis 72 h p.i. nahezu ausschließlich in der Leber und nur nach i.p. Applikation auch im kaudalen Abdomen nachzuweisen. Diese Befunde sind im Einklang mit den Ergebnissen der Biodistributionsstudien in denen  $^{111}\text{In}$ -IgM im Blutpool unabhängig von der Applikationsart mit einer Aktivität von unter 1 % ID/g 24 h p.i. praktisch kaum mehr nachzuweisen ist. Nach i.p. Injektion verblieb  $^{111}\text{In}$ -IgM deutlich länger im Peritonealraum als  $^{111}\text{In}$ -IgG, was auch nach quantitativer Auswertung der Szintigramme mit Hilfe

von ROIs bestätigt werden konnte. Eine Ursache hierfür ist der, aufgrund des höheren Molekulargewichtes, langsamere Durchtritt des IgM-Pentamers über Gefäßmembranen im Vergleich zu Antikörpern der Klasse *IgG* [Jullien-Vitoux et al., 1973]. Den vergleichsweise schnellen Übertritt von *IgG* vom Peritonealraum in den Blutkreislauf belegen auch die Ergebnisse der Biodistributionsstudien: Schon 24 Stunden p.i. findet sich kein Unterschied in der Verteilung von  $^{111}\text{In-IgG}$  nach i.p. beziehungsweise i.v. Injektion bezüglich der untersuchten Organe Blut, Herz, Lunge, Leber, Pankreas, Milz, Niere, Peritoneum und Muskel. Die vergleichbaren Aktivitäten nach i.p. beziehungsweise i.v. Injektion der untersuchten Organe sind bei  $^{111}\text{In-IgM}$  erst wesentlich später zu beobachten.

Die Unterschiede im Hinblick auf die Verteilung von  $^{111}\text{In-IgG}$  beziehungsweise  $^{111}\text{In-IgM}$  könnten auf unterschiedlichen Katabolismen der beiden Radioimmunkonjugate beruhen. Während für IgM-RIK unter anderem, wie oben beschrieben, der Poly-Ig-Rezeptor der Leber für die schnelle Elimination verantwortlich sein kann, wurde für chelatierte  $^{111}\text{In-IgG}$  Antikörper ein Abbau zu Low molecular weight Metaboliten ebenfalls in der Leber beschrieben [Jones et al., 1990, Motta-Hennessy et al., 1990]. Es ist bekannt, dass  $^{111}\text{In-DTPA}$  Antikörper beziehungsweise Antikörperfragmente in den Nieren retiniert und in der Leber abgebaut werden. Das Endprodukt des lysosomalen Abbaus in der Niere/Leber,  $^{111}\text{In-DTPA-}\epsilon\text{-Lysin}$ , wird schließlich über den Harn beziehungsweise Fäzes ausgeschieden [Rogers et al., 1995]. Dies erklärt auch die höhere Anreicherung von  $^{111}\text{In}$  in der Niere nach  $^{111}\text{In-IgG}$  Injektion im Vergleich zur  $^{111}\text{In-IgM}$  Injektion.

Abschließend lässt sich somit folgendes Fazit ziehen: IgM-Radioimmunkonjugat ist hinsichtlich der Retention im Peritonealraum und des Modus der Exkretion besser geeignet zur lokoregionalen Therapie disseminierter Tumorzellen nach i.p. Injektion als entsprechende *IgG*- und Fab'-Radioimmunkonjugate.  $^{111}\text{In-IgM}$  verbleibt relativ lange im Peritonealraum und wird nach dem Übertritt in den Blutkreislauf schnell über die Leber abgebaut (Ganzkörperaktivitätsmessung).

### **5.3 Überlegungen zur Therapie disseminierter Tumorzellen im Peritoneum**

Wie bereits in der Einleitung erwähnt unterscheidet man zwischen der makroskopisch sichtbaren Peritonealkarzinose, bei der solide Tumorknoten vorhanden sind, und der mikroskopischen Peritonealkarzinose, bei der einzelne Tumorzellen disseminiert im Peritonealraum vorliegen. Zur Diagnose dieser unterschiedlichen Stadien der Karzinose werden unterschiedliche Verfahren angewandt. Die makroskopisch sichtbaren Stadien lassen sich mittels Kernspinto-

mographie (signalreicher Aszites in der T<sub>2</sub>-Wichtung) und auch mittels Positronenemissionstomographie (PET) sehr gut darstellen.

Neben den nicht-invasiven Verfahren zur Darstellung einer Peritonealkarzinose wird auch eine invasive Methode zur Detektion disseminierter Tumorzellen angewendet. Die Detektion von Tumorzellen nach zytologischer Untersuchung einer durch Peritoneallavage gewonnenen Probe stellt einen wichtigen prognostischen Faktor dar. Die auf „reverser Transkriptase Polymerase Kettenreaktion“ (RT-PCR) basierende molekulare Untersuchung der Peritoneallavage auf Carcinoembryonales Antigen (CEA) stellt eine noch sensitivere Methode für die Detektion von Tumorzellen dar. Zudem lassen sich mit diesem Verfahren Aussagen bezüglich Rezidiven im Peritonealraum nach der Resektion eines Magenkarzinoms treffen [Kodera et al., 1998, 2002, Sugita et al., 2003, Mori et al., 2004]. Durch die zusätzliche molekulare Untersuchung der Peritoneallavage auf humanes Cytokeratin (CK)-20 mittels „reverser Transkriptase Polymerase Kettenreaktion“ (RT-PCR) kann die Sensitivität der Untersuchung nochmals verbessert werden [Kodera et al., 2005].

Aufgrund der sehr schlechten Prognose, die mit einer peritonealen Aussaat von Tumorzellen verbunden ist, wird eine effektive Therapie disseminierter Tumorzellen sowie auch kleiner Tumorknoten dringend benötigt. Bisher angewandte Therapien mit relativ geringer therapeutischer Effizienz umfassen die kontinuierliche hypertherme peritoneale Perfusion [Kaibara, 1996], die Applikation der Adhäsionspolypeptide YIGSR, RGD sowie RGD-Derivaten, die aus wenigen Aminosäuren bestehen, die die Invasivität von Tumorzellen hemmen [Matsuoka et al., 1998], und intraperitoneale Chemotherapie zum Beispiel mit Paclitaxel [Ohashi et al., 2005]. Ein viel versprechendes, erfolgreich im Tiermodell angewandtes Verfahren, ist die intraperitoneale Radioimmuntherapie mit  $\alpha$ -Emittern. Dieses ist bei einer Reihe peritoneal disseminierter Tumorentitäten erfolgreich eingesetzt worden. Bei dem oft kavitär metastasierenden Ovarialkarzinom wurden im Mausmodell nach Inokulation von humanen Ovarialkarzinomzellen mit <sup>211</sup>At markiertem monoklonalem MX35-Antikörper (gegen ein Zelloberflächenglykoprotein von Ovarialkarzinomzellen) gute therapeutische Erfolge erzielt [Elgqvist et al., 2005]. Eine Verlängerung des mittleren Überlebens von 20 auf fast bis zu 60 Tage wurde durch den Einsatz von <sup>213</sup>Bi beziehungsweise <sup>212</sup>Pb markiertem Herceptin bei einer Peritonealkarzinose, erzeugt durch Kolonkarzinomzellen im Mausmodell, erreicht [Milenic et al., 2004, 2005]. <sup>212</sup>Pb-Herceptin eignete sich im Mausmodell auch für die Therapie disseminierter Pankreaskarzinomzellen im Peritoneum [Milenic et al., 2005]. Auch die durch Magenkarzinomzellen vom diffusen Typ hervorgerufene Peritonealkarzinose konnte erfolgreich mit <sup>213</sup>Bi-Radioimmunkonjugaten therapiert werden. Dabei wurden <sup>213</sup>Bi-d9-Mab-Konjugate gegen mutiertes E-Cadherin appliziert. Damit konnten im Frühstadium der peritonealen Karzi-

