

**Neue, radioaktiv markierte und Magnet-Resonanz-aktive
Somatostatinanaloga zur besseren Diagnose und zielgerichteten
Radionuklidtherapie von neuroendokrinen Tumoren**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie

vorgelegt der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Basel

von

Daniel Storch

aus Riehen, BS

Basel, 2005

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät auf Antrag von

Prof. Dr. Helmut R. Mäcke

Prof. Dr. Beat Ernst

Prof. Dr. Hans Leuenberger

Basel, den 8. Februar 2005

Prof. Dr. Hans-Jakob Wirz (Dekan)

für meine Eltern

Leonie und Wolfgang Storch

Herrn Prof. Dr. Helmut R. Mäcke möchte ich für die Überlassung des Themas, seine kompetente Betreuung und seine stetige Unterstützung dieser Arbeit herzlich danken.

Ausserdem möchte ich den folgenden Personen danken:

Herrn Prof. Beat Ernst für die Übernahme des Korreferates,

Herrn Prof. Jan Müller, Chefarzt, Universitätsspital Basel,

Kayan Akyel, Dieter Staab, Ueli Ramseier von der Firma Novartis (Basel) für die Aufnahme der IR-, MS- und NMR-Spektren,

Prof. André Merbach und Dr. Eva Toth, Prof. Klaus Scheffler für die Zusammenarbeit am Projekt der zielgerichteten MRI-Kontrastmittel,

Dr. Hans Rink für seine hilfreichen Anregungen zur Peptidsynthese

Christian Waldherr, Jianhua Chen und Martin A. Walter für die Bioverteilungsexperimente,

Prof. J. C. Reubi und Beatrice Waser für die Bestimmung der Bindungsaffinitäten,

dem Team der Radiologischen Chemie und der Nuklearmedizin für die freundschaftliche Aufnahme und Zusammenarbeit,

und allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Mäcke für die gute Zusammenarbeit und die gemeinsame Zeit:

Jörg S. Schmitt, Axel Heppeler, João P. André, Martin Béhé, Klaus Eisenwiener, Stephan Good, Hanwen Zhang, Michaela Ginj, Valerie Hinard, Sandrine Fraysse, Patricia Antunes, Michael Frischknecht.

Teile dieser Arbeit wurden publiziert und/oder an Kongressen und Workshops vorgestellt.

Publikationen

1. Flavio Forrer, Helena A. Uusijärvi, Daniel Storch, Helmut R. Maecke, Jan Mueller-Brand. Treatment with Lu-177-DOTATOC in Patients with Relapse of Neuroendocrine Tumors after Treatment with Y-90-DOTATOC. *J Nucl Med*, submitted 2004.
2. D. Storch, M. Béhé, J. Chen, M.A. Walter, P. Powell, R. Mikolajczak, H.R. Mäcke. Evaluation of [$^{99m}\text{Tc}/\text{EDDA}/\text{HYNIC}^0$]-Octreotide-Derivatives Compared to [$^{111}\text{In-DOTA}^0\text{-Tyr}^3\text{-Thr}^8$]-Octreotide and [$^{111}\text{In-DTPA}^0$]-Octreotide - Does Tumor Uptake Correlate with the Rate of Internalisation? *J Nucl Med*, in preparation.
3. Daniel Storch, Jörg S. Schmitt, Christian Waldherr, Beatrice Waser, Jean-Claude Reubi, Helmut R. Mäcke. Preclinical Evaluation of Somatostatin Analogues Bearing Two Macrocyclic Chelators for High Specific Activity Labeling with Hard Radiometals. *Bioconjugate Chem*, in preparation.

Abstracts

1. I. Buschmann, D. Storch, P. Powell, H.R. Mäcke, M. Behe. Technetium-99m-HYNIC-SRIF-Analogues: Properties dependent on peptide structure and coligand. *Eur J Nucl Med* **2000**, 27 (8), 978.
2. D. Storch, R. Micolajczak, H.R. Mäcke. Synthesis of HYNIC Somatostatin Analogs. *COST B12 Workshop (COST=European Cooperation in the field of Scientific and Technical Research), Working Group 3 - „Radiolabeled biologically active peptides and oligonucleotides“*, **2000**, Paris, Oral Presentation.
3. S. Fraysse-Phisbien, D. Storch, H.R. Maecke. Targeted Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents. *Fall Meeting SCG*, **2002**, Basel, Poster Prize.

-
4. D. Storch, P. Powell, J. Chen, M. Behe, H.R. Maecke. Preclinical Comparison of ^{111}In -DOTA-TATE with $^{99\text{m}}\text{Tc}$ /EDDA/HYNIC-TATE. *IRIST (International Research Group in Immunoscinigraphy and Immunotherapy) 16th International Meeting*, **2003**, Capri, Poster Presentation.
 5. D. Storch, J.S. Schmitt, C. Waldherr, J. Chen, J.-C. Reubi, H.R. Maecke. Preclinical Evaluation of Somatostatin Analogues Bearing Multiple Macrocyclic Chelators for High Specific Activity Labeling with Hard Radiometals. *IRIST (International Research Group in Immunoscinigraphy and Immunotherapy) 16th International Meeting*, **2003**, Capri, Oral Presentation.
 6. D. Storch, J.S. Schmitt, C. Waldherr, J. Chen, E. Toth, A.E. Merbach, J.-C. Reubi, H.R. Maecke. Targeted MRI Contrast and Radiopharmaceutical Agents Based on Poly-DOTA Conjugated Somatostatin Analogs. *5th International Conference on f-Elements and COST D18 Workshop*, **2003**, Genf, Oral Presentation.
 7. D. Storch, J.S. Schmitt, C. Waldherr, J. Chen, J.-C. Reubi, H.R. Maecke. Preclinical Evaluation of Somatostatin Analogues Bearing Multiple Macrocyclic Chelators for High Specific Activity Labeling with Hard Radiometals. *Annual Meeting of the SGNM*, **2004**, Interlaken, Oral Presentation.
 8. D. Storch, H.R. Mäcke, J.C. Reubi, The Influence of Multiple Chelator Coupled Peptides on Pharmacology. *COST D18 Working Group Meeting*, **2004**, Athen, Oral Presentation.
 9. D. Storch, P. Antunes, J. Chen, M.A. Walter, J.C. Reubi, H.R. Mäcke. Biodistribution Modifiers by Introducing Spacer Molecules Based on Carbohydrates and Amino Acids to Improve DOTA-Somatostatin Analogs. *Annual Meeting EANM*, **2004**, Helsinki, Oral Presentation.

10. H.R. Maecke, D. Storch, C. Waldherr, E. Toth, A.E. Merbach, J.-C. Reubi. Targeted MRI Contrast and Radiopharmaceutical Agents Based on Poly-DOTA Conjugated Somatostatin Analogs. *Annual Meeting of SMI*, **2004**, St. Louis, Poster Presentation.
11. D. Storch, E. Toth, C. Waldherr, J.-C. Reubi, A.M. Merbach, H.R. Maecke. Targeted MRI Contrast And Radiopharmaceutical Agents Based on Poly-DOTA Conjugated Somatostatin Analogs. *COST D18 Workshop*, **2004**, La Coruña, Oral Presentation.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	13
1.1 RADIOPHARMAZIE.....	13
1.2 KONJUGATION VON BIFUNKTIONELLEN CHELATOREN.....	16
1.2.1 KOPPLUNGSREAGENZIERN	16
1.2.2 CHELATOREN FÜR INDIUM-111 UND YTTRIUM-90	17
1.2.3 CHELATOREN FÜR TECHNETIUM-99M	20
1.3 PEPTID-REZEPTOR-TARGETING.....	23
1.3.1 SOMATOSTATINANALOGA.....	25
1.3.2 INDIUM-111- UND YTTRIUM-90- MARKIERTE SRIF-ANALOGA	30
1.3.3 TECHNETIUM-99M-MARKIERTE SRIF-ANALOGA	32
1.3.3.1 TECHNETIUM-99M.....	32
1.3.3.2 TECHNETIUM-99M-SRIF-ANALOGA	34
1.4 TRIFUNKTIONELLE PEPTIDE.....	37
1.5 MULTI-DOTA-SRIF-ANALOGA	40
1.6 MRI-KONTRASTMITTEL	42
1.6.1 RELAXIVITÄT VON GADOLINIUM-(III)-KOMPLEXEN	44
1.6.2 ANSATZPUNKTE ZUR OPTIMIERUNG DER RELAXIVITÄT	45
2. AUFGABENSTELLUNG / FRAGESTELLUNG	48
3. EXPERIMENTELLER TEIL.....	50
3.1 MATERIAL.....	50
3.2 VERWENDETE GERÄTE	50
3.3 HPLC-GRADIENTEN	52
3.4 AAV	53
3.5 SYNTHESEN	57
3.5.1 PEPTIDSYNTHESEN	57
3.5.2 HYNIC-Boc	58
3.5.3 HYNIC-TOC.....	59
3.5.4 HYNIC-TATE	60
3.5.5 AA49-TATE	61
3.5.6 DOTA(tBU) ₃	62
3.5.7 DOTA-TATE.....	63
3.5.8 DOTA-ASP-TATE	64

3.5.9	DOTA-THR-TATE.....	64
3.5.10	PENTASARCOSINE / Fmoc-SAR ₅ -OH.....	65
3.5.11	DOTA-SAR ₅ -TATE.....	66
3.5.12	DOTA-LYS(GLUC)-TATE.....	67
3.5.13	DOTA-THR(CELLOBIOSE)-TATE.....	68
3.5.14	DOTA-LYS(DOTA)-TATE.....	69
3.5.15	DOTA-LYS(DOTA)-SAR ₅ -TATE.....	70
3.5.16	DOTA ₂ -APG-TATE.....	71
3.5.17	DOTA ₂ -APG-SAR ₅ -TATE.....	72
3.5.18	DOTA ₄ -APG ₃ -TATE.....	73
3.5.19	DOTA ₄ -APG ₃ -SAR ₅ -TATE.....	74
3.5.20	DOTA _{4-LIN} LYS ₃ -SAR ₅ -TATE.....	75
3.6	METALLKOMPLEXE DER CHELATOR-PEPTID-KONJUGATE.....	76
3.7	KITFORMULIERUNG FÜR [^{99m}Tc/EDDA/TRICINE-HYNIC]-DERIVATE.....	77
3.8	MARKIERPROTOKOLLE.....	78
3.8.1	KIT-MARKIERUNG DER HYNIC-DERIVATE.....	78
3.8.2	MARKIERUNG MIT TECHNETIUM-CARBONYLEN.....	79
3.8.3	MARKIERUNG VON DTPA-OCTREOTIDE.....	79
3.8.4	MARKIERUNG VON DOTA-PEPTID-KONJUGATEN.....	80
3.9	SERUMSTABILITÄTSSTUDIEN.....	80
3.10	INTERNALISIERUNG MIT AR4-2J-TUMORZELLEN.....	81
3.11	EXTERNALISIERUNG.....	83
3.12	BIOVERTEILUNG.....	84
3.13	BIOVERTEILUNG-COCKTAIL-EXPERIMENT.....	85
<u>4. RESULTATE UND DISKUSSION.....</u>		<u>86</u>
4.1	TECHNETIUM-99M-MARKIERTE DERIVATE.....	86
4.1.1	SYNTHESE VON HYNIC-DERIVATEN.....	86
4.1.2	BESTIMMUNG DES EXTINKTIONSKOEFFIZIENTEN VON HYNIC.....	88
4.1.3	INTERNALISIERUNG VON HYNIC-DERIVATEN.....	89
4.1.4	EXTERNALISIERUNG.....	92
4.1.5	SERUMSTABILITÄT.....	93
4.1.6	TOXIZITÄTS-TEST.....	94
4.1.7	BIOVERTEILUNG.....	94
4.1.8	SZINTIGRAPHIE AN TUMORTRAGENDEN RATTEN.....	98
4.1.9	SZINTIGRAPHIE.....	98
4.1.10	TECHNETIUM-CARBONYL-DERIVATE.....	100

4.2 DOTA-xyz-TATE.....	102
4.2.1 SYNTHESE	102
4.2.2 INTERNALISIERUNG.....	104
4.2.3 EXTERNALISIERUNG.....	105
4.2.4 BINDUNGS-AFFINITÄTEN	108
4.2.5 BIOVERTEILUNGEN	108
4.2.6 SZINTIGRAPHIEN	111
4.2.7 PHARMAKOKINETIK VIA SZINTIGRAPHIE.....	113
4.3 Bis-DOTA-TATE-DERIVATE.....	114
4.3.1 SYNTHESE	114
4.3.2 SERUMSTABILITÄT	115
4.3.3 MARKIERUNGSEXPERIMENTE	116
4.3.4 BINDUNGS-AFFINITÄTEN	118
4.3.5 INTERNALISIERUNG.....	120
4.3.6 EXTERNALISIERUNG.....	122
4.3.7 BIOVERTEILUNGEN	123
4.4 TETRA-DOTA-TATE-DERIVATE.....	127
4.4.1 SYNTHESE	127
4.4.2 MARKIEREXPERIMENTE	130
4.4.3 BINDUNGS-AFFINITÄTEN	131
4.4.4 INTERNALISIERUNG.....	132
4.4.5 EXTERNALISIERUNG.....	134
4.4.6 BIOVERTEILUNGEN	134
4.5 TARGETED MRI CONTRAST AGENTS	137
4.5.1 TAKTIK/SYNTHESE.....	137
4.5.2 BINDUNGS-AFFINITÄTEN	137
4.5.3 INTERNALISIERUNG.....	138
4.5.4 ¹ H-NMRD-MESSUNGEN	140
4.5.5 RELAXIVITÄTSMESSUNGEN AM KLINISCHEN MRI GERÄT.....	141
<u>5. ZUSAMMENFASSUNG / AUSBLICK.....</u>	<u>144</u>
<u>6. LITERATUR.....</u>	<u>149</u>