nose bis zu 87 % der Tiere geheilt werden und zeigten ein unverändert langes Überleben im Vergleich zu Kontrolltieren [Huber et al., 2003b, Bloechl et al., 2005, Beck et al., 2007]. Bei dem beschriebenen Magenkarzinommodell hat sich überraschender Weise, wie schon unter 5.2.1 erwähnt, herausgestellt, dass die Spezifität des Antikörpers bezüglich der Tumorzellen für eine erfolgreiche Therapie in einem bestimmten Aktivitätsbereich des eingesetzten Radioimmunkonjugats nicht von entscheidender Bedeutung ist [Huber et al., 2003b, Beck et al., 2007]. Beschrieben wird die gleiche therapeutische Effizienz zwischen spezifischem beziehungsweise unspezifischem Radioimmunkonjugat auch von Milenic et al. [2004]. Hier wird bei einer durch Kolontumorzellen verursachten Peritonealkarzinose bei Mäusen kein Unterschied bezüglich des Überlebens nach Therapie mit  $^{213}\text{Bi}$  markiertem Herceptin (spezifisch an die Tumorzellen bindend) beziehungsweise mit  $^{213}\text{Bi}$  markiertem unspezifischen *IgG*-Antikörper beobachtet. Bei der Therapie von frühen Stadien der Peritonealkarzinose, induziert durch OVCAR-3 Ovarialkarzinomzellen bei Mäusen, wird ebenfalls die gleiche therapeutische Effizienz mit  $^{211}\text{At}$ -MX35-F(ab') (spezifisch gegen OVCAR-3-Zellen) beziehungsweise  $^{211}\text{At}$ -Rituximab (unspezifisch gegen OVCAR-3-Zellen) erreicht [Elgqvist et al., 2006]. Erst bei späteren Stadien der Krankheit, es liegen schon größere Tumorknoten vor, ist  $^{211}\text{At}$ -MX35-F(ab') in der Therapie dem unspezifischen Radioimmunkonjugat überlegen.

Die gute therapeutische Effizienz auch der nicht spezifisch an Tumorzellen bindende  $^{213}\text{Bi}$ -Radioimmunkonjugate beruht auf dem schon unter 5.2.2 beschriebenen Crossfire-Effekt, der bei einem Überschuss von Antikörper-Konjugat im Vergleich zu den Zellantigenen auftritt und eine effiziente Tumorzellabtötung bewirkt. Die geringe Reichweite der  $\alpha$ -Strahler verbunden mit einem hohen linearen Energietransfer (LET) bewirken bei lokoregionaler Applikation eine räumlich begrenzte, effektive Tumorzellabtötung und sind somit zur Therapie von Mikrometastasen gut geeignet [Imam, 2001, Couturier et al., 2005]. Dies wird auch durch die effektive Abtötung von Sphäroiden mit einem Durchmesser von 20 bis 30 Zellen durch  $^{213}\text{Bi}$ -Radioimmunkonjugat bestätigt [Kennel et al., 1999b].

Die Analysen zur Stabilität von  $^{213}\text{Bi}$ -IgM zeigten in PBS eine stabile Bindung über 3 Stunden. Nach diesem Zeitraum waren noch 87 % des  $^{213}\text{Bi}$  an den Antikörper gebunden. In Serum nahm der Anteil des gebundenen RIK zwar unmittelbar nach dem Start der Inkubation ab, blieb dann aber über 3 Stunden nahezu stabil. Für die Verwendung des RIK zur lokoregionalen Therapie ist aber ohnehin die Stabilität in PBS entscheidend, da dieses in PBS verdünnt appliziert wird und erst nach dem Übertritt in den Blutkreislauf mit Serum in Berührung kommt. Entscheidend für eine systemische Toxizität ist dabei die Geschwindigkeit der Diffusion in das Blut. Bei einer Abspaltung des  $^{213}\text{Bi}$  von IgM würde man noch eine zunehmende Anreicherung der Aktivität in der Niere verzeichnen, dies war bei den Biodistributionsversu-

chen jedoch nicht zu beobachten. Radioimmunkonjugate bestehend aus  $^{213}\text{Bi}$  und Antikörpern der Klasse IgM scheinen aufgrund der langen Verweilzeit im Peritonealraum und des schnellen Elimination aus dem Blutkreislauf für die Therapie intraperitoneal disseminierter Tumorzellen viel versprechend.

Wichtig für die Interpretation der Ergebnisse der Biokinetik bezüglich der Anwendung am Menschen ist die Vergleichbarkeit der Verteilung im murinen und im menschlichen Organismus. Im Mausmodell zeigt sich bei  $^{111}\text{In}$  markierten monoklonalen IgM Antikörpern ein Unterschied in der Verteilung zwischen humanen und murinen Antikörpern [Halpern et al., 1988]. Die Verteilung von humanen Antikörpern der Klasse IgM in der Maus ist der Verteilung dieser Antikörper im Menschen, untersucht mittels Szintigraphie, ähnlich, was sich zum Beispiel an einer hohen Anreicherung der Aktivität in der menschlichen Leber zeigt [Halpern et al., 1988]. Somit können die im Tierexperiment gewonnenen Ergebnisse teilweise auf den Menschen übertragen werden.

Die lokoregionale, das heisst die intraperitoneale, Applikation von Radioimmunkonjugat zur Therapie intraperitonealer Tumoren beziehungsweise disseminierter Tumorzellen ist unbestritten. Ein hinsichtlich des Therapieerfolgs weiter optimierter therapeutischer Effekt, bezüglich des medianen Überlebens, kann durch unterschiedliche Therapieschemata erreicht werden. Ein interessanter Ansatz ist die fraktionierte, lokoregionale Niedrigdosis-Radioimmuntherapie. Hier wurden xenotransplantierten Mäusen an Tag 1 beziehungsweise 8 nach Inokulation von HSC45-M2-Zellen jeweils 0,37 MBq  $^{213}\text{Bi}$ -d9-Mab appliziert. Dies führte zu einem signifikant längeren Überleben (im Mittel 84 Tage gegenüber 48 Tage) im Vergleich zu den nur einmal am Tag 1 nach Tumorzellinjektion mit 0,37 MBq  $^{213}\text{Bi}$ -d9-Mab behandelten Mäusen [Bloechl et al., 2005]. Eine Überlegenheit der zweifachen Applikation des RIK ist auch bei einer Behandlung eines fortgeschritteneren Stadiums der Peritonealkarzinose zu beobachten: Die Applikation von jeweils 0,74 MBq  $^{213}\text{Bi}$ -d9Mab an Tag 8 beziehungsweise Tag 15 nach Tumorzellinjektion ist der einmaligen Applikation von 1,48 MBq  $^{213}\text{Bi}$ -d9Mab an Tag 8 nach Tumorzellinjektion hinsichtlich der Verlängerung des mittleren Überlebens von 44 auf 78 Tage überlegen [Bloechl et al., 2005].

Ein weiterer interessanter Ansatz bezüglich der Therapieform einer Peritonealkarzinose ist die Kombination von Chemotherapie und Radioimmuntherapie. Untersucht wurden verschiedene Therapieregimes an Mäusen denen intraperitoneal humane Kolonkarzinomzellen, mit einer Überexpression von HER2-Antigen, injiziert wurden. Das Stadium der Krankheit entsprach hier, zum Zeitpunkt der Therapie, einer disseminierten mikroskopischen Peritonealkarzinose. Mit der Kombination des Chemotherapeutikums Gemcitabin und  $^{212}\text{Pb}$ -Trastuzumab konnte eine Verlängerung des medianen Überlebens der Tiere von 18,5 Tage bei den unbehandelten

Tieren auf bis zu 196,5 Tage erreicht werden. Das beste Ergebnis lieferte, mit einem mittleren Überleben von 196,5 Tagen, folgendes Therapieregime: Applikation von 1 mg Gemcitabin an Tag 2, von 10  $\mu\text{Ci}$   $^{212}\text{Pb}$ -Trastuzumaban Tag 3, von 1 mg Gemcitabin an Tag 9, von 1 mg Gemcitabin an Tag 23, von 10  $\mu\text{Ci}$   $^{212}\text{Pb}$ -Trastuzumab an Tag 24 und schließlich von 1 mg Gemcitabin an Tag 30 [Milenic et al., 2007]. Eine weitere Therapieoption, die bisher nur in vitro getestet wurde, stellt die so genannte MTAT (=multiple targeted  $\alpha$ -therapy) dar. Hier wird ein Cocktail bestehend aus  $^{213}\text{Bi}$ -C595,  $^{213}\text{Bi}$ -BLCA-38 und  $^{213}\text{Bi}$ -PAI2 angewendet. Arbeiten hierzu wurden an Sphäroiden von Prostatakarzinomtumorzellen durchgeführt. Die Verwendung eines solchen Cocktails könnte zur Therapie von Mikrometastasen eine potente Therapieoption darstellen [Wang et al., 2006].

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass  $^{213}\text{Bi}$ -IgM Radioimmunkonjugate einen viel versprechenden Ansatz zur Therapie disseminierter intraperitonealer Tumorzellen darstellen. Auch bei fehlender Spezifität des IgM Antikörpers, ist die Therapie prinzipiell für alle i.p. disseminierten Tumoren geeignet. Die lange Retention von  $^{213}\text{Bi}$ -IgM im Peritonealraum nach orthotoper Applikation und eine rasche Ausscheidung aus dem Blut über die Leber, und somit die Ausscheidung aus dem ganzen Körper, sind zwei entscheidende Vorteile des untersuchten Radioimmunkonjugats gegenüber  $^{213}\text{Bi}$ -IgG beziehungsweise  $^{213}\text{Bi}$ -Fab' Konjugaten. Die therapeutische Effizienz muss aber erst noch gezeigt werden.

## 6 Zusammenfassung

Zur therapeutischen Effizienz im Rahmen einer Radioimmuntherapie tragen vor allem Radioimmunkonjugate bei, die spezifisch an die Zielzellen binden, daneben aber auch solche ohne spezifische Bindung, die ihre Wirkung über den so genannten Crossfire-Effekt erzielen. Von entscheidender Bedeutung ist dabei die Verweilzeit der Konjugate am Ort ihrer therapeutischen Einwirkung. Im Falle der Therapie disseminierter Tumorzellen einer Peritonealkarzinose sollen Radioimmunkonjugate nach lokoregionaler Applikation daher möglichst lange im Peritonealraum verbleiben.

In der vorliegenden Studie wurde die Biodistribution verschiedener Radioimmunkonjugate sowohl nach intraperitonealer (i.p.) als auch intravenöser (i.v.) Injektion in tumorfreien Mäusen mittels Szintigraphie, Quantifizierung der Aktivität in ausgewählten Organen, sowie Ermittlung der biologischen Halbwertszeit bestimmt. Dazu wurden folgende Radioimmunkonjugate eingesetzt:

$^{213}\text{Bi-}/^{111}\text{In-Fab'}$  (Anti-d9-E-Cadherin, gentechnisch hergestellt aus Klon 7E6);

$^{213}\text{Bi-}/^{111}\text{In-IgG}$  (Anti-d9-E-Cadherin, Klon 6H8);

$^{213}\text{Bi-}/^{111}\text{In-IgM}$  (Myeloma).

Zur Charakterisierung der verwendeten Radioimmunkonjugate wurde zunächst deren Bindung an HSC45-M2-Magenkarzinomzellen, die mutiertes d9-E-Cadherin exprimieren, ermittelt und nachfolgend die Zytotoxizität der Radioimmunkonjugate untersucht.

Wie erwartet zeigten IgM-Radioimmunkonjugate nur eine sehr geringe, unspezifische Bindung an die HSC45-M2-Zellen (ca. 1%), die im Bereich von BSA-Radioimmunkonjugaten lag. Überraschenderweise war die Bindung von Fab'-Radioimmunkonjugaten gegen d9-E-Cadherin nur unwesentlich höher (ca. 2,5%) und damit deutlich geringer als diejenige von IgG-Radioimmunkonjugaten gegen d9-E-Cadherin (ca. 25%), wie bereits früher gezeigt werden konnte. Sowohl  $^{213}\text{Bi-Fab'}$ - als auch  $^{213}\text{Bi-IgM}$ -Konjugate zeigten dementsprechend nur jeweils eine geringfügig höhere Zytotoxizität gegen HSC45-M2-Zellen als  $^{213}\text{Bi-BSA}$ -Konjugate.