Abkürzungen

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Ac	Acetyl
Acm	Acetamidomethyl (Schutzgruppe für Cys)
Apg	Aminopropylglycin
APUD	Amine Precursor Uptake and Decarboxylation
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl (Schutzgruppe für Amine)
Bq	Becquerel (Zerfall pro Sekunde)
BSA	Bovine Serum Albumine
Ci	Curie ($3.7 \cdot 10^{10}$ Bq), "alte Einheit"
DCM	Dichlormethan / Methylenchlorid
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	N,N-Diisopropylethylamin
Dmab	4-N-[[[4,4-Dimethyl-2,6-dioxo-cyclohexyliden)-3-methyl-butyl]-amino]-benzyloxy (Schutzgruppe für -COOH)
DMF	N,N-Dimethylformamid
DO3A	1,4,7,10-Tetraazacyclododekan-1,4,7-triessigsäure
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododekan-1,4,7,10-tetraessigsäure
DTPA	Diethylendiamin-pentaessigsäure
EDDA	Ethylendiamin-diessigsäure
EE	Essigsäureethylester
FCS	Foetal Calf Serum
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
GEP Tumor	Gastro-Entero-Pankreatischer Tumor
GH	Growth Hormone = Wachstumshormon
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphat

HOBt	Hydroxybenzotriazol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSA	Human Serum Albumin
HYNIC	6-Hydrazinopyridin-3-carboxylsäure
ivDde	1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxo-cyclohexyliden)3-methylbutyl (Schutzgruppe für -NH ₂)
MRI	Magnetic Resonance Imaging
MS	Massenspektroskopie
MTC	Medullary Thyroid Cancer
NMP	N-Methylpyrrolidon
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
OC	D-Phe-c[Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr(ol) = Octreotide
PET	Positron Emission Tomography
RT	Raumtemperatur
SCLC	Small Cell Lung Cancer
SPECT	Single Photon Emissions Computer Tomography
SRIF	Somatropin Release Inhibiting Factor
sst	Somatostatin-Rezeptorsubtyp
TATE	Tyr ³ -Thr ⁸ -Octreotide
t-Bu	<i>tert</i> -Butyl (Schutzgruppe für -OH)
TCP	Tritylchlorid Polystyrol
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
TOC	Tyr ³ -Octreotide
TSH	Thyreoidase Stimulierendes Hormon

1. Einleitung

1.1 Radiopharmazie

Die Radiopharmazie beschäftigt sich mit der Entwicklung von Arzneimitteln, die Radionuklide enthalten und deren Strahlungsaktivität diagnostisch oder therapeutisch genutzt werden kann. Für die Bildgebung kommen heute zwei unterschiedliche Verfahren zum Einsatz: die γ -Szintigraphie und die PET (**P**ositron **E**mission **T**omography).

Bei der γ -Szintigraphie werden Radiopharmaka verwendet, die γ -emittierende Radionuklide enthalten. Für die Bildgebung werden herkömmliche γ -Kameras verwendet oder auch das moderne Schnittbildverfahren SPECT (**S**ingle **P**hoton **E**mission **C**omputer **T**omography). Die γ -Kamera besteht aus einem grossflächigen Einkristall aus NaI(Tl), vor dem ein Kollimator aus Blei sitzt (Abbildung 1). Der Kollimator stellt eine Abschirmung dar, die nur γ -Quanten, welche senkrecht auf den Natriumiodidkristall einfallen, durchlässt, so dass Streustrahlung keinen Einfluss auf die Bildgebung hat. Durch die γ -Strahlen werden im NaI(Tl)-Kristall Lichtblitze erzeugt (Szintillation), welche von Sekundärelektronenvervielfachern (SEV) in elektrische Signale umgewandelt und verstärkt werden.

Die Energie der eingesetzten γ -Photonen ist von grosser Bedeutung, die meisten γ -Kameras haben einen optimalen Arbeitsbereich, der zwischen 100 und 250 keV liegt. Radionuklide mit einer niedrigeren oder höheren γ -Energie würden Bilder mit einer ungenügenden Qualität ergeben (1). Mit modernen SPECT-Kameras ist es durch die Rotation eines oder mehrerer Detektoren sowie mit der mathematischen Aufbereitung möglich, dreidimensionale und überlagerungsfreie Bilder von bestimmten Organen zu erhalten. Dieses Verfahren ermöglicht eine höhere Ortsauflösung und ist zudem signifikant günstiger als eine vergleichbare PET oder MRI Aufnahme.

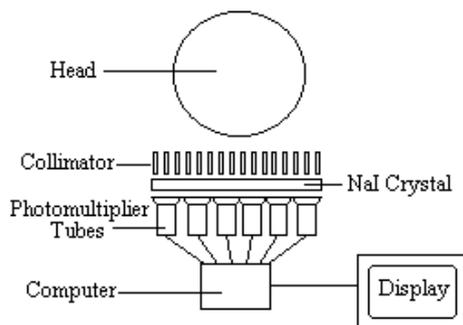


Abbildung 1: Schematische Darstellung einer γ -Kamera

PET beruht auf einem ähnlichen Verfahren, besitzt aber eine bessere räumliche Auflösung und eine höhere Sensitivität gegenüber einer herkömmlichen SPECT-Aufnahme.

Bei dieser Aufnahmetechnik werden Positronen (β^+) emittierende Radionuklide (^{11}C , ^{15}O , ^{18}F , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{86}Y) verwendet. Diese Nuklide emittieren ein Positron, welches nach kurzer Flugstrecke mit einem Elektron kollidiert. Bei dieser Annihilation werden in einem Winkel von 180° zwei Photonen mit einer Energie von 511 keV frei. Diese Photonen werden in einem Detektorring mit Szintillatoren und Photomultipliern erfasst. Gegenüberliegende Detektoren sind so verknüpft, dass sie nur Signale von koinzidierenden Photonen aufnehmen. Mittels Computer wird danach der Ort der Annihilation berechnet. Die Tatsache, dass die Emission des Positrons und die Annihilation mit einem Elektron nicht am selben Ort passieren, beschränkt die örtliche Auflösung auf 2-3 mm.

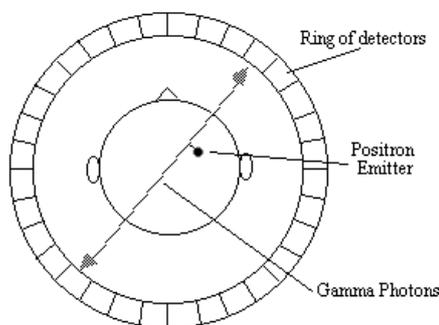


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines PET Scanners.

Die Positronen werden von den Radioisotopen im Gehirn emittiert. Das Positron trifft auf ein Elektron, bei der Annihilation entstehen zwei Photonen, die in einem Winkel von 180° emittiert werden.

Für die interne Radiotherapie werden wegen der lokal begrenzten Strahlungswirkung hauptsächlich Radiopharmaka verwendet, die α - und β^- -emittierende Radionuklide enthalten. Diese therapeutischen Radiopharmaka werden dazu eingesetzt, therapeutische Dosen ionisierender Strahlung mit hoher Spezifität zum Tumor zu transportieren. Jedoch sind auch weitere therapeutische Anwendungen wie die Behandlung von Arthritis und die Schmerzbekämpfung von Knochenmetastasen möglich (2).

Die Palette der Radiopharmaka umfasst kleine organische Moleküle, wie z.B. ^{11}C - oder ^{15}N -markierte Aminosäuren und Nukleinsäuren, ^{18}F -Desoxy-Glukose (FDG), ^{18}F -Dihydroxyphenylalanin (^{18}F -DOPA), markierte monoklonale Antikörper und regulatorische Chelator-Peptid-Konjugate (Abbildung 3).

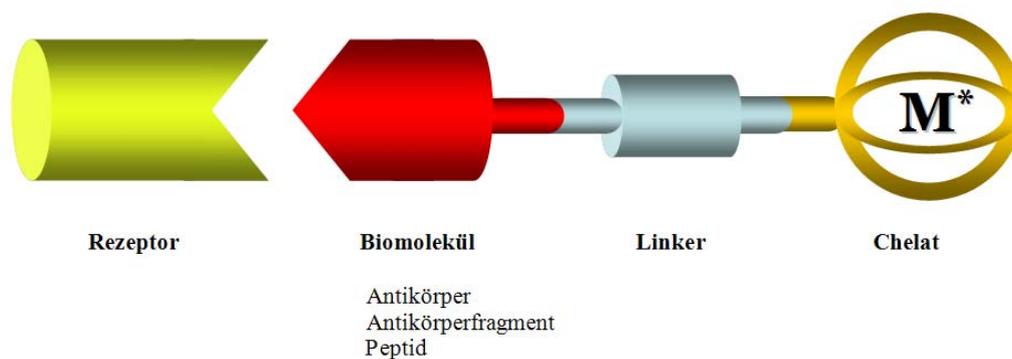


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Chelator-Biomolekül-Konjugats.

Bei der Entwicklung von „target-spezifischen“ Radiopharmaka spielen verschiedene Faktoren eine wichtige Rolle: die Konjugate müssen eine hohe Affinität zum Rezeptor besitzen, möglichst rezeptorvermittelt in die Tumorzelle internalisieren, unter physiologischen Bedingungen eine hohe Stabilität aufweisen; bezüglich der verwendeten Isotopen sind Faktoren wie z.B. Halbwertszeit, Art des Zerfalls, Kosten und Verfügbarkeit entscheidend. Für die diagnostische Anwendung muss ein Radionuklid mit einer Halbwertszeit eingesetzt werden, das eine hohe Aktivitätsanreicherung im Zielgewebe sowie die rasche Clearance der Hintergrundaktivität (target-to-background-ratio) gewährleistet. Um die möglichst geringe Strahlenbelastung des Patienten sicherzustellen, sollte die Halbwertszeit des Radionuklids

jedoch auch so kurz wie möglich gewählt werden. Die ideale Halbwertszeit ist in erster Linie abhängig von der Zeit, die das Radiopharmakon benötigt, um das Zielgewebe zu erreichen. In Tabelle 1 sind einige der zurzeit wichtigsten diagnostischen γ - und β^+ -Emitter und therapeutischen α - und β^- -Emitter aufgelistet (1-3).

Tabelle 1: Physikalische Daten einiger häufig verwendeten diagnostischen und therapeutischen Radionuklide (4)

	Isotop	$T_{1/2}$ [h]	Zerfallsart	E_γ [keV]	E_{β^+} [keV]	max. E_{β^-} [keV]	\emptyset Reichweite [mm]	
Diagnostische Nuklide	PET-Nuklide	^{11}C	β^+ (100%)		500			
		^{18}F	β^+ (96.7%) EC (3.3%)		500			
		^{64}Cu	β^+ (61.0%) β^- (39.0%)			1345		
		^{68}Ga	β^+ (89.1%) EC (11.0%)			1883, 1077		
		^{86}Y	β^+ (100%)			1076, 628		
		^{124}I	β^+ (22.8%) EC (11.0%)			1530		
	γ -Emitter	^{67}Ga	78.3	EC (100%)	91, 93, 185, 296, 388			
		$^{99\text{m}}\text{Tc}$	6.0	IT (100%)	141			
		^{111}In	67.9	EC (100%)	172, 245			
		^{123}I	13.2	EC (100%)	159			
Therapienuklide	α -E.	^{213}Bi	α (100%)	1101, 440				
		^{225}Ac	α (100%)	150, 100				
	β^- -Emitter	^{90}Y	64.1	β^- (100%)	---		2270	2.8
		^{131}I	193.0	γ (81%), β^-	364		606	0.3
		^{177}Lu	161.0	γ (11%, 6.4%), β^- (79%)	113, 208		500	0.2
		^{186}Re	90.6	EC (9%), β^-	137		1071	0.7
		^{188}Re	17.0	γ (15%), β^-	155		2116	2.4

1.2 Konjugation von bifunktionellen Chelatoren

1.2.1 Kopplungsreagenzien

Zur Konjugation eines bifunktionellen Chelators an ein Peptid (Abbildung 3) bedient man sich diverser funktioneller Gruppen. Dabei unterscheidet man die folgenden drei Gruppen:

a.) Gruppen für eine Kopplung an den N-Terminus eines Peptides oder eine Aminogruppe einer Peptidseitenkette (z.B. Lysin). Für die Kopplung an eine Aminofunktion kommen dabei Aktivester zum Einsatz, die eine hohe Selektivität für Amine aufweisen. Zur Knüpfung der Amidbindung werden dabei für die Aktivierung der Carboxylgruppe Carbodiimide wie N,N'-Diisopropylcarbodiimid (DIC) zusammen mit N-Hydroxysuccinimid (NHS) (5), 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) oder 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol (HOAt) eingesetzt. Eine Weiterentwicklung von HOBt und HOAt stellt O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphat (HATU) (6) dar.

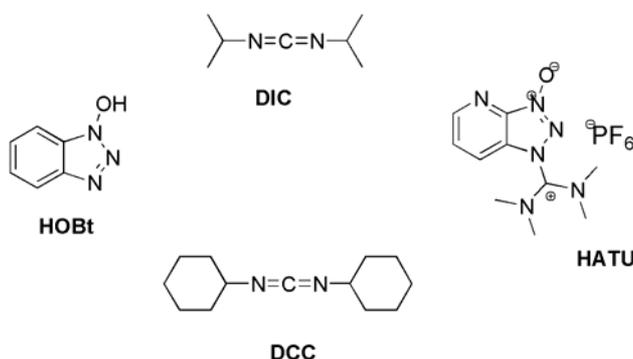


Abbildung 4: Häufig verwendete Kopplungsreagenzien: **HOBt**: Hydroxybenzotriazol, **DIC**: Diisopropylcarbodiimid, **DCC**: Dicyclohexylcarbodiimid, **HATU**: O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphat.

b.) Gruppen für eine Kopplung an den C-Terminus oder eine Säuregruppe einer Peptidseitenkette (z.B. Asparaginsäure). Die Kopplung an eine Säuregruppe eines Peptids mittels Aminofunktion eines bifunktionellen Chelators kann wiederum analog a.) durch die aus der Peptidsynthese bekannten Methoden erfolgen.

c.) Gruppen zur Konjugation an eine Thiolgruppe (z.B. Cystein). Dabei kommen thiolreaktive Gruppe wie Maleimide zum Einsatz, die ohne Beeinträchtigung durch Histidin oder eine andere aktive Gruppe selektiv Thioetherfunktionen ausbilden.