Die Untersuchungen zur Biodistribution der  $^{213}\text{Bi-}/^{111}\text{In}$ -Konjugate (Fab', IgG, IgM) im Hinblick auf ihre Verweilzeit im Intraperitonealraum, die Zeitspanne ihrer Zirkulation im Blutkreislauf sowie die Anreicherung in dosislimitierenden Organen wie der Niere erbrachten folgende Ergebnisse:

3 h nach i.p. Injektion zeigten Fab'-Radioimmunkonjugate eine sehr hohe Anreicherung in der Niere ( $54,3 \% \pm 9,9 \% \text{ ID/g}$ ), während *IgG*-Radioimmunkonjugate die höchste Aktivitätskonzentration im Blut aufwiesen ( $16,0 \% \text{ ID/g} \pm 7,2 \% \text{ ID/g}$ ) und *IgM*-Radioimmunkonjugate sich vorwiegend in der Leber anreicherten ( $29,7 \% \text{ ID/g} \pm 6,5 \% \text{ ID/g}$ ). Auffallend war die durchweg geringe Aktivitätskonzentration von *IgM*-Radioimmunkonjugaten im Blut, die nach 24 h unter  $1 \% \text{ ID/g}$  lag und damit deutlich niedriger war als bei *IgG*-Konjugaten. Nach i.v. Injektion der verschiedenen Radioimmunkonjugate zeigten sich maximale Anreicherungen jeweils in den gleichen Geweben wie nach i.p. Injektion.

Mittels Szintigraphie konnte gezeigt werden, dass  $^{111}\text{In}$ -*IgM*-Radioimmunkonjugate nach i.p. Injektion durchgehend (über 72 Stunden) ca. 2-fach höhere Aktivitäten im kaudalen Abdomen aufwiesen als nach i.v. Injektion. Für  $^{111}\text{In}$ -*IgG*-Radioimmunkonjugate war ein entsprechender Unterschied nur zu einem frühen Zeitpunkt (bis 3 Stunden) nach Injektion beobachtbar.  $^{111}\text{In}$ -Fab'-Radioimmunkonjugate zeigten ebenfalls nur bis 1 h p.i. einen Unterschied zwischen i.p. und i.v. Injektion, wobei hier bei allen Aufnahmen hohe Aktivitäten im Bereich der Nieren ermittelt wurden.

72 h nach Injektion von  $^{111}\text{In}$ -*IgG* waren noch 75% der injizierten Aktivität in den Tieren nachweisbar, nach Injektion von  $^{111}\text{In}$ -*IgM* dagegen nur noch 33%. Das entspricht biologischen Halbwertszeiten von 24 h für  $^{111}\text{In}$ -*IgM* und 165 h für  $^{111}\text{In}$ -*IgG*. Für  $^{111}\text{In}$ -Fab' wurde eine biologische Halbwertszeit von 45 h ermittelt. Nach i.p. Injektion identischer Aktivitäten der verschiedenen Radioimmunkonjugate, verursachen *IgM*-Konjugate bei längster Retention im Intraperitonealraum daher die geringste Ganzkörperexposition.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Verweilzeit von Radioimmunkonjugaten im Intraperitonealraum nach i.p. Injektion positiv mit dem Molekulargewicht des verwendeten Antikörpers korreliert. So verblieben *IgM*-Radioimmunkonjugate deutlich länger intraperitoneal als entsprechende *IgG*- beziehungsweise Fab'-Radioimmunkonjugate. Zudem wurden *IgM*-Radioimmunkonjugate deutlich schneller aus dem Blutkreislauf eliminiert bzw. aus dem Ganzkörper ausgeschieden als *IgG*- und Fab'-Radioimmunkonjugate. Der Katabolismus der *IgM*-Radioimmunkonjugate über die vergleichsweise strahlenresistente Leber stellt einen weiteren Vorteil gegenüber *IgG*- beziehungsweise Fab'-Radioimmunkonjugaten dar, welche über die Niere ausgeschieden bzw. dort auch teilweise retiniert werden. Somit versprechen *IgM*-Radioimmunkonjugate nach i.p. Applikation zur Therapie intraperitoneal disseminierter Tumorzellen eine höhere therapeutische Effizienz bei geringerer Toxizität als entsprechende *IgG*- bzw. Fab'-Radioimmunkonjugate.



## 7 Literaturverzeichnis

Adam RA, Adan YG. Malignant ascites: past, present, and future. J Am Coll Surg. 2004; 198: 999-1011

Allen BJ. Targeted alpha therapy: evidence for potential efficacy of alpha-immunoconjugates in the management of micrometastatic cancer. Australas Radiol. 1999; 43: 480-486.

Allen BJ, Raja C, Rizvi S, Li Y, Tsui W, Graham P, Thompson JF, Reisfeld RA, Kearsley J. Intralesional targeted alpha therapy for metastatic melanoma. Cancer Biol Ther. 2005; 4: 1318-1324.

Allen BJ, Raja C, Rizvi S, Li Y, Tsui W, Zhang D, Song E, Qu CF, Kearsley J, Graham P, Thompson J. Targeted alpha therapy for cancer. Phys Med Biol. 2004; 49: 3703-3712.

Apostolidis C, Molinet R, McGinley J, Abbas K, Möllenbeck J, Morgenstern A. Cyclotron production of Ac-225 for targeted alpha therapy. Appl Radiat Isot. 2005a; 62: 383-387.

Apostolidis C, Molinet R, Rasmussen G, Morgenstern A. Production of Ac-225 from Th-229 for targeted  $\alpha$  therapy. Anal Chem. 2005b; 77: 6288-6291.

Armstrong DK, Bundy B, Wenzel L, Huang HQ, Baergen R, Lele S, Copeland LJ, Walker JL, Burger RA; Gynecologic Oncology Group. Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer. N Engl J Med. 2006; 354: 34-43.

Beck R, Seidl C, Pfof B, Morgenstern A, Bruchertseifer F, Baum H, Schwaiger M, Senekowitsch-Schmidtke R.  $^{213}\text{Bi}$ -radioimmunotherapy defeats early stage disseminated gastric cancer in nude mice. Cancer Sci. 2007; 98: 1215-1222.

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

Behr TM, Becker WS, Bair HJ, Klein MW, Stühler CM, Cidlinsky KP, Wittekind CW, Scheele JR, Wolf FG. Comparison of complete versus fragmented technetium-99m-labeled anti-CEA monoclonal antibodies for immunoscintigraphy in colorectal cancer. J Nucl Med. 1995a; 36: 430-441.

Behr TM, Sharkey RM, Juweid ME, Blumenthal RD, Dunn RM, Griffiths GL, Bair HJ, Wolf FG, Becker WS, Goldenberg DM. Reduction of the renal uptake of radiolabeled monoclonal antibody fragments by cationic amino acids and their derivatives. Cancer Res. 1995b; 55: 3825-3834.

Behr TM, Béhé M, Stabin MG, Wehrmann E, Apostolidis C, Molinet R, Strutz F, Fayyazi A, Wieland E, Gratz S, Koch L, Goldenberg DM, Becker W. High-linear energy transfer (LET)  $\alpha$  versus low-LET  $\beta$  emitters in radioimmunotherapy of solid tumors: therapeutic efficacy and dose-limiting toxicity of  $^{213}\text{Bi}$ - versus  $^{90}\text{Y}$ -labeled CO17-1A Fab' fragments in a human colonic cancer model. Cancer Res. 1999; 59: 2635-2643.

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. 2005; 11: 7070s-7074s.

Boll RA, Mirzadeh S, Kennel SJ, DePaoli DW, Webb OF. Bi-213 for alpha-particle-mediated radioimmunotherapy. J Labelled Compds Radiopharm. 1997; XL: 341.

Borchardt PE, Quadri SM, Freedman RS, Vriesendorp HM. Intralesional radiolabeled human monoclonal IgM in human tumor xenografts. Radiother Oncol. 1997; 44: 283-293.

Borchardt PE, Quadri SM, Freedman RS, Vriesendorp HM. Indium-111- and Yttrium-90-labeled human monoclonal immunoglobulin M targeting of human ovarian cancer in mice. J Nucl Med. 1998; 39: 476-484.

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

Borchardt PE, Quadri SM, Freedman RS, Vriesendorp HM. Intralesional radioimmunotherapy with Yttrium-90-labeled human monoclonal IgM in nude mice bearing human tumor xenografts. Cancer Biother Radiopharm. 2004; 19: 43-51.

Brechbiel MW, Gansow OA. Backbone-substituted DTPA ligands for  $^{90}\text{Y}$  radioimmunotherapy. Bioconjug Chem. 1991; 2: 187-194.

Bubenik J, Bubenikova D, Jandlova T, Holusa R, Svoboda V. Thy-1 epitopes are expressed on murine myeloid leukaemia and reticulum sarcoma cells. Immunol. Letters. 1983; 6: 187-198.

Buchegger F, Vieira JM, Blauenstein P, Dupertuis YM, Schaffland AO, Grannavel C, de Tribolet N, Slosman DO, Bischof Delaloye A. Preclinical Auger and gamma radiation dosimetry for fluorodeoxyuridine-enhanced tumour proliferation scintigraphy with [ $^{123}\text{I}$ ]iododeoxyuridine. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2003; 30: 239-246.

Buchsbaum DJ. Experimental radioimmunotherapy. Semin Radiat Oncol. 2000; 10: 156-167.

- Burke JM, Jurcic JG, Scheinberg DA. Radioimmunotherapy for acute leukemia. Cancer Control. 2002, 9: 106-113.
- Casey JL, King DJ, Chaplin LC, Haines AM, Pedley RB, Mountain A, Yarranton GT, Begent RH. Preparation, characterisation and tumour targeting of cross-linked divalent and trivalent anti-tumour Fab' fragments. Br J Cancer. 1996; 74: 1397-1405.
- Casey JL, Pedley RB, King DJ, Green AJ, Yarranton GT, Begent RHJ. Dosimetric evaluation and radioimmunotherapy of anti-tumour multivalent Fab' fragments. Br J Cancer. 1999; 81: 972-980.
- Cohen EP, Robbins ME. Radiation nephropathy. Semin Nephrol. 2003; 23: 486-499.
- Couturier O, Supiot S, Degraef-Mougin M, Faivre-Chauvet A, Carlier T, Chatal JF, Davodeau F, Cherel M. Cancer radioimmunotherapy with alpha-emitting nuclides. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2005; 32: 601-614.
- Daghighian F, Barendswaard E, Welt S, Humm J, Scott A, Willingham MC, McGuffie E, Old LJ, Larson SM. Enhancement of radiation dose to the nucleus by vesicular internalization of iodine-125-labeled A33 monoclonal antibody. J Nucl Med. 1996; 37: 1052-1057.
- Delacroix DL, Malburny GN, Vaerman JP. Hepatobiliary transport of plasma IgA in the mouse: contribution to clearance of intravascular IgA. Eur J Immunol. 1985; 15: 893-899.
- Elgqvist J, Andersson H, Bäck T, Claesson I, Hultborn R, Jensen H, Johansson BR, Lindegren S, Olsson M, Palm S, Warnhammar E, Jacobsson L.  $\alpha$ -radioimmunotherapy of intraperitoneally growing OVCAR-3 tumors of variable dimensions: Outcome related to measured tumor size and mean absorbed dose. J Nucl Med. 2006; 47: 1342-1350.
- Elgqvist J, Andersson H, Bäck T, Hultborn R, Jensen H, Karlsson B, Lindegren S, Palm S, Warnhammar E, Jacobsson L. Therapeutic efficacy and tumor dose estimations in radioimmunotherapy of intraperitoneally growing OVCAR-3 cells in nude mice with  $^{211}\text{At}$ -labeled monoclonal antibody MX35. J Nucl Med. 2005; 46: 1907-1915.
- Fischer K. Experimentelle Studien zur lokoregionalen Radioimmunotherapie disseminierter Tumorausbreitung am Beispiel des diffusen Magncarzinoms mit einem tumorspezifischen, an den  $\alpha$ -Emitter Bi-213 gekoppelten Antikörper. Diss. Tierärztliche Fakultät LMU-München. 2001.
- 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. 2000; 88: 579-583.

Garambois V, Glaussel F, Foulquier E, Ychou M, Pugnière M, Luo RX, Bezabeh B, Pèlerin A. Fully human IgG and IgM antibodies directed against the carcinoembryonic antigen (CEA) Gold 4 epitope and designed for radioimmunotherapy (RIT) of colorectal cancers. BMC Cancer. 2004; 4: 75.

Gilly FN, Carry PY, Sayag AC, Bracqet A, Panteix G, Salle B, Bienvenu J, Burgard G, Guibert G, Banssillon V, et al. Regional chemotherapy (with mitomycin C) and intra-operative hyperthermia for digestive cancers with peritoneal carcinomatosis. Hepatogastroenterology. 1994; 41: 124-129

Goldenberg DM, Sharkey RM. Advances in cancer therapy with radiolabeled monoclonal antibodies. Q J Nucl Med Mol Imaging. 2006; 50: 248-264.

Halpern SE, Hagan PL, Chen A, Birdwell CR, Bartholomew RM, Burnett KG, David GS, Poggenburg K, Merchant B, Carlo DJ. Distribution of radiolabeled human and mouse monoclonal IgM antibodies in murine models. J Nucl Med. 1988; 29: 1688-1696.

Hara M, Nakanishi H, Jun Q, Kanemitsu Y, Ito S, Mochizuki Y, Yamamura Y, Kodera Y, Tatematsu M, Hirai T, Kato T. Comparative analysis of intraperitoneal minimal free cancer cells between colorectal and gastric cancer patients using quantitative RT-PCR: possible reason for rare peritoneal recurrence in colorectal cancer. Clin Exp Metastasis. 2007; 24: 179-189.

Heiss MM, Ströhlein MA, Jäger M, Kimmig R, Burges A, Schoberth A, Jauch KW, Schildberg FW, Lindhofer H. Immunotherapy of malignant ascites with trifunctional antibodies. Int J Cancer. 2005; 117: 435-443.

Huber R. Bewertung der lokoregionalen Radioimmuntherapie disseminierter Tumorzellen des diffusen Magenkarzinoms mit einem <sup>213</sup>Bi gekoppelten tumorspezifischen Antikörper im Mausmodell. Diss. Tierärztliche Fakultät LMU-München. 2003a.