1.2.2 Chelatoren für Indium-111 und Yttrium-90

Für die nuklearmedizinische diagnostische Anwendung sind neben ^{99m}Tc die Metallionen Indium und Gallium in der Oxidationsstufe +III interessant. ^{68}Ga könnte aufgrund eines

verfügbaren $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generatorsystems für PET-Zentren ohne eigenes Zyklotron eine interessante Ergänzung zu ^{18}F darstellen, andererseits handelt es sich bei ^{67}Ga und ^{111}In um geeignete Radionuklide für die herkömmliche γ -Szintigraphie und SPECT. Sowohl ^{111}In als auch ^{67}Ga besitzen einen ausgeprägten harten Lewissäure-Charakter und bevorzugen nach dem HSAB Prinzip (7,8) Liganden, die Sauerstoffatome als Donor enthalten. Indium(III), das etwas „weicher“ als Ga^{III} ist, bevorzugt neutrale Stickstoff- und negative Schwefelatome, COO^- und Phenole. Die Koordinationschemie beider Metallionen wurde ausgiebig untersucht und hat zu 3-, 4-, 5- und 6-fach koordinierten und im Falle von In^{III} sogar zu 7- und 8-fach koordinierten Metallkomplexen geführt (9).

Bei der Entwicklung von neuen Chelator-Peptid-Konjugaten zur Komplexierung von di- und tri-valenten Radiometallen haben sich besonders offenkettige und makrozyklische Polyazapolycarboxylat-Chelatoren bewährt. Bei dem mit DTPA derivatisierten Somatostatinanalogon Octreotide (Octreoscan[®]) handelt es sich um das erste klinisch etablierte peptidische Radiopharmakon zur *in vivo*-Darstellung von Tumoren (10,11). Der offenkettige Chelator DTPA ist der Chelator der Wahl zur Immobilisierung von ^{111}In . Häufig wird DTPA direkt über einen der Acetat-Seitenarme unter Ausbildung einer Amidfunktion an das Peptid gekoppelt und bildet mit ^{111}In einen 8-fach koordinierten Komplex.

Im Gegensatz zu ^{111}In sind jedoch die ^{90}Y markierten DTPA Konjugate *in vivo* zu instabil, sodass sich ein Teil der Aktivität in den Knochen akkumulieren kann (12-14).

Gegenüber ihren offenkettigen Analoga weisen makrozyklische Polyazapolycarboxylat-Chelatoren wie 1,4,7-Triazacyclononan-1,4,7-triessigsäure (NOTA), 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure (DOTA) und 1,4,8,11-Tetraazacyclo-tetradecan-1,4,8,11-tetraessigsäure (TETA) oft eine nochmals deutlich höhere Stabilität auf (Abbildung 5).

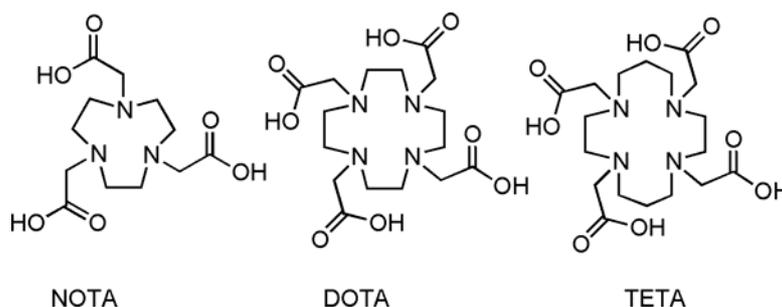


Abbildung 5: Strukturen von makrozyklischen Polyazapolycarboxylat-Chelatoren.

Bifunktionelle Versionen der Polyazapolycarboxylat-Chelatoren wurden hauptsächlich zur Kopplung an Biomoleküle von verschiedenen Arbeitsgruppen vorgestellt (15-19). Doch abgesehen von der hohen Stabilität und Inertheit der Metallkomplexe besitzen einige dieser Verbindungen, speziell die der kleineren Polyazapolycarboxylat-Makrozyklen NOTA und DOTA, oft den Nachteil einer langsameren Komplexbildung, die z.B. einem Einsatz mit kurzlebigen Radionukliden in der Radioimmunotherapie mittels markierter Antikörper oftmals entgegensteht (16,20-22).

Die besondere Stabilität makrozyklischer Komplexe scheint darauf zu beruhen, dass die Metallionen genau in den Hohlraum im Zentrum des jeweiligen Liganden passen. Dies hat zur Folge, dass viele dieser Chelatoren die Eigenschaft besitzen, selektiv für bestimmte Metallionen zu sein. Oftmals wird dabei jedoch die Flexibilität der makrozyklischen Systeme unterschätzt. So sind für die Komplexe von Tetraazamakrozyklen verschiedene Konformere möglich, die verschieden grossen Metallionen bevorzugen (23).

Die durchweg hohen Komplexstabilitäten der verschiedenen DOTA-Komplexe verschiedener di- und trivalenter Metallionen mit stark unterschiedlichen Ionenradien machen diesen Chelator attraktiv für radiopharmazeutische Anwendungen, z.B. in der Nuklearmedizin, wo $^{111}\text{In}/^{90}\text{Y}$ -DOTA an monoklonale Antikörper gekoppelt wurde (16,17,24), oder in der Kernspin-Tomographie (MRI), wo Gd-DOTA und Gd-DO3A heute routinemässig als Kontrastmittel eingesetzt werden (siehe Abschnitt 1.6).

1.2.3 Chelatoren für Technetium-99m

Für die meisten nuklearmedizinischen Anwendungen wird ^{99m}Tc als Radionuklid verwendet. Bei der radioaktiven Markierung von Peptiden mit ^{99m}Tc unterscheidet man zwischen drei verschiedenen Verfahren: **a.)** Direct Labeling Approach, **b.)** Prelabeling Approach und **c.)** Postlabeling Approach.

a.) Beim „Direct Labeling Approach“ kommen gewöhnlich Reduktionsmittel wie SnCl_2 oder Natriumdithionit zum Einsatz, um Disulfidbrücken zu freien Thiolfunktionen zu reduzieren, die dann in der Lage sind, Tc^{V} zu binden. Der Vorteil dieser Methode liegt in der einfachen Durchführbarkeit. Über die Koordinationssphäre des Tc^{V} Zentrums und die Anzahl der Donoratome ist jedoch relativ wenig bekannt. Die Nachteile dieser Methode sind allerdings nicht unerheblich, so lässt sich z.B. die Stabilität der ^{99m}Tc -Komplexe kaum beeinflussen. Somatostatinanaloga wie BIM-23014, RC-160 und Octreotide, die alle $(\text{Cys})_2$ -Disulfidbrücken enthalten, wurden auf diesem Weg markiert (25,26).

b.) Beim „Prelabeling Approach“ wird zuerst mit einem bifunktionellen Chelator ein ^{99m}Tc -Komplex ausgebildet. Dieser ^{99m}Tc -Komplex wird dann an ein Biomolekül, z.B. Protein oder Peptid gekoppelt. Der Hauptvorteil dieser Methode liegt darin, dass das Biomolekül keinen harschen Reaktionsbedingungen (Reduktion, Hitze etc.) ausgesetzt werden muss. Für die Forschung ist diese Methode sehr gut geeignet, da das Chelator-Peptid-Konjugat nicht zuvor synthetisiert werden muss und so in relativ kurzer Zeit die prinzipielle Darstellbarkeit eines ^{99m}Tc -Chelator-Peptid-Konjugats überprüft werden kann. Dieses Verfahren ist für den Einsatz im klinischen Alltag jedoch schwierig und zeitaufwendig und eignet sich nicht für eine Kitformulierung. Die Durchführbarkeit wurde an mehreren Beispielen veranschaulicht, z.B. mit dem zyklischen Glykoprotein IIb/IIIa Rezeptoragonisten (27).

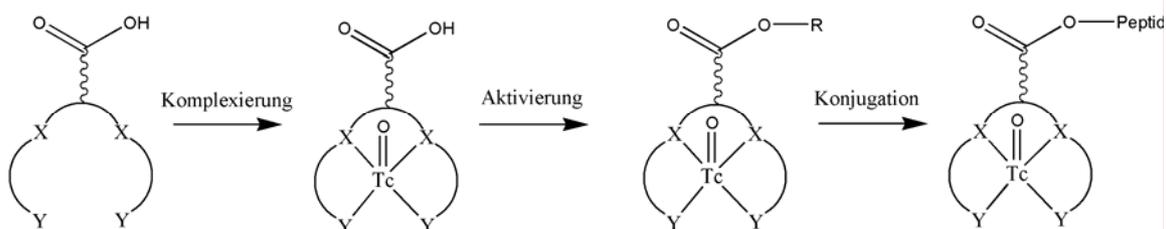


Abbildung 6: Schematische Darstellung des „Prelabeling Approach“.

c.) Beim „Postlabeling Approach“-Verfahren wird das ^{99m}Tc -Chelator-Peptid-Konjugat über einen zuvor eingeführten bifunktionellen Chelator mit anschließender Markierung hergestellt. Dieses Verfahren eignet sich am besten für die Kitformulierung und ist daher für den routinemässigen nuklearmedizinischen Alltag prädestiniert.

Zuerst wird der bifunktionelle Chelator an den C- oder N-Terminus oder auch über eine Peptidseitenkette an das Peptid gekoppelt. Nach der Aufreinigung werden dann zu den Aliquots des Chelator-Peptid-Konjugates die für die Markierung mit ^{99m}Tc notwendigen Reagenzien (Reduktionsmittel, Hilfsliganden, Puffer etc.) zugegeben und lyophilisiert (28). Da hohe spezifische Aktivitäten erreicht werden müssen, liegt das Hauptproblem bei diesem Verfahren in der Entwicklung bifunktioneller Chelatoren, die hochaffin und selektiv für ^{99m}Tc in den Oxidationsstufen 1-5 sind. Zusätzlich muss das ^{99m}Tc -Chelator-Peptid-Konjugat eine für die *in vivo*-Anwendung ausreichende kinetische und thermodynamische Stabilität aufweisen.

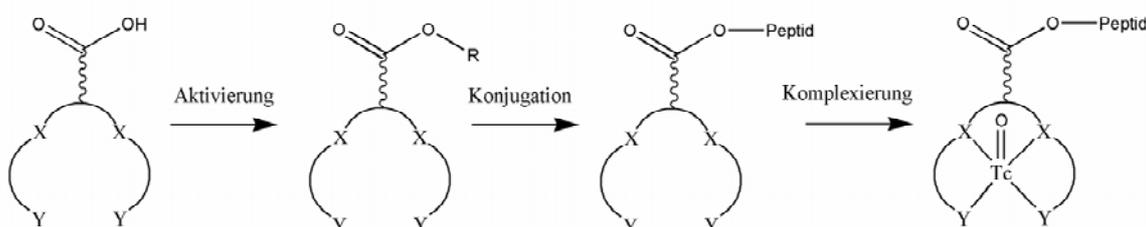


Abbildung 7: Schematische Darstellung des „Postlabeling Approach“.

Um diese Anforderungen zu erfüllen, wurde eine Reihe von bifunktionellen Chelatoren entwickelt. Hierbei handelt es sich um Chelatoren unterschiedlichen Typs: Propylendiamindioxim (PnAO) (29), azyklische (30) und makrozyklische Tetraamine (N_4) (31) und Triamidomonothiole (N_3S) (32).

Ein anderer Ansatz von hohem Interesse wird mit 2-Hydrazinonikotinsäure (HYNIC) verfolgt. Ursprünglich wurde HYNIC dazu verwendet, IgG mit ^{99m}Tc zu markieren, um Infektionsherde aufzuzeigen (33). Heute wird HYNIC häufig zur Markierung von Antikörpern und Peptiden verwendet (32). HYNIC wird über eine Carboxylgruppe mit dem N-Terminus des Peptids gekoppelt. Aufgrund der potentiellen Einzähnigkeit ist HYNIC besonders interessant (32,34-39), da es den Einsatz einer Vielzahl von Coliganden (27) erlaubt und sich die Bioverteilung (40) somit gezielt steuern lässt.

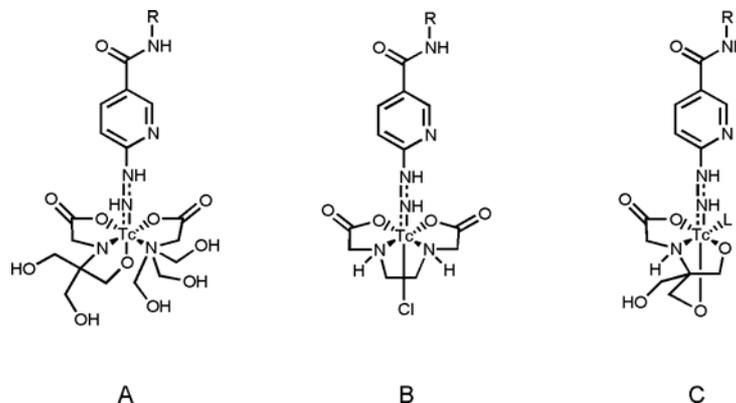


Abbildung 8: Strukturen von ^{99m}Tc -HYNIC-Komplexen mit verschiedenen Coliganden. A) $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{HYNIC})(\text{Tricin})_2]$, B) $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{HYNIC})(\text{EDDA})]$, C) $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{HYNIC})(\text{Tricin})(\text{L})]$.

Ein neuerer Ansatz verwendet Technetium-Carbonyle für die Markierung von Biomolekülen (41,42). Zuerst werden dabei 2- oder 3-zählige bifunktionelle Chelatoren an Peptide oder auch Antikörper gekoppelt, danach wird die aktive Spezies $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ zugegeben. Die drei Wassermoleküle werden durch den Chelator ersetzt und es bilden sich kinetisch sehr stabile Komplexe.

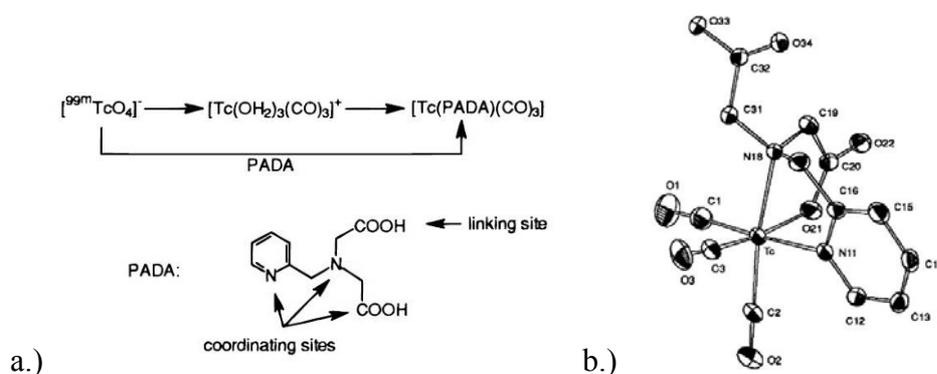


Abbildung 9: Beispiel einer Markierung mit ^{99m}Tc -Carbonyl (42): a.) Perotechnetat aus dem Generator wird zur aktiven Spezies $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ umgesetzt und weiter zum Produkt, b.) Kristallstruktur von $[\text{Tc}(\text{PADA})(\text{CO})_3]$ in der ORTEP-Darstellung (Ellipsoide entsprechen 30% Aufenthaltswahrscheinlichkeit).

1.3 Peptid-Rezeptor-Targeting

Peptide stellen wichtige Regulatoren von Wachstums- und Zellfunktionen in gesundem Gewebe und ebenso in Tumorgewebe dar. Die meisten Tumoren weisen häufig eine hohe Rezeptordichte für bestimmte Peptide auf und viele dieser Rezeptoren übertragen wachstumsregulierende Effekte *in vitro*. Einige Tumortypen sprechen auch *in vivo* auf wachstumshemmende bzw. wachstumsfördernde Signale solcher regulatorischer Peptide an, was heute sehr erfolgreich zur Krebsbehandlung genutzt wird. Wichtigstes Beispiel in diesem Zusammenhang ist sicherlich die Anwendung verschiedener Somatostatinanaloga, deren Rezeptoren von vielen neoplastischen Tumoren (über-) exprimiert werden.

Die Entwicklung, Tumoren durch „Peptide Receptor Targeting“ sichtbar zu machen, nahm ihren Anfang vor ca. 15 Jahren, als erstmals radioaktiv markierte Somatostatinanaloga in der Nuklearmedizin zur *in vivo*-Bildgebung humaner Tumoren mittels γ -Szintigraphie eingesetzt wurden.

Die Nuklearmedizin ist hauptsächlich eine diagnostische Disziplin, deren Stärke eher in der Fähigkeit der (patho-) physiologischen Bildgebung liegt als in der Fähigkeit, morphologische Informationen zu liefern. So werden radioaktiv markierte Analoga regulatorischer Peptide in der Nuklearmedizin zur Darstellung einer *in vivo*-Gewebecharakteristik verwendet. Ihr Einsatz, der immer noch auf eine limitierte Anzahl von Radiopeptiden beschränkt ist, stellt eine sehr effektive, wenig invasive und leicht anwendbare Methode dar, die eine schnelle Ganzkörper-Darstellung und Bewertung der Krankheitsausbreitung erlaubt (43-45). Unlängst wurden ebenfalls Radiopeptide zur Darstellung von Thrombosen (46,47) und Entzündungen (47-49) entwickelt.

Studien auf molekularer Ebene, welche ein erfolgreiches Rezeptor-Targeting vorangebracht haben, umfassen die *in vitro*-Identifizierung und Analyse der Rezeptoren mittels biochemischer, molekularbiologischer und immunologischer Techniken (50). Für die Typisierung hochaffiner Bindungsstellen und Erstellung eines pharmakologischen Profils

stellen Radiopeptid-Bindungsstudien respektive Bioassays an Zellen oder an Membranpräparationen die geeigneten Mittel dar. Anatomische Informationen über die Rezeptorverteilung im Gewebe werden anhand einer quantitativen Rezeptor-Autoradiographie gewonnen. Bei dieser Methode wird die Bindung von Radioliganden in Gewebeschnitten gemessen, was eine Lokalisation des Rezeptors in einem mikroskopischen Grössenbereich ermöglicht (51). Die Rezeptorverteilung und die zugehörigen regulatorischen Prozesse in den verschiedenen Tumoren werden häufig auf der mRNA-Ebene oder unter Zuhilfenahme spezifischer Antikörper analysiert (52).

Tabelle 2 fasst die von verschiedenen Autoren mittels unterschiedlicher Methoden ermittelten Peptidrezeptorverteilungen verschiedener Tumortypen zusammen und listet die zur Zeit in Zusammenhang mit dem Rezeptor-Targeting diskutierten Peptide auf.

Tabelle 2: Rezeptor-Expriemierung in verschiedenen humanen Tumoren

Liganden	Rezeptoren	Tumortypen
Somatostatin	Somatostatin-Rezeptorsubtypen sst1-5	Neuroendokrine Tumoren, [†] MTC, [‡] SCLC, Tumoren des Nervensystems, Lymphome (Non-Hodgkin's Lymphom, Hodgkin's disease)
VIP / PACAP	VPAC ₁ -, VPAC ₂ -, PAC ₁ -Rezeptoren	Verschiedene Adenocarcinoma (Magen, Darm, Pankreas, Lunge etc.)
CCK / Gastrin	CCK ₁ -, CCK ₂ -Rezeptoren	MTC, SCLC, Astrozytom, Ovariakarzinom
LHRH	LHRH-Rezeptoren	Mamma-, Prostatakarzinom
α -MSH	MSH-Rezeptoren	Melanom
Bombesin / GRP	BB ₁ -, BB ₂ -, BB ₃ - und BB ₄ -Rezeptoren	SCLC, MTC, Glioblastom, Colon-, Prostatakarzinom
Neurotensin	NTR1-, NTR2- und NTR3-Rezeptoren	Ewing Sarcom, Meningiom, MTC, Astrozytom, SCLC, Exokriner Pankreastumor
Opioid	Opioid-Rezeptor	SCLC, Neuroblastom, Mammakarzinom
Substanz P	NK1-Rezeptor	Glioblastom, Astrozytom, MTC, Mammakarzinom, Intra- und peritumorale Blutgefässe
GLP-1	GLP-1-Rezeptor	Insulinoma
Oxytoxin	Oxytoxin-Rezeptor	Endometrium, Mammakarzinom
Neuropeptid Y	NPY-Rezeptor Subtypen Y ₁ -Y ₆	Hirntumor, Mammakarzinom

[†]MTC (medullary thyroid cancer), [‡]SCLC (small cell lung cancer)

Das Prinzip des *in vitro*- und *in vivo*-Rezeptor-Targetings lässt sich wie folgt zusammenfassen: Ein Chelator, der die Immobilisierung eines Radiometalls sicherstellen soll, wird kovalent über einen Spacer an ein natürliches Peptid oder ein metabolisch stabilisiertes Peptidanalogen gekoppelt. Alternativ trägt das Peptid eine prosthetische Gruppe, die sich für die Markierung mit z.B. ^{123}I oder ^{18}F eignet. Für eine erfolgreiche *in vivo*-Anwendung müssen solche Konjugate jedoch verschiedene Anforderungen erfüllen:

- Das radioaktiv markierte Peptid darf seine Rezeptor-Bindungsaffinität nicht verlieren.
- Um eine rezeptorvermittelte Internalisierung zu gewährleisten, sollte es sich bei den eingesetzten Peptiden bevorzugt um Agonisten handeln.
- Die Komplexbildung des Radiometalls durch das Chelator-Peptid-Konjugat sollte mit möglichst hoher radiochemischer Reinheit (>95%) erfolgen.
- Das Radiopeptid sollte unter physiologischen Bedingungen eine hohe Stabilität aufweisen (Fragmentierung, Stabilität des Radiometall-Chelator-Komplexes).
- Das Radiopeptid sollte möglichst hydrophil sein und renal ausgeschieden werden können.

Wie bereits erwähnt, hat das Rezeptor-Targeting mit radioaktiv markierten Peptiden in den letzten Jahren an Bedeutung in der Nuklearmedizin gewonnen. Die wohl am häufigsten in der Klinik eingesetzten Peptide sind Analoga des natürlichen, regulatorischen Peptids Somatostatin. Ausserdem wurden radioaktiv markierte Analoga des α -Melanozyten stimulierenden Hormons (α -MSH) sowie von Neurotensin, Vasoactive Intestinale Peptide (VIP), Bombesin (BN), Substanz P (SP) und Gastrin/ Cholezystokinin (CCK) entwickelt und *in vitro* und *in vivo* bezüglich einer klinischen Anwendung getestet.

1.3.1 Somatostatinanaloga

Wegen der limitierten Effizienz und beträchtlicher Nebenwirkungen von herkömmlichen Chemotherapeutika werden im Kampf gegen Krebs neue zytotoxische Substanzen und auch

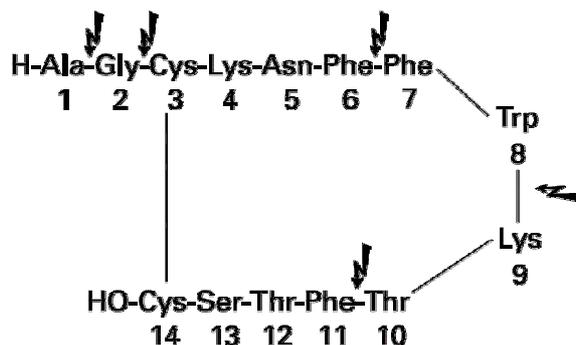


Abbildung 11: Enzymatischer Abbau von Somatostatin-14.

Der Bindungsbruch zwischen Trp⁸ und Lys⁹ führt zur kompletten Inaktivierung des Fragments. Ein Peptidaseangriff am N-Terminus oder die Kürzung der Sequenz um 1 bis 2 Aminosäuren führt zu keiner bedeutenden Veränderung der Aktivität von Somatostatin-14.

Um den enzymatischen Angriff zu verlangsamen, wurden nun systematisch L-Aminosäuren gegen D-Aminosäuren ausgetauscht, bei Trp⁸ führte dieser Austausch sogar zu einer erhöhten Aktivität. Weiter fand man heraus, dass die Positionen 6 bis 9 essentiell für die biologische Aktivität sind. Mit diesem Wissen wurden in vielen Forschungszentren Somatostatinanaloga hergestellt, einige der bekanntesten sind in Abbildung 12 aufgezeigt.

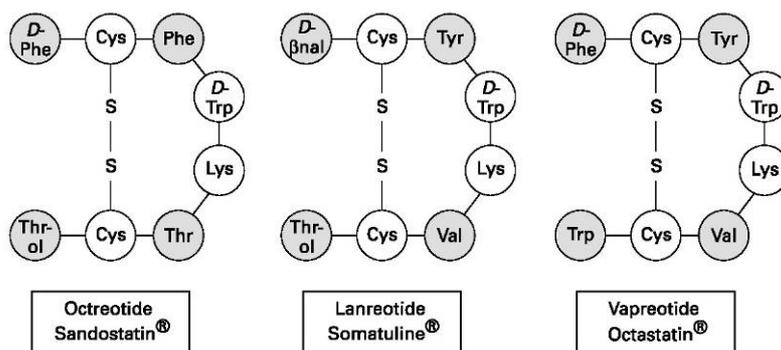


Abbildung 12: Strukturen einiger stabilisierter Somatostatinanaloga.

Im Vergleich zum nativen Somatostatin-14 wurde die Stabilität signifikant erhöht; die Einführung von D-Aminosäuren (D-Phe¹ bzw. D-βNal¹) am N-Terminus verhindert einen Angriff von Exopeptidasen; das gleiche gilt für Thr⁸(ol) am C-Terminus von Octreotide und Lanreotide. Bei der Inkubation mit Nierenhomogenat, einem System, das natürliche Peptide

innerhalb von Minuten degradiert, sind nach 20 h immer noch 90% der biologischen Aktivität von Octreotide vorhanden. Im Vergleich dazu sind nach weniger als einer Minute fast 100% Somatostatin-14 degradiert (55).

Somatostatin und dessen Analoga binden spezifisch an SRIF-Rezeptoren. Bisher sind 5 Rezeptorsubtypen charakterisiert worden, deren Nummerierung der Reihenfolge der Entdeckung entspricht: sstr1-sstr5 (somatostatin seven-transmembrane-domain receptor). In Abbildung 13 sieht man die Verteilung der Rezeptorsubtypen in verschiedenen Geweben.

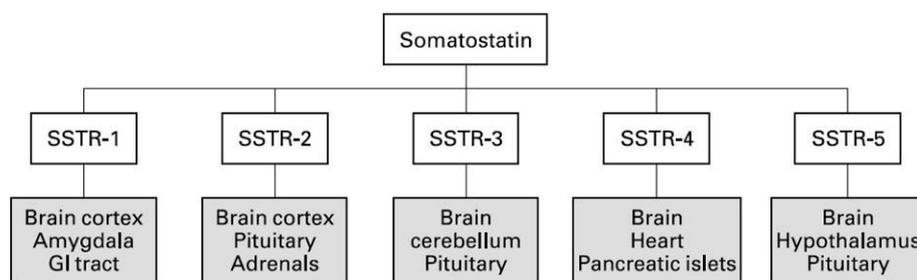


Abbildung 13: Rezeptorverteilung in verschiedenen Geweben.