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. 2003b; 9: 3922-3928.

Huneke RB, Pippin CG, Squire RA, Brechbiel MW, Gansow OA, Strand M. Effective alpha-particle-mediated radioimmunotherapy of murine leukemia. Cancer Res. 1992; 52: 5818-5820.

Illidge TM, Brock S. Radioimmunotherapy of cancer: using monoclonal antibodies to target radiotherapy. Curr Pharm Dess. 2000; 6: 1399-1418.

Imam SK. Advancements in cancer therapy with alpha-emitters: a review. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2001; 51: 271-278.

Jones PL, Brown BA, Sands H. Uptake and metabolism of  $^{111}\text{In}$ -labeled monoclonal antibody B6.2 by rat liver. Cancer Res. 1990; 50: 852s-856s.

Jullien-Vitoux D, Voisin GA. Studies in vascular permeability. II. Comparative extravasation of different immunoglobulin classes in normal guinea pig skin. Eur J Immunol. 1973; 3: 663-669.

Jurcic JG, Larson SM, Sgouros G, McDevitt MR, Finn RD, Divgi CR, Ballangrud AM, Hamacher KA, Ma D, Humm JL, Brechbiel MW, Molinet R, Scheinberg DA. Targeted alpha particle immunotherapy for myeloid leukaemia. Blood. 2002; 100: 1233-1239.

Kaibara N. Prophylaxis and treatment of peritoneal metastasis from gastric cancer. Nippon Geka Gakkai Zasshi. 1996; 97: 308-311.

Ketcham AS, Hoye RC, Pilch YH, Morton DL. Delayed intestinal obstruction following treatment for cancer. Cancer. 1970; 25: 406-410.

Kennel SJ, Boll R, Stabin M, Schuller HM, Mirzadeh S. Radioimmunotherapy of micrometastases in lung with vascular targeted  $^{213}\text{Bi}$ . Br J Cancer. 1999a; 80: 175-184.

Kennel SJ, Mirzadeh S. Vascular targeted radioimmunotherapy with  $^{213}\text{Bi}$ --an alpha-particle emitter. Nucl Med Biol. 1998; 25: 241-246.

Kennel SJ, Stabin M, Roeske JC, Foote LJ, Lankford PK; Terzaghi-Howe M, Patterson H, Barkenbus J, Popp DM, Boll R, Mirzadeh S. Radiotoxicity of bismuth-213 bound to membranes of monolayer and spheroid cultures of tumor cells. Radiat Res. 1999b; 151: 244-256.

Kodera Y, Nakanishi H, Ito S, Yamamura Y, Fujiwara M, Koike M, Hibi K, Ito K, Tatematsu M, Nakao A. Prognostic significance of intraperitoneal cancer cells in gastric carcinoma: detection of cytokeratin 20 mRNA in peritoneal washes, in addition to detection of carcinoembryonic antigen. Gastric Cancer. 2005; 8: 142-148.

Kodera Y, Nakanishi H, Ito S, Yamamura Y, Kanemitsu Y, Shimizu Y, Hirai T, Yasui K, Kato T and Tatematsu M. Quantitative detection of disseminated free cancer cells in peritoneal washes with real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction: a sensitive predictor of outcome for patients with gastric carcinoma. Ann Surg. 2002; 235: 499-506.

Kodera Y, Nakanishi H, Yamamura Y, Shimizu Y, Torii A, Hirai T, Yasui K, Morimoto T, Kato T, Kito T and Tatematsu M. Prognostic value and clinical implications of disseminated

cancer cells in the peritoneal cavity detected by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and cytology. Int J Cancer. 1998; 79: 429-433.

Koertge TE, Butler JE. Dimeric mouse IgA is transported into rat bile five times more rapidly than into mouse bile. Scand J Immunol. 1986; 24: 567-574.

Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 1975; 256: 495-497.

Kriehuber R, Simkó M. Apoptosis induction and micronucleus formation after exposure to the Auger electron emitter zinc-65 in human cell line. Acta Oncol. 2000; 39: 699-706.

Macklis RM, Kaplan WD, Ferrara JL, Kinsey BM, Kassis AI, Burakoff SJ. Biodistribution studies of anti-Thy 1.2 IgM immunoconjugates: implications for radioimmunotherapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1988a; 15: 383-389.

Macklis RM, Kinsey BM, Kassis AI, Ferrara JL, Atcher RW, Hines JJ, Coleman CN, Adelstein SJ, Burakoff SJ. Radioimmunotherapy with alpha-particle-emitting immunoconjugates. Science. 1988b; 240: 1024-1026.

Mages J. Rekombinante disulfidstabilisierte Immuntoxine gegen mutiertes E-Cadherin zur spezifischen Krebstherapie. Diss. Technische Universität München. 2005.

Matsuoka T, Hirakawa K, Chung YS, Yashiro M, Nishimura S, Sawada T, Saiki I, Sowa M. Adhesion polypeptides are useful for the prevention of peritoneal dissemination of gastric cancer. Clin Exp Metastasis. 1998; 16: 381-388.

Mattes MJ. Radionuclide-antibody conjugates for single-cell cytotoxicity. Cancer. 2002; 94: 1215-1223.

McDevitt NR, Sgouros G, Finn RD, Humm JL, Jurcic JG, Larson SM, Scheinberg DA. Radioimmunotherapy with alpha-emitting nuclides. Eur J Nucl Med. 1998; 25: 1341-1351.

McDevitt MR, Finn RD, Sgouros G, Ma D, Scheinberg DA. An  $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$  generator system for therapeutic clinical applications: construction and operation. Appl Radiat Isot. 1999a; 50: 895-904.

McDevitt MR, Finn RD, Ma D, Larson SM, Scheinberg DA. Preparation of  $\alpha$ -emitting  $^{213}\text{Bi}$ -labeled antibody constructs for clinical use. J Nucl Med. 1999b; 40: 1722-1727.

Miederer M, Seidl C, Beyer GJ, Charlton DE, Vranjes-Duric S, Comor JJ, Huber R, Nikula T, Apostolidis C, Schumacher C, Becker KF, Senekowitsch-Schmidtke R. Comparison of the radiotoxicity of two alpha-particle-emitting immunoconjugates, terbium-149 and bismuth-

213, directed against a tumor-specific, exon 9 deleted (d9) E-cadherin adhesion protein. Radiat Res. 2003; 159: 612-620.

Milenic DE, Roselli M, Mirzadeh S, Pippin CG, Gansow OA, Colcher D, Brechbiel MW, Schlom J. In vivo evaluation of bismuth-labeled monoclonal antibody comparing DTPA-derived bifunctional chelates. Cancer Biother Radiopharm. 2001; 16: 133-146.

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. 2004; 10: 7834-7841.

Milenic DE, Garmestani K, Brady ED, Albert PS, Ma D, Abdulla A, Brechbiel MW.  $\alpha$ -Particle radioimmunotherapy of disseminated peritoneal disease using a  $^{212}\text{Pb}$ -labeled radio-immunoconjugate targeting HER2. Cancer Biother Radiopharm. 2005; 20: 557-568.