Somatostatin bindet mit einer Affinität im nanomolaren bis subnanomolaren Bereich an alle 5 SRIF-Rezeptorsubtypen (sstr1-5), die aus humanem Gewebe kloniert wurden (56). SRIF, der im gesamten endokrinen System nachweisbar ist, besitzt eine Vielzahl regulatorischer, hauptsächlich inhibitorischer Funktionen. Unter anderem hemmt er die Ausschüttung von Wachstumshormonen, Glukagon, Insulin, Gastrin und anderen Peptidhormonen und spielt zusätzlich eine inhibitorische Rolle im Immunsystem. Ausserdem wirkt SRIF als neuronemodulierendes Peptid im Zentralnervensystem (57). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die meisten Tumoren, die von SRIF-Rezeptor-positivem Gewebe abstammen, ebenfalls eine hohe SRIF-Rezeptordichte aufweisen (58,59). Einige Somatostatinanaloga wurden klinisch erfolgreich in der Behandlung von Inselzelltumoren, Karzinoiden, Vipomen, Gastrinomen, Insulinomen und Glucagonomen eingesetzt, wobei die klinischen Symptome durch Hemmung der Hormonhypersekretion kontrolliert wurden.

Später kam die Idee auf, dass die SRIF-Rezeptordichte in vielen Tumoren hoch genug sei, um eine externe Bildgebung mittels γ -Szintigraphie zu ermöglichen und so einen Therapieerfolg einer Octreotide-, Lanreotide- oder Vapreotide-Therapie vorherzusagen. Bei der ersten Verbindung für die externe Bildgebung handelt es sich um ein ^{123}I -markiertes Tyr³-Octreotide (43). Um eine Markierung mit verschiedenen Radioisotopen zu ermöglichen, wurden in den letzten 10 Jahren zahlreiche modifizierte SRIF-Analoga entwickelt. Den Prototyp solcher Verbindungen stellt sicherlich [^{111}In -DTPA]-Octreotide (Octreoscan[®]) dar. Mit diesem Radioliganden wurde eine vernünftige Korrelation zwischen *in vitro*- und *in vivo*-Rezeptorexpressionen gefunden (Tabelle 3).

Tabelle 3: Vergleich der *in vitro*- und *in vivo*-Rezeptorexpression bei verschiedenen Tumoren.

Tumortyp	<i>in vivo</i> -Szintigraphie		<i>in vitro</i> -Rezeptor Status	
*GH-produzierender Hypophysentumor	7/10	70%	45/46	98%
†TSH-produzierender Hypophysentumor	2/2	100%		
Nicht funktioneller Hypophysentumor	12/16	75%	12/22	55%
Gastrinom	12/12	100%	6/6	100%
Insulinom	14/23	61%	8/11	72%
Glucagonom	3/3	100%	2/2	100%
Nicht-klassifiziertes ‡APUDom	16/18	89%	4/4	100%
Paragangliom	33/33	100%	11/12	92%
Medullärer Schilddrüsentumor	20/28	71%	10/26	38%
Neuroblastom	8/9	89%	15/23	65%
Phaeochromozytom	12/14	86%	38/52	73%
Carcionid	69/72	96%	54/62	88%
#SCLC	34/34	100%	4/7	57%

*GH (Growth Hormone); †TSH (Thyreoidase Stimulierendes Hormon); ‡APUD (Amine Precursor Uptake and Decarboxylation); #SCLC (small cell lung cancer).

Reubi et al. (50) haben einen Vergleich der *in vivo*-Rezeptorszintigraphie mit dem *in vitro*-Rezeptorstatus resektierter Tumoren derselben Patienten wie folgt zusammengefasst: „...eine ausgezeichnete Übereinstimmung wurde für Tumoren mit einer hohen Dichte und homogenen Verteilung der SRIF-Rezeptoren wie gastroenteropankretischen Tumoren (GEP), Meningiomen, Paragangliomen und Phaeochromozytomen gefunden. Andere Tumoren mit

einer niedrigeren Rezeptordichte, jedoch einer homogenen Verteilung wie Lymphome, Neuroblastome und Nierenzellkarzinome zeigten ebenfalls eine gute Übereinstimmung. Signifikante Unterschiede wurden für Mammakarzinome, kleinzellige Bronchialtumore (SCLC) und medulläre Schilddrüsenkarzinome (MTC) gefunden...“. Eine grössere Anzahl dieser Tumoren wurde im Gegensatz zu den *in vitro*-Studien *in vivo* szintigraphisch positiv befundet.

1.3.2 Indium-111- und Yttrium-90- markierte SRIF-Analoga

Die Diagnose und die Bestimmung der Ausdehnung (Staging) von neuroendokrinen Tumoren sind oftmals sehr schwierig und zeitaufwendig. Hormonmarker im Blut sind normalerweise erhöht und erlauben eine vage Diagnose, aber die Tumoren sind normalerweise klein und lassen sich mit Standarduntersuchungen wie Ultraschall (US) oder auch Computertomographie (CT) nicht richtig lokalisieren (60).

Somatostatinrezeptor-exprimierende Tumoren und deren Metastasen bilden geeignete Ziele für eine diagnostische Bildgebung mit γ -emittierenden Radiopeptiden. Die selektive Aufnahme der Radioaktivität ist proportional zur Dichte und Affinität der Rezeptoren.

Eines der ersten radioaktiv markierten Somatostatinanaloga zur Visualisierung von Somatostatinrezeptor-positiven Tumoren war [$^{123}\text{I-Tyr}^3$]-Octreotide (43,44). Trotz einer erfolgreichen Visualisierung von Somatostatinrezeptor-positiven Tumoren in mehr als 100 Patienten, zeigt diese Methode jedoch einige Nachteile, z.B. die limitierte Erhältlichkeit von chemisch reinem ^{123}I oder eine hohe Hintergrundstrahlung im Abdomen, aufgrund des hohen Leberuptakes des Radiopeptids. Darum wurden ^{111}In -markierte Somatostatinanaloga entwickelt. Unter diesen Derivaten zeigte [$^{111}\text{In-DTPA}$]-Octreotide die in etwa gleiche biologische Aktivität wie Octreotide selbst. Es wird hauptsächlich über die Nieren ausgeschieden und nach 24 h sind über 90% der Aktivität bereits wieder ausgeschieden. Wegen der relativ langen Halbwertszeit kann [$^{111}\text{In-DTPA}$]-Octreotide (Octreoscan[®]) als

Radiopharmakon zur Darstellung von Somatostatinrezeptor-tragenden Tumoren nach 24 bis 48 h eingesetzt werden.

Eine neue und faszinierende Anwendung von Radiopeptiden ist die sogenannte „Receptor Targeted Radiotherapy“. Der Erfolg dieser Methode hängt von der Konzentration des Radioliganden in der Zelle ab. Diese wiederum hängt von der Internalisierungsgeschwindigkeit, der Degradation und dem Recycling von Ligand und Rezeptor ab. Grundsätzlich bindet ein Peptid zuerst an die Oberflächen Rezeptoren der Zelle und wird als Ligand-Rezeptor-Komplex in die Zelle internalisiert (61). Das resultierende intrazelluläre Vesikel gelangt in die Endosomen, wo durch den tiefen pH der Ligand-Rezeptor-Komplex dissoziiert wird. Der Ligand wird danach wahrscheinlich in die Lysosomen transportiert und der Rezeptor rezykliert. Dieser ganze Prozess dauert etwa 15 min und ermöglicht so eine hohe Internalisierungsrate (62).

Für eine Radiotherapie von Somatostatinrezeptor-positiven Tumoren ist eine Rezeptor-gesteuerte Endozytose der Somatostatinanaloge zwingend notwendig. Humane neuroendokrine Tumorzellen internalisieren [^{111}In -DTPA]-Octreotide, jedoch ist dieses Chelator-Peptid-Konjugat und das Radioisotop ^{111}In (Auger-Emitter) für die Radiotherapie nicht sehr geeignet. Da die Komplexe von DTPA-Octreotide mit α - bzw. β -Emittern *in vivo* nicht stabil sind, wird der makrozyklische Chelator DOTA verwendet. DOTA bildet kinetisch stabile Komplexe mit ^{111}In , ^{90}Y und anderen Radioisotopen (63), ohne die biologischen Eigenschaften negativ zu beeinflussen. De Jong et al. (64) zeigten, dass [^{90}Y -DOTA]-Tyr³-Octreotide bei Somatostatinrezeptor-positiven Pankreas-Tumorzellen besser internalisiert als [^{111}In -DOTA]-Tyr³-Octreotide und [^{111}In -DTPA]-Octreotide (um den Faktor 1.8 bzw. 3.5). Neben einer hohen Bindungsaffinität zu sst2 zeigt [^{90}Y -DOTA]-Tyr³-Octreotide auch eine schnelle Auswaschung aus dem Blut ($t_{1/2} < 5$ min) und eine hohe Akkumulierung in sst2-Tumoren, was diese Substanz zu einem geeigneten Radiotherapeutikum macht.

1.3.3 Technetium-99m-markierte SRIF-Analoga

1.3.3.1 Technetium-99m

In der diagnostischen nuklearmedizinischen Anwendung stellt ^{99m}Tc das wichtigste Radionuklid dar; über 85% aller in der Klinik eingesetzten Radiopharmaka (65) basieren auf ^{99m}Tc . Die Gründe hierfür liegen in der vorteilhaften radiophysikalischen Charakteristik, der guten Verfügbarkeit und Kosteneffizienz. Die Halbwertszeit von 6.02 h ist ideal für die meisten Anwendungen und entspricht der biologischen Halbwertszeit der meisten Pharmaka. Dies gilt insbesondere für kleine Peptide, die eine rasche Blutclearance und Lokalisation des Zielgewebes aufweisen. Die Halbwertszeit ist kurz genug, um höhere Dosen applizieren zu können, welche eine hohe Bildqualität ermöglichen. Die Photonenenergie von 141 keV ist ausreichend hoch, so dass einerseits die Strahlung auch dickere Körperschichten durchdringen kann, andererseits braucht man nicht allzu dicke Bleiabschirmungen für den Strahlenschutz (Halbwertsdicke von Blei für ^{99m}Tc : 0.25 mm): dies sind die optimalen Voraussetzungen für die γ -Szintigraphie.

Der $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ -Generator stellt das bedeutendste Generatorsystem auf diesem Gebiet dar, bietet er doch die Möglichkeit, kurzlebige Radionuklide, die für den Versand nicht geeignet wären, dennoch generell verfügbar zu machen. Dabei wird der radioaktive Gleichgewichtszustand zwischen Mutter- und Tochternuklid vorteilhaft genutzt, indem die kurzlebige Tochteraktivität erst in der Klinik von dem längerlebigen Mutternuklid durch Elution abgetrennt wird.

Das Generatorsystem (Abbildung 14) besteht im Prinzip aus einer kleinen Glassäule, die mit einem Ionentauscher (Al_2O_3) gefüllt ist, an welchem das Mutternuklid (^{99}Mo als $^{99}\text{MoO}_4^{2-}$) adsorbiert ist. Die Ionentauschersäule befindet sich in einer massiven Bleiabschirmung. Durch das Aufsetzen eines evakuierten Injektionsfläschchens wird das ^{99m}Tc als Pertechnetat

($^{99m}\text{TcO}_4^-$) mittels physiologischer NaCl-Lösung in einer Konzentration von 10^{-6} - 10^{-7} M eluiert.

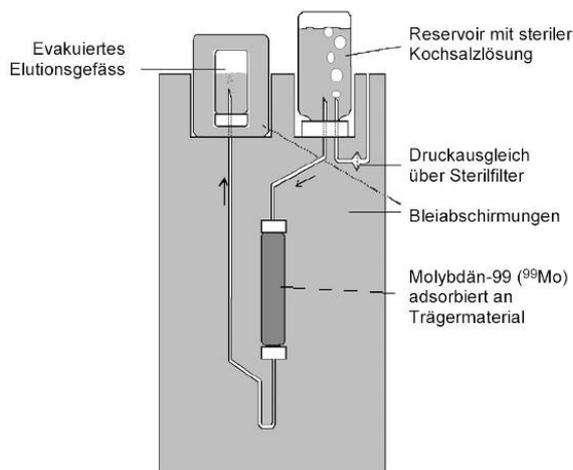


Abbildung 14: Schematische Darstellung eines $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ -Generators.

Das $^{99m}\text{TcO}_4^-$ liegt im Eluat in sehr geringen Mengen vor ($37 \text{ MBq} \sim 2 \cdot 10^{-10} \text{ g}$) und ist nicht trägerfrei, da es ^{99}Tc enthält, das sowohl durch den Zerfall des Mutternuklids als auch des Tochternuklids entsteht.

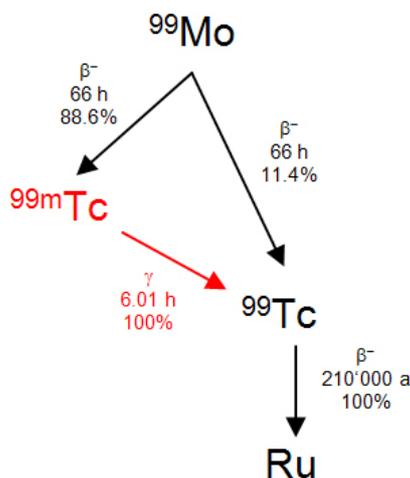


Abbildung 15: Zerfallsreihe von Molybdän-99 zu Ruthenium.

Die meisten Radiopharmaka benutzen ^{99m}Tc in der Oxidationsstufe 5 oder tiefer. Darum muss das $^{99m}\text{TcO}_4^-$ zur Markierung von Molekülen in die benötigte Oxidationsstufe reduziert werden. Dazu werden häufig $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, SnCl_2 , Phosphine oder auch Zn verwendet. Ein

Problem bei einer späteren Kit-Anwendung ist der Gehalt an Reduktionsmittel; einerseits muss erreicht werden, dass sämtliches Pertechnetat zur richtigen Oxidationsstufe reduziert wird, andererseits gilt es zu vermeiden, dass das Pertechnetat zu einer zu tiefen Oxidationsstufe reduziert wird. In wässrigen Lösungen bildet sich bei der Reduktion mit Zinn-II-Salzen durch Hydrolyse leicht TcO_2 (hydr). Dieses Technetiumoxid tritt häufig als kolloidale Verunreinigung bei $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Radiopharmaka auf.

Als ihm entsprechende Therapienuklide („matched pair“) sind dem $^{99\text{m}}\text{Tc}$ zwei Rheniumisotope zur Seite gestellt. Bis auf den Umstand, dass Re inerter gegenüber Substitution ist und in den meisten Oxidationsstufen ein niedrigeres Redoxpotential aufweist, besitzen Technetium und Rhenium durchaus vergleichbare chemische Eigenschaften. Sowohl ^{186}Re und ^{188}Re sind β^- -Emitter, die zudem eine γ -Emission aufweisen. Letzteres ist von besonderem Interesse, da es mittels $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ -Generatoren kostengünstig mit einer hohen spezifischen Aktivität produziert werden kann.

1.3.3.2 Technetium-99m-SRIF-Analoga

Obwohl [^{111}In -DTPA]-Octreotide sich in der Klinik als hocheffizient erwiesen hat, haben mehrere Arbeitsgruppen an der Entwicklung $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -markierter SRIF-Analoga gearbeitet. Ein anfänglicher Versuch stellte die Direktmarkierung dar: In Analogie zur Markierung von Antikörpern wurde dabei die $(\text{Cys})_2$ -Disulfid-Brücke von Octreotide und Vapreotide durch Reduktion geöffnet, um dadurch hochaffine Bindungsstellen zur Komplexierung von $^{99\text{m}}\text{Tc}$ oder $^{186/188}\text{Re}$ zu erzeugen (25,26). Die so erhaltenen Radiopeptide zeigten jedoch eine ungünstige Bioverteilung mit einer niedrigen Tumoranreicherung. Ausserdem wurde das Radiopeptid hauptsächlich über die Leber und den Gastrointestinaltrakt ausgeschieden.

Weiterführende Entwicklungen resultierten in einem hydrophilen Tetramin-Derivat (29), das unter relativ milden Bedingungen mit spezifischen Aktivitäten von über 370 GBq/ μmol markiert werden kann. [$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -N₄]-Octreotide besitzt eine hohe Affinität zu den SRIF-

Rezeptoren und zeigt eine hohe und spezifische Anreicherung in SRIF-Rezeptor-positivem Gewebe. Das Radiopeptid wird renal ausgeschieden und weist eine viel niedrigere Leberaufnahme und vorteilhaftere Bioverteilung auf. Allerdings wurden diese Vorteile in einer Patientenstudie im Vergleich mit Octreoscan® nicht bestätigt.

Der Weg über die Postkonjugations-Markiermethode, bei welcher der bifunktionelle Chelator vor der Markierung an das Biomolekül gekoppelt wird, wurde ebenfalls von der Firma Diatide Inc. eingeschlagen. In einer Studie wurden Struktur-Wirkungsbeziehungen verschiedener carbozyklischer Hexapeptide untersucht, die mit hoher Stabilität ^{99m}Tc komplexieren können und eine hohe Affinität zu SRIF-Rezeptoren haben. Als eine der besten Substanzen stellt sich P829 (Abbildung 16) heraus.

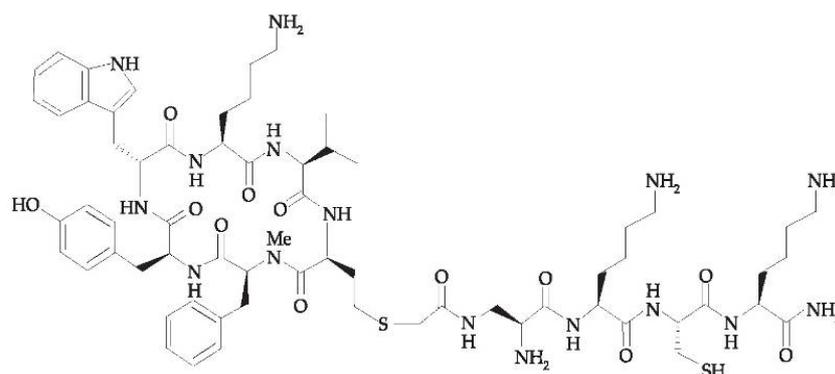


Abbildung 16: Strukturformel von P829 (Depreotide/ NeoTect®).

In einem tumortragenden Tiermodell zeigte ^{99m}Tc -P829 im Vergleich zu Octreoscan® die besseren Resultate. In einer Dual-Tracer-Studie (Koinjektion der beiden Radiopeptide) zeigte ^{99m}Tc -P829 eine höhere Tumoranreicherung als Octreoscan® und die rezeptorspezifischen Organe konnten durch vorausgehende Injektionen von nicht markiertem Octreotide blockiert werden (66). Gemäss Virgolini et al. (67) besitzt ^{99m}Tc -P829 Affinitäten zu den Rezeptorsubtypen sst2, 3 und 5 und wird in klinischen Studien (68) unter anderem zur Szintigraphie von Lungenkrebs eingesetzt (67).

Béhé et al. (35,36) und Decristoforo et al. (69,70) synthetisierten eine Reihe von ^{99m}Tc -HYNIC-markierten Octreotide-Derivaten. HYNIC-TOC wurde mit hoher spezifischer

Aktivität markiert, als Coliganden wurden Tricine, Ethylendiamin-N,N'-diessigsäure (EDDA) und Tricine/Nicotinsäure verwendet. Alle ^{99m}Tc -markierten HYNIC-Peptide zeigten eine hohe Affinität zum Somatostatinrezeptor ($K_D < 2.65 \text{ nM}$). Die Proteinbindung und Internalisierungsraten variierten mit den verwendeten Coliganden. Der spezifische Uptake im Tumor (AR4-2J-tumortragende Mäuse) beträgt zwischen 5.8% und 9.6% der injizierten Dosis im Vergleich zu 4.3% für Octreoscan[®] (39). Verschiedene Tierstudien (35) und auch Patientenstudien (34,38,71) bestätigten den hohen spezifischen Tumouruptake, die schnelle Auswaschung aus dem Blut und die Ausscheidung durch die Nieren. Dies macht [^{99m}Tc /EDDA/HYNIC]-TOC zu einer viel versprechenden Alternative zu Octreoscan[®] (Abbildung 17).

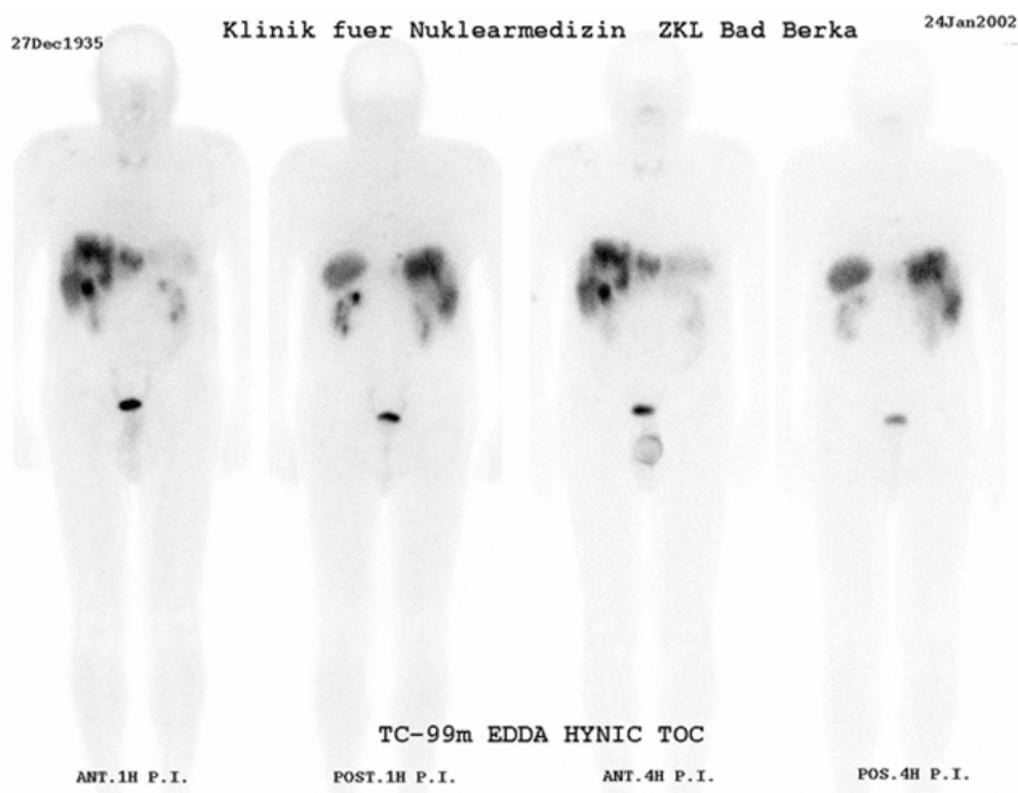


Abbildung 17: Ganzkörperszintigramm eines Patienten mit [^{99m}Tc /EDDA/HYNIC]-TOC. Bild von R. Baum, Bad Berka.

1.4 Trifunktionelle Peptide

Es ist bekannt, dass sich chemotherapeutische Substanzen und Toxine kovalent an verschiedene Trägermoleküle binden lassen, wie zum Beispiel an Peptide oder Antikörper, welche dann an Rezeptoren von Tumorzellen binden können (72). Dies bildet die Grundlage für das „receptor targeted diagnostic imaging“ und für die „receptor targeted therapy“.

Mit dem Ansatz, trifunktionelle Peptide herzustellen, besitzt man die Möglichkeit, die Effizienz und Eigenschaften der Radiopharmaka zusätzlich verändern zu können.

Trifunktionelle Peptide (Abbildung 18) bestehen aus einer Vektorfunktion, die für das „Targeting“ an die Tumorzelle zuständig ist und einer Signalfunktion, die z.B. aus einem Chelator besteht, der sich zur Komplexierung verschiedenster Radionuklide eignet. Die dritte Funktion kann verschiedene Eigenschaften besitzen:

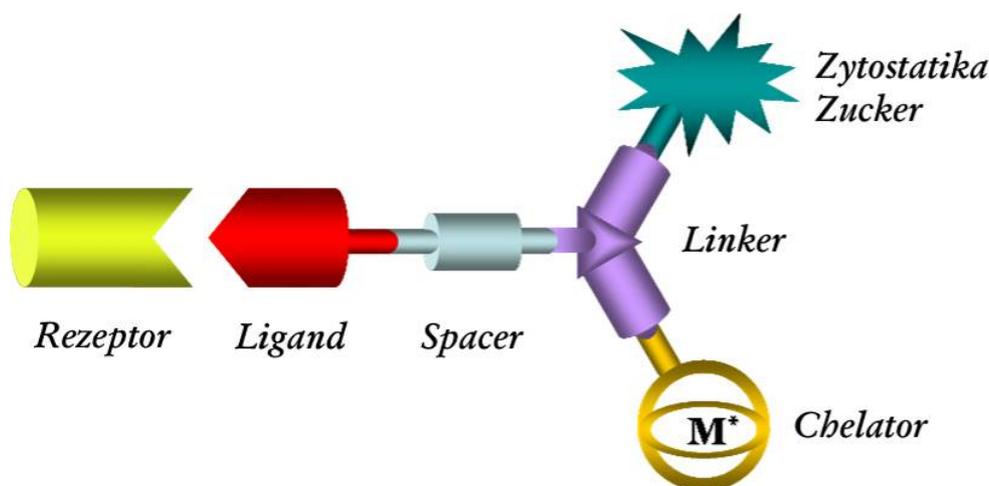


Abbildung 18: Schematische Darstellung eines trifunktionellen Peptids.

a.) Zytostatische Reagenzien, Substanzen, die das Zellwachstum hemmen, wie zum Beispiel Methotrexat oder Doxorubicin können als mögliche dritte Funktion eingeführt werden. Ein solches Radiopharmakon kann die zytostatische Funktion selektiv in die Tumorzellen bringen und diese dann zerstören. Gesunde Zellen besitzen nur eine spärliche Anzahl dieser Rezeptoren und werden darum kaum angegriffen (73). Wie bei der gezielten Radiotherapie eignen sich die Somatostatinrezeptoren, um gezielt Chemotherapeutika in sstr-

exprimierende Tumoren zu bringen. Im Moment liegt der limitierende Faktor bei den Somatostatinanaloga, welche hauptsächlich sst2- und sst5-exprimierende Tumoren angreifen. Studien (74,75) haben gezeigt, dass zytotoxische Derivate im Vergleich zu ihren Ausgangssubstanzen weniger giftig sind, dafür aber effektiver in ihrer inhibitorischen Funktion des Tumorwachstums.

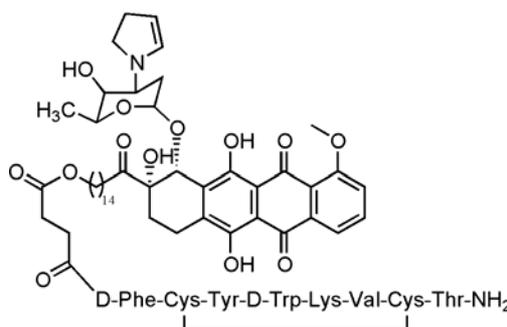


Abbildung 19: Strukturformel eines zytostatischen Somatostatinanalogons (75).

b.) Auch Radiosensitizer können als dritte Funktion eingeführt werden. Diese erhöhen die Strahlensensitivität der Tumorzellen und unterstützen somit eine therapeutische Anwendung mit Radionukliden.

c.) Cisplatin wirkt als Zytostatikum und koppelt an die DNS und RNS, es hemmt die Reproduktion und führt die Tumorzellen in den kontrollierten Zelltod (Apoptose).