Milenic DE, Garmestani K, Brady ED, Albert PS, Abdulla A, Flynn J, Brechbiel MW. Potentiation of high-LET radiation by gemcitabine: targeting HER2 with trastuzumab to treat disseminated peritoneal disease. Clin Cancer Res. 2007; 13: 1926-1935.

Mori T, Fujiwara Y, Sugita Y, Azama T, Ishii T, Taniguchi K, Yamazaki K, Takiguchi S, Yasuda T, Yano M and Monden M. Application of molecular diagnosis for detection of peritoneal micrometastasis and evaluation of preoperative chemotherapy in advanced gastric carcinoma. Ann Surg Oncol. 2004; 11: 14-20.

Mori T, Fujiwara Y, Yano M, Yasuda T, Takiguchi S, Miyata H, Viliotou V, Monden M. A mouse model of early-stage peritoneal metastasis: optimal RT-PCR-based method for detection of peritoneal micrometastases. Oncol Rep. 2005; 13: 801-805.

Motta-Hennessy C, Sharkey RM, Goldenberg DM. Metabolism of Indium-111-labeled murine monoclonal antibody in tumor and normal tissue of the athymic mouse. J Nucl Med. 1990; 31: 1510-1519.

Nikula TK, Curcio MJ, Brechbiel MW, Gansow OA, Finn RD, Scheinberg DA. A rapid, single vessel method for preparation of clinical grade ligand conjugated monoclonal antibodies. Nucl Med Biol. 1995; 22: 387-390.

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. 1999; 40: 166-176.

- Ohashi N, Kodera Y, Nakanishi H, Yokoyama H, Fujiwara M, Koike M, Hibi K, Nakao A, Tatematsu M. Efficacy of intraperitoneal chemotherapy with paclitaxel targeting peritoneal micrometastasis as revealed by GFP-tagged human gastric cancer cell lines in nude mice. Int J Oncol. 2005; 27: 637-644.
- Pavlinkova G, Beresford GW, Booth BJ, Batra SK, Colcher D. Pharmacokinetics and Biodistribution of engineered single-chain antibody constructs of MAb CC49 in colon carcinoma xenografts. J Nucl Med. 1999; 40: 1536-1546.
- Qu CF, Song EY, Li Y, Rizvi SM, Raja C, Smith R, Morgenstern A, Apostolidis C, Allen BJ. Pre-clinical study of <sup>213</sup>Bi labelled PAI2 for the control of micrometastatic pancreatic cancer. Clin Exp Metastasis. 2005; 22: 575-586.
- Quadri SM, Malik AB, Tang X, Patenia R, Freedman RS, Vriesendorp HM. Preclinical analysis of intraperitoneal administration of <sup>111</sup>In-labeled human tumor reactive monoclonal IgM AC6C3-2B12. Cancer Res. 1995; 55(23 Suppl): 5736s-5742s.
- Reiser M, Kuhn FP, Debus J. Duale Reihe: Radiologie. Thieme Verlag, Stuttgart. 2004: 144-145.
- 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. 1995; 55(23 Suppl): 5714s-5720s.
- Rössler U, Hornhardt S, Seidl C, Müller-Laue E, Walsh L, Panzer W, Schmid E, Senekowitsch-Schmidtke R, Gomolka M. The sensitivity of the alkaline comet assay in detecting DNA lesions induced by X rays, gamma rays and alpha particles. Radiat Prot Dosimetry. 2006; 122: 154-159.
- Roth K. NMR-Tomographie und -Spektroskopie in der Medizin. Springer Verlag Berlin Heidelberg. 1984.
- Rygaard J. Immunodeficiency in nude mice. In: Bastert GBA. Thymusaplastic nude mice and rats in clinical oncology. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York. 1981, 3-13.
- Sadeghi B, Arvieux C, Glehen O, Beaujard AC, Rivoire M, Baulieux J, Fontaumard E, Brachet A, Caillot JL, Faure JL, Porcheron J, Peix JL, François Y, Vignal J, Gilly FN. Peritoneal carcinomatosis from non-gynecologic malignancies: results of the EVOCAPE 1 multicentric prospective study. Cancer. 2000; 88: 358-363.
- Sampson JA. Implantation peritoneal carcinomatosis of ovarian origin. Am J Pathol. 1931; 7: 423-443.



- Seidenschwang S. Untersuchungen zur In-Vitro-Zytotoxizität von  $^{213}\text{Bi}$ -Immunkonjugaten. Diss. Medizinische Fakultät. Technische 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, und Senekowitsch-Schmidtke R. Cell death triggered by alpha-emitting  $^{213}\text{Bi}$ -immunoconjugates in HSC45-M2 gastric cancer cells is different from apoptotic cell death. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2005; 32: 274-285.
- Senekowitsch-Schmidtke R. Antibodies. *In: Molecular nuclear medicine with antibodies, peptides and nucleotides.* Münz DL. W. Zuckschwerdt Verlag. 2000: 5-23.
- Senekowitsch-Schmidtke R, Schuhmacher C, Becker KF, Nikula TK, Seidl C, Becker I, Miederer M, Apostolodis C, Adam C, Huber R, Kremmer E, Fischer K, Schwaiger M. Highly specific tumor binding of a  $^{213}\text{Bi}$ -labeled monoclonal antibody against mutant E-Cadherin suggests its usefulness for locoregional  $\alpha$ -radioimmunotherapy of diffuse-type gastric cancer. Cancer Res. 2001; 61: 2804-2808.
- Sgouros G, Ballangrud AM, Jurcic JG, McDevitt MR, Humm JL, Erdi YE, Mehta BM, Finn RD, Larson SM, Scheinberg DA. Pharmacokinetics and dosimetry of an alpha-particle emitter labeled antibody:  $^{213}\text{Bi}$ -HuM195 (anti-CD33) in patients with leukaemia. J Nucl Med. 1999; 40: 1935-1946.
- Shepherd NA, Baxter KJ, Love SB. Influence of local peritoneal involvement on pelvic recurrence and prognosis in rectal cancer. J Clin Pathol. 1995; 48: 849-855.
- Srivastava SC. Criteria for the selection of radionuclides for targeting nuclear antigens for cancer radioimmunotherapy. Cancer Biother Radiopharm. 1996; 11: 43-50.
- Sugarbaker PH. Peritonectomy procedures. Ann Surg. 1995; 221: 29-42.
- Sugita Y, Fujiwara Y, Taniguchi H, Mori T, Ishii T, Niwa H, Okada Y, Takiguchi S, Yasuda T, Yano M and Monden M. Quantitative molecular diagnosis of peritoneal lavage fluid for prediction of peritoneal recurrence in gastric cancer. Int J Oncol. 2003; 23: 1419-1423.
- Targarona EM, Martinez J, Nadal A, Balagué C, Cardesa A, Pascual S, Trias M. Cancer dissemination during laparoscopic surgery. World J Surg. 1998; 22: 55-60.
- Ugur O, Kostakoglu L, Hui ET, Fischer DR, Garmestani K, Gansow OA, Cheung NV, Larson SM. Comparison of the targeting characteristics of various radionuclides for radioimmunotherapy of neuroblastoma: Dosimetry calculations incorporating cross-organ beta doses. Nucl Med Biol. 1996; 23: 1-8.