Cisplatin wird intravenös verabreicht und verteilt sich über den Blutkreislauf im Körper. Wegen der relativ hohen Chlorid-Ionenkonzentration (~100 mM) im Blut wird eine Hydrolyse von Cisplatin verhindert. Ein limitierender Faktor für diese Anwendung ist die ungenügende Aufnahme von Cisplatin-Molekülen in die Zellen. Die Aufnahme von Cisplatin in die Zelle zeigt keine pH-Abhängigkeit und es gibt keine Substanzen, die einen Uptake verhindern können, d.h. dass Cisplatin mittels passiver Diffusion in die Zelle gelangt und es keine aktiven Transportmechanismen gibt. Einmal in der Zelle, wird aufgrund der niedrigen Chlorid-Ionenkonzentration (~20 mM) die Hydrolyse vereinfacht und man erhält die aktive Spezies $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{OH}_2)]^+$, die mit den Targets (DNS, RNS, Membranphospholipide, Mikrofilamente) reagieren kann (76).

In den letzten Jahren wurde nun versucht, die Cisplatin-Komplexe zu modifizieren und zu optimieren. Dazu wurden die Pt-Komplexe an Doxorubicin, Östrogen Analoge, Zucker und an diverse Aminosäuren gekoppelt. Allgemein ergaben diese Pt-Verbindungen interessante Resultate, aber das tatsächliche Potential ist noch nicht bekannt und muss erst klinisch erforscht werden (77).

d.) Durch die Verwendung von verschiedensten Zucker-Derivaten (Zuckeraminosäuren) ergeben sich verbesserte pharmakokinetische Eigenschaften von Radiopharmaka. Die Zuckerderivate können auf unterschiedliche Weise in die bestehenden Radiopharmaka eingebaut werden (Abbildung 20); einerseits als Grundgerüst der Substanz oder andererseits als sogenannte „building blocks“ in Form von Zuckeraminosäuren (78).

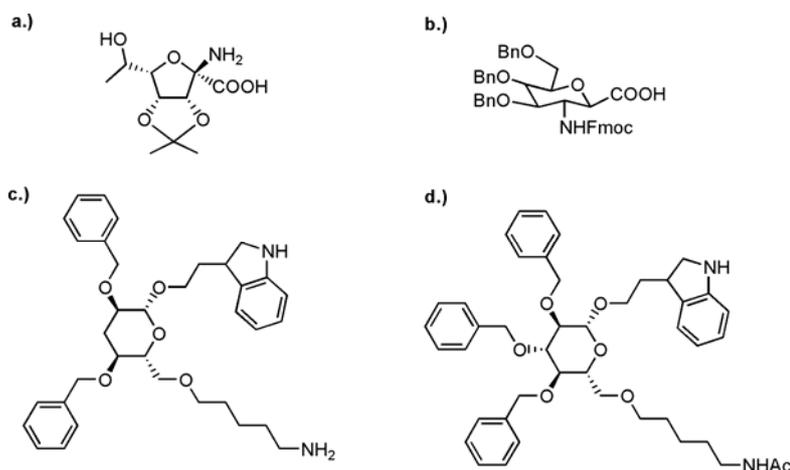


Abbildung 20: Beispiele für Zuckerderivate. a.) Furanose-Zuckeraminosäure, b.) Pyranose-Zuckeraminosäure, c.) Somatostatinantagonist ($IC_{50} = 5 \mu M$), d.) NK-1-Rezeptorantagonist ($IC_{50} = 60 nM$) (78).

Zu den Grundvoraussetzungen eines Radiopharmakons gehören ein gutes Tumor-zu-Organ-Verhältnis, rasche Auswaschung aus dem Blut, renale Ausscheidung, hohe Rezeptoraffinität und Modifikationen, die kompatibel sind mit der Strategie des Markierens.

Schottelius et al. (79) haben drei verschiedene Zucker-Derivate miteinander verglichen, die an [¹²⁵I-Tyr³]-Octreotide gekoppelt sind. Alle drei Derivate zeigten eine verbesserte Pharmakokinetik und wurden schnell aus dem Blutkreislauf über die Nieren ausgewaschen, ohne den Nierenuptake zu erhöhen. Die Anreicherung in der Leber und der Galle wurde

reduziert und das Verhältnis von Tumor-zu-Nichttumorgewebe minimiert. Besonders die Glucose- und Maltose-Derivate bilden die Basis für neue vielversprechende Peptid-Rezeptor-Liganden zur Therapie von Somatostatinrezeptor-positiven Tumoren. Wester et al. (80) haben mit ihrem Maltotriose-Derivat erfolgreich schon erste Patientenstudien durchgeführt.

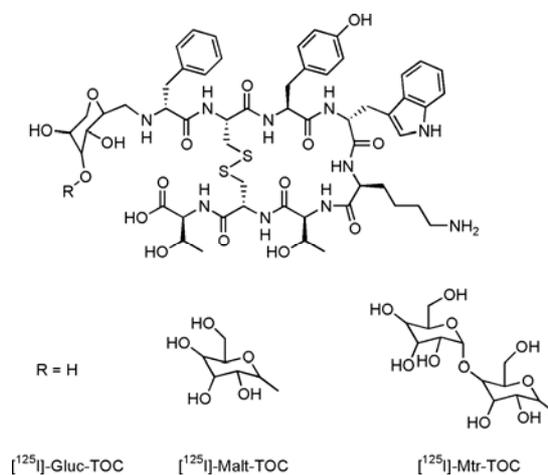


Abbildung 21: Strukturen von verschiedenen Zuckerderivaten (80) an $[^{125}\text{I-Tyr}^3]\text{-TOC}$.

1.5 Multi-DOTA-SRIF-Analoga

Zur Darstellung von SRIF-Tumoren wird in der Nuklearmedizin Octreoscan[®] verwendet. Dieses SRIF-Analogon zeigt eine hohe Sensitivität in der Darstellung von Primärtumoren, von metastasierenden endokrinen Pankreastumoren und Karzinoiden (81,82). Da ^{111}In Auger-Elektronen emittiert, kann Octreoscan[®] auch zur internen Radiotherapie verwendet werden (83-86). Im Allgemeinen ist aber ein Auger-Emitter mit kurzer Reichweite nicht die beste Wahl für die Therapie von grösseren Tumoren. Hierfür besser geeignet sind Isotope wie ^{90}Y , (β^- -Emitter), aber auch ^{177}Lu (β^- - und γ -Emitter) (Tabelle 1) (87). Der Chelator DTPA bildet jedoch mit ^{90}Y und ^{177}Lu nicht genügend stabile Komplexe, darum wird DTPA durch DOTA ersetzt. DOTA bildet kinetisch inerte Komplexe und verhindert so eine mögliche Aufnahme von nicht-komplexiertem ^{90}Y ins Knochenmark der Patienten.

Im aktuellen klinischen Protokoll am Universitätsspital Basel (53,88-91) werden den Patienten in zwei Behandlungen innerhalb von 8 Wochen jeweils 3'700 MBq [^{90}Y -DOTA]-TOC pro m^2 Körperoberfläche appliziert. Gegenüber den alten Protokollen, wo die Hälfte der Dosis in 4 Applikationen angewendet wurde (92), zeigt das neue Protokoll deutlich bessere Resultate.

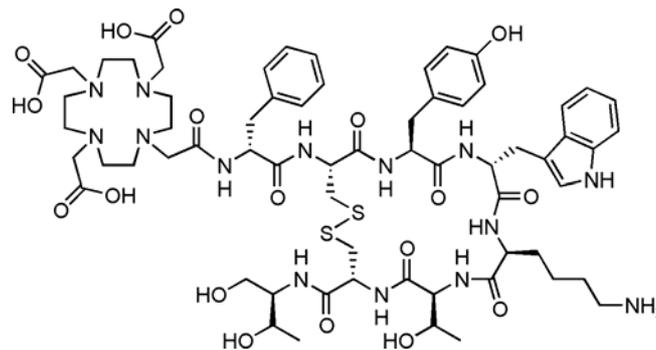


Abbildung 22: Strukturformel von DOTATOC. Dieses DOTA-modifizierte SRIF-Analogon kann mit verschiedenen Radioisotopen (^{111}In , ^{68}Ga , ^{90}Y , ^{177}Lu) markiert werden und dient zur Darstellung von neuroendokrinen Tumoren und zur internen Radiotherapie. Diese Substanz wird am Universitätsspital Basel als Goldstandard eingesetzt (53,89).

Die spezifische Aktivität des aktuellen Protokolls beträgt etwa 30-37 GBq ^{90}Y pro μmol Peptid, dies entspricht einem komplexierten Chelator pro 50-60 nicht komplexierten beziehungsweise freien Chelatoren. Bei einer applizierten Menge von 7'400 MBq mit 220 μg DOTA-TOC pro Patient sind entsprechend 210 μg nicht markiertes Peptid. Diese niedrige spezifische Aktivität kann eine teilweise Sättigung der Rezeptoren durch einen Überschuss an nicht-komplexiertem Peptid herbeiführen, was in einem suboptimalen Tumoruptake resultiert. Um die spezifische Aktivität deutlich zu erhöhen, gibt es die Möglichkeit, an ein Peptid mehrere Chelatoren zu koppeln. Dies kann sehr wichtig sein, wenn man anstelle von SRIF-Analogen bioaktive Peptide wie VIP (45), Substanz P (93-95) oder Bombesin (96,97) verwendet. Diese Peptide zeigen oft schon Nebenwirkungen, wenn sie in μg -Mengen eingesetzt werden. Bei Somatostatin liegt diese Menge im mg Bereich (98,99).

Pauwels et al. zeigten bei ihren Versuchen mit [^{86}Y -DOTA]-TOC, dass bei der Koinjektion von verschiedenen Mengen an nicht markiertem Peptid (10 μg , 50 μg und 250 μg) der

Tumoruptione signifikant abnimmt. Van de Wiele et al. (97) studierten die Bioverteilung und Kinetik von ^{99m}Tc -markierten Bombesinanalogen in Menschen. Um eine sichere Applikation zu garantieren, wurde das markierte Peptid vom nicht markierten Peptid getrennt. Dieselbe Prozedur wurde auch auf ^{123}I -markierte VIP-Analoga (45,100) und die Substanz P (95) angewendet.

Zusätzlich haben Breeman et al. (101) mit Octreoscan und de Jong et al. (102) mit [^{111}In -DOTA]-TOC gezeigt, dass der Uptake im Tumor und in densstr-positiven Organen abhängig ist von der applizierten Menge Peptid, was eindeutig zeigt, dass die spezifische Aktivität eine wichtige Rolle spielt.

1.6 MRI-Kontrastmittel

Innerhalb der letzten Jahrzehnte entwickelte sich das MRI (Magnetic Resonance Imaging) zu einer der wichtigsten Techniken der diagnostischen klinischen Medizin und biomedizinischen Forschung (103). Die MRI-Methode setzt den Körper keiner ionisierenden Strahlung aus und wird hauptsächlich verwendet, um anatomische Aufnahmen zu machen; sie gibt aber auch Auskunft über dynamische und phänomenologische Effekte im Körper. Da sich die Standard-MRI-Technik auf das Signal von Protonen bezieht, ist es möglich, die Protonendichte in wässrigem Milieu zu messen. Normalerweise sind die Protonendichteunterschiede in den verschiedenen Medien gering. MRI-Kontrastmittel bestehen aber aus paramagnetischen Metallionen Mn^{II} , Fe^{III} oder Gd^{III} , die die Relaxationszeiten der Protonen reduzieren und dadurch diese Unterschiede wesentlich verstärken. Heutzutage werden etwa 30% aller MRI-Untersuchungen mit einem Kontrastmittel durchgeführt (siehe Abbildung 23).

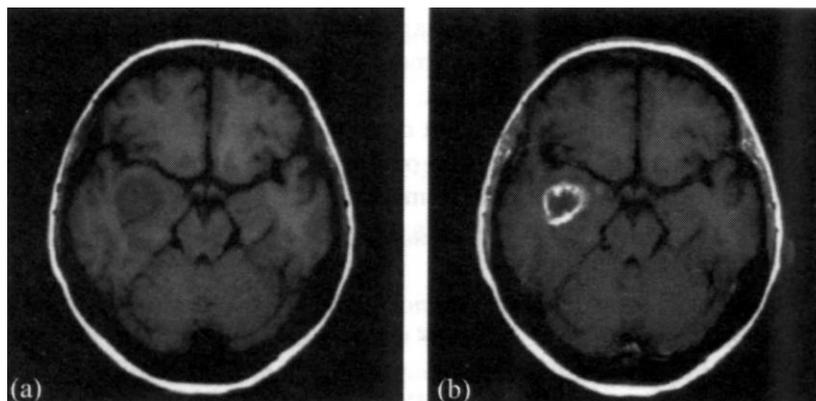


Abbildung 23: Einfluss eines T_1 -gewichteten MRI-Kontrastmittels bei der Darstellung einer Hirnläsion. a.) pre-contrast, b.) post-contrast.

Um neue, Erfolg versprechende Kontrastmittel zu entwickeln, die eine höhere Auflösung der MRI-Bilder ermöglichen, sucht man nach Substanzen mit einer möglichst hohen Relaxivität. Theoretische Studien haben ergeben, dass es möglich sein sollte, eine Relaxivität von $r_1=100-200 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ pro Gadolinium zu erreichen. Zum Vergleich: ein gängiges MRI-Kontrastmittel $[\text{Gd}(\text{DOTA})(\text{H}_2\text{O})]^-$ hat einen Wert von $r_1=4.74 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Die Anwendung von kontrasterhöhenden Substanzen wurde zu einem integralen Teil des MRI. Derzeit erhältliche Kontrastmittel können entsprechend ihrem magnetischen Verhalten, der Bioverteilung und dem Effekt auf dem Bild eingeteilt werden. Eine wichtige Gruppe von Kontrastmitteln sind die *paramagnetischen Reagenzien*, das sind Substanzen mit Metallionen, die ein oder mehrere ungepaarte Elektronen besitzen, dadurch paramagnetisch sind und ein permanentes magnetisches Moment besitzen. Organische freie Radikale sind auch paramagnetisch, weil sie eine ungerade Zahl an Valenzelektronen besitzen. In wässriger Lösung gibt es eine dipolare magnetische Wechselwirkung zwischen dem elektronisch-magnetischen Moment von paramagnetischen Atomen und dem viel kleineren magnetischen Moment der Protonen der umliegenden Wassermoleküle. Zufällige Fluktuationen dieser dipolaren magnetischen Interaktionen, hauptsächlich durch Molekülbewegungen verursacht, reduzieren die longitudinale (T_1) und transversale (T_2) Relaxationszeit der Wassermoleküle. Gadolinium (Gd^{III} , f^7) und Mangan (Mn^{II} , d^5) sind paramagnetische Ionen, die für das MRI

verwendet werden können. Sie können in ihrer ionischen Form nicht als Kontrastmittel verwendet werden wegen ihrer unvorteilhaften Bioverteilung und der relativ hohen Toxizität. Durch die Bindung der Metallionen an Liganden werden Chelate gebildet mit einer besseren Bioverteilung und einer vernachlässigbaren Toxizität.

1.6.1 Relaxivität von Gadolinium-(III)-Komplexen

Gadolinium-(III)-Komplexe sind die am meisten verwendeten Kontrastmittel im klinischen Alltag. Gd^{III} besitzt 7 ungepaarte Elektronen und ist das Metallion, welches in seinem Grundzustand das höchste paramagnetische Moment aufweist.

Die Grundlagen der Relaxation in Anwesenheit von paramagnetischen Substanzen wurden von Bloembergen, Solomon und anderen (104,105) entwickelt. Grundsätzlich geht es darum, dass Gd^{III} -Komplexe die Relaxationsraten der Lösungsmittelkerne (longitudinal ($1/T_1$) und transversal ($1/T_2$)) erhöhen.

Die paramagnetische Relaxation der Wassermoleküle entsteht durch die Dipol-Dipol-Interaktion zwischen dem Kernspin und dem fluktuierenden lokalen magnetischen Feld des MRI-Geräts, verursacht durch die ungepaarten Elektronen. Das magnetische Feld um das paramagnetische Zentrum verschwindet mit zunehmendem Abstand. Darum ist es entscheidend, die Protonen in unmittelbare Nähe des Metallions zu bringen. Für Gd^{III} -Komplexe bedeutet dies, die Wassermoleküle in die erste Koordinationssphäre des Metallions zu bringen. Diese „inner sphere“- H_2O -Moleküle werden mit den umliegenden Wassermolekülen ausgetauscht und geben so den paramagnetischen Effekt weiter. (Abbildung 24).

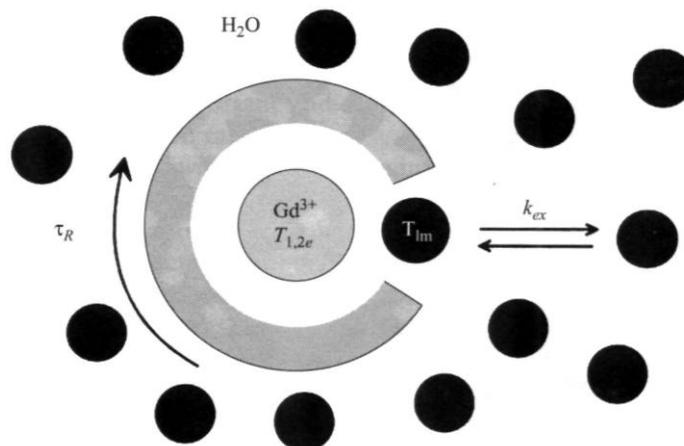


Abbildung 24: Schematische Darstellung eines Gd^{III} -Chelats mit einem „inner sphere“-Wassermolekül und umgebenden Wassermolekülen; τ_R entspricht der Rotationskorrelationszeit des Moleküls, k_{ex} der Wasser/Proton-Austauschrate und $1/T_{1,2e}$ der Relaxationsrate des Gd^{III} -Elektronenspin (106).

Die äusseren Lösungsmittelmoleküle erfahren durch die Diffusion auch den Einfluss des paramagnetischen Effekts. Dieser Einfluss einer zufälligen translatorischen Diffusion wird als „outer sphere“-Relaxation bezeichnet. Für die gängigen monomeren auf Gd^{III} basierenden Kontrastmittel leisten die „inner“ und „outer-sphere“-Relaxationsraten den gleichen Beitrag wie die beobachtete Protonenrelaxivität. Da der „inner sphere“-Beitrag bedeutend besser beeinflusst werden kann als der „outer sphere“-Beitrag, wird bei der Entwicklung zukünftiger Kontrastmittel hauptsächlich der „inner sphere“-Beitrag optimiert.

1.6.2 Ansatzpunkte zur Optimierung der Relaxivität

Aktuelle Kontrastmittel in der klinischen Anwendung nutzen nur einen Bruchteil ihrer theoretischen Kapazität. Die Gründe dafür liegen z.B. in den nicht optimalen Rotationskorrelationszeiten ($\sim 10^{-10}$ s) und H_2O -Austauschraten ($\sim 10^6$ s $^{-1}$). Nachfolgend sind einige Punkte aufgeführt, durch deren Beeinflussung die Relaxivität erhöht und die Eigenschaften der MRI-Kontrastmittel verbessert werden können.

➤ *Koordinationszahl:* Die „inner sphere“-Relaxivität ist linear proportional zur Anzahl direkt gebundener Wassermoleküle an das Gd^{III} -Ion; im Gd^{III} -Aquaion entspricht dies 9 „inner sphere“-Wassermolekülen. Die folgende Gleichung von Swift et al. (107) zeigt den

direkt proportionalen Zusammenhang zwischen „inner sphere“-Relaxivität und Anzahl gebundener Wassermoleküle:

Formel 1: c ist die Konzentration, q = Anzahl gebundene Wassermoleküle pro Gd, τ_m = Wasser-Austauschzeit, T_{1m} = Relaxivität der gebundenen Wassermoleküle.

$$\left(\frac{1}{T_1}\right) = \frac{c \cdot q}{55.5} \cdot \left(\frac{1}{T_{1m} + \tau_m}\right) = P_m \cdot \frac{1}{T_{1m} + \tau_m}$$

Jedoch ist das Aquaion selbst toxisch, da es unter physiologischen Bedingungen als Gadoliniumhydroxid ausfallen kann und schwerlösliche Salze, also stabile Komplexe mit endogen vorkommenden Anionen bildet (108). Alle bekannten auf Gd^{III} basierenden Kontrastmittel sind Komplexe mit der Koordinationszahl 8, welche aber noch genügend Platz lassen, um ein Wassermolekül in der „inner sphere“ zu koordinieren.

- *Distanz Gd–H:* Die „inner sphere“-Protonenrelaxivität hängt von der Distanz zwischen den koordinierten Wasserprotonen und dem Gd^{III} -Elektronenspin ab ($\sim 1/r_{GdH}^6$). Eine kurze Rechnung zeigt, dass eine Verringerung des Abstands um 10 pm der Gd-H Distanz einer Erhöhung der „inner sphere“-Protonenrelaxivität um 20% entspricht. Eine Verringerung um 20 pm entspricht einer Erhöhung um 50% (106).
- *Austauschmechanismus:* Der Protonen/Wasser-Austausch kann auf verschiedenen Mechanismen (D, I_d , I, I_a , A), beruhen, so dass sich je nach Komplex andere Austauschgeschwindigkeiten und somit andere Relaxivitäten ergeben.
- *Ladungseffekte:* Neben der sterischen Hinderung spielen auch Ladungseffekte eine wichtige Rolle. Eine höhere negative Ladung bevorzugt den Austausch eines Wassermoleküls in einem dissoziativen Prozess und beschleunigt so den Wasseraustausch. So besitzt zum Beispiel das Penta-Carboxyl-DOTA-Derivat $[Gd(DOTASA)(H_2O)]^{2-}$ eine 50% höhere Wasseraustauschrate als $[Gd(DOTA)(H_2O)]^-$ (109).
- *Katalyse:* Bei auf Gd^{III} basierenden Kontrastmitteln ist die Protonenaustauschrate unter physiologischen Bedingungen gerade gleich der Wasseraustauschrate. Durch H^+ - oder

OH⁻-Katalyse kann der Protonenaustausch beschleunigt und damit auch die Relaxivität erhöht werden. Die Wasseraustauschrate von [Gd-DOTA(H₂O)]⁻ nimmt mit zunehmendem Protonierungsgrad und Erhöhung der negativen Ladung signifikant ab; bei einer Konzentration von 1 M H⁺ ist die Wasseraustauschrate etwa 10-mal niedriger als in neutralem Medium (110).

- *Molekulargewicht:* Niedermolekulare Gd^{III}-Komplexe haben eine limitierte Relaxivität wegen ihrer schnellen Bewegung („rapid tumbling“). Um diese Rotation zu verlangsamen, kann das Molekulargewicht der Komplexe erhöht werden und damit auch die Relaxivität. Sherry et al. (111) zeigten, dass sich die Relaxivität erhöhen lässt, wenn niedermolekulare Komplexe wie [Gd-DOTA] an Peptide oder Makromoleküle gebunden werden.

2. Aufgabenstellung / Fragestellung

In der nuklearmedizinischen Tumordiagnostik werden routinemässig ^{111}In -markierte Octreotideanaloga eingesetzt (z.B. Octreoscan[®]). Aus radiophysikalischen Gründen, Kosten und Verfügbarkeit wären aber Somatostatinanaloga, die mit dem Generatoreluat $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ markiert werden können, von Vorteil. Die kurze Halbwertszeit von 6.02 h ist ideal, um Peptide mit hohen Radioaktivitätsmengen zu markieren und die Strahlenbelastung des Patienten trotzdem niedrig zu halten. Solche $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -markierten Somatostatinanaloga sollen eine schnelle Anreicherung im Tumor *in vivo* zeigen und eine rasche Clearance aus dem sonstigen Gewebe. Martin Béhé (112) hat im Rahmen seiner Dissertation die Derivate HYNIC-OC und HYNIC-TOC synthetisiert.

In dieser Arbeit geht es darum, die Synthese der $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -markierten Somatostatinanaloga weiterzuführen, das Markierprotokoll dieser Substanzen zu optimieren und Kits für eine einfache routinemässige Anwendung herzustellen. Mit verschiedenen biologischen und pharmakologischen Versuchen und Experimenten (z.B. Internalisierungsstudien) sollen diese Substanzen präklinisch evaluiert werden.

In einem zweiten Teil dieser Arbeit geht es um die Optimierung von Chelator-Peptid-Konjugaten; die Substanz DOTA-TOC (Abbildung 22), ein Somatostatinanalogon, welches mit verschiedenen Radioisotopen markiert werden kann (Tabelle 1), stellt im Universitätsspital Basel den Goldstandard dar für die hochsensitive Darstellung von neuroendokrinen Primärtumoren, metastasierenden endokrinen Pankreastumoren und Karzinoiden (81,82) sowie deren Therapie (53,89).

Um den therapeutischen Anwendungsbereich solcher Substanzen weiter erhöhen zu können, gibt es verschiedene Ansatzpunkte. Ein Problem der therapeutischen Anwendung ist die Aufnahme der Radioaktivität in die Nieren, die zugleich das Dosis-limitierende Organ darstellt. Es wäre also wünschenswert, das Tumor-zu-Nieren Verhältnis positiv zu

beeinflussen; dafür sollen verschiedene Linker/Spacer-Moleküle zwischen dem Vektormolekül, dem Peptid und dem Signalmolekül (Chelator mit Radioaktivität) eingeführt werden (Abbildung 18). Wester et al. (79,80) konnten mit ihren modifizierten Zucker-Somatostatinanaloga bereits zeigen, dass diese Derivate deutlich hydrophiler werden und somit einen deutlich niedrigeren Leberuptake zeigen. Im Rahmen dieser sogenannten „trifunktionellen“ Peptide sollen Chelator-Peptid-Konjugate synthetisiert werden, die einfache Aminosäuren, aber auch Zuckeraminosäuren als Spacer/Linker-Moleküle besitzen.

Eine weitere Möglichkeit, den therapeutischen Anwendungsbereich zu verbessern, liegt in der Erhöhung der spezifischen Aktivität, also dem Verhältnis zwischen Radioaktivität und Substanzmenge. Bestimmte bioaktive Peptide wie zum Beispiel VIP, Substanz P und Bombesin dürfen dem Patienten nicht in grossen Mengen appliziert werden, da es zu Nebenwirkungen kommen kann (Kapitel 1.5). Das Koppeln von mehreren Chelatoren an das Peptid kann die spezifische Aktivität entsprechend erhöhen. In einem dritten Teil meiner Arbeit sollen solche Poly-DOTA-Derivate mit unterschiedlichen Linkern und Spacern synthetisiert und präklinisch untersucht werden.

Ein zusätzlicher Anwendungsbereich solcher Poly-DOTA-Derivate wäre als „targeted“ MRI-Kontrastmittel denkbar. Herkömmliche Kontrastmittel wie zum Beispiel [Gd-DOTA(H₂O)]⁻ (DOTAREM[®]) sind unspezifisch und müssen dem Patienten in grossen Mengen appliziert werden. Die Poly-DOTA Derivate besitzen ein Vektormolekül (Peptid), das die Substanz an das Target, in unserem Fall den Tumor, bringen kann. Und die Zahl der Chelatoren pro Peptid erhöht die Konzentration von Gd^{III}-Kernen, so dass