Van Geel JNC, Fuger JJ, Koch L, inventors. Method for producing actinium-225 and bismuth-213. US patent 5,355,394.1994.

Wang J, Abbas Rizvi SM, Madigan MC, Cozzi PJ, Power CA, Qu CF, Morgenstern A, Apostolidis C, Russel PJ, Allen BJ, Li Y. Control of prostate cancer spheroid growth using <sup>213</sup>Bi-labeled multiple targeted alpha radioimmunoconjugates. Prostate. 2006; 66: 1753-1767.

Weill FS, Costaz R, Guetarni S, Maltoni I, Rohmer P. Diagnostic echographiques des métastases péritonéales chez les malades ascitiques. J Radiol. 1990; 71: 365-368.

Yanagihara K, Ito A, Toge T, Numoto M. Antiproliferative effects of isoflavones on human cancer cell lines established from the gastrointestinal tract. Cancer Res. 1993; 53: 5815-5821.

Yanagihara K, Tanaka H, Takigahira M, Ino Y, Yamaguchi Y, Toge T, Sugano K, Hirohashi S. Establishment of two cell lines from human gastric scirrhous carcinoma that possess the potential to metastasize spontaneously in nude mice. Cancer Sci. 2004; 95: 575-582.

Yanagihara K, Takigahira M, Tanaka H, Komatsu T, Fukumoto H, Koizumi F, Nishio K, Ochiya T, Ino Y, Hirohashi S. Development and biological analysis of peritoneal metastasis mouse models for human scirrhous stomach cancer. Cancer Sci. 2005; 96: 323-332.

Yao Z, Zhang M, Garmestani K, Axworthy DB, Mallett RW, Fritzberg AR, Theodore LJ, Plascjak PS; Eckelman WC, Waldmann TA, Pastan I, Paik CH, Brechbiel MW, Carrasquillo JA. Pretargeted alpha emitting radioimmunotherapy using (213)Bi 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N, N', N'', N'''-tetraacetic acid-biotin. Clin Cancer Res. 2004; 10: 3137-3146.

Yokota T, Milenic DE, Whitlow M, Schlom J. Rapid tumor penetration of single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. Cancer Res. 1992; 52: 3402-3408.

Zalutsky MR. Current status of therapy of solid tumors: brain tumor therapy. J Nucl Med. 2005; 46 Suppl 1: 151S-156S.

Zalutsky MR, Vaidyanathan G. Astatine-211-labeled radiotherapeutics: an emerging approach to targeted alpha-particle radiotherapy. Curr Pharm Des. 2000; 6: 1433-1455.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

$^{90}\text{Y}$	Yttrium-90
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	metastabiles Technetium-99
$^{111}\text{Cd}$	Cadmium-111
$^{111}\text{In}$	Indium-111
$^{125}\text{I}, ^{131}\text{I}$	Iod-125, -131
$^{125}\text{Te}$	Tellur-125
$^{137}\text{Cs}$	Caesium-137
$^{149}\text{Tb}$	Terbium-149
$^{177}\text{Lu}$	Lutetium-177
$^{188}\text{Re}$	Rhenium-188
$^{205/206}\text{Bi}, ^{209}\text{Bi}, ^{212}\text{Bi}, ^{213}\text{Bi}$	Wismut-205/206, -209, -212, -213
$^{209}\text{Pb}, ^{212}\text{Pb}$	Blei-209, -212
$^{209}\text{Tl}$	Thallium-209
$^{213}\text{Po}$	Polonium-213
$^{225}\text{Ac}$	Actinium-225
$^{225}\text{Ra}, ^{226}\text{Ra}$	Radium-225, -226
$^{229}\text{Th}$	Thorium-229
$^{233}\text{U}$	Uran-233
Abb.	Abbildung
Bq	Bequerel
BSA	Bovines Serum Albumin
Ci	Curie: $1 \text{ Ci} = 3,7 \times 10^{10} \text{ Bq}$
cpm	counts per minute
d	Tag
Da	Dalton (g/Mol)
d9-E-Cadherin	Mutation des Exon 9 für die Expression des E-Cadherins
d9-Fab'	Antikörperfragment gegen d9-Mutation des E-Cadherins
d9-Mab	Antikörper gegen d9-Mutation des E-Cadherins
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOTA	1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid

DTPA	diethylenetriamine pentaacetic acid
$E_{\alpha}$	Mittlere Energie pro $\alpha$ -Partikel
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
eV	Elektronenvolt
FDG	2-[ $^{18}\text{F}$ ]Fluor-2-Deoxy-Glucose
g	Fallbeschleunigung der Erde: 9,81 Meter/sec <sup>2</sup>
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HSC	Human Signetringcell Carcinoma
HWZ, $T_{1/2}$	physikalische Halbwertszeit
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IgM	Immunglobulin der Klasse M
ITLC	instant thin layer chromatographie
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
LET	Linearer Energietransfer
n	Anzahl der Meßpunkte (Tiere oder Zellen)
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphatpuffer)
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
p.i.	post injectionem
r	Radius
RBW	Relative biologische Wirksamkeit
RIK	Radioimmunkonjugat
ROI	region of interest
Tab.	Tabelle
U/min	Umdrehungen pro Minute
U/ml	Units pro Milliliter
wt-E-Cadherin	Wildtypvariante für die Expression des E-Cadherins
% ID/g	Prozent der injizierten Aktivität pro Gramm Gewebe

## 9 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Frau Prof. Dr. Dr. R. Senekowitsch-Schmidtke für die Überlassung des Themas, die liebenswürdige Betreuung und tatkräftige Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Betreuer Herrn Dr. C. Seidl für die unermüdliche Unterstützung in allen Belangen, die in großem Maße zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Nicht zu vergessen ist die zeitintensive und akribische Korrektur der vorliegenden Arbeit.

Meiner Betreuerin Frau TÄ B. Pfost gilt mein Dank für die große Hilfe bei der Durchführung sämtlicher tierexperimenteller Versuche.

Ebenso möchte ich mich bei den Mitarbeitern im Labor für das kollegiale Umfeld und die tatkräftige Hilfe bei der Ausführung der Experimente bedanken. Hier gilt mein besonderer Dank Herrn F. Gärtner, Herrn J. Müller sowie Frau U. Schwaiger.

Bedanken möchte ich mich auch bei dem gesamten Team der technischen Mitarbeiter der nuklearmedizinischen Abteilung unter der Leitung von Frau J. Grahneis, die mich mit viel Geduld und großem Engagement bei der Erstellung der szintigraphischen Aufnahmen unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. K. F. Becker danke ich für die Bereitstellung des IgG-Antikörpers und des Fab'-Antikörperfragments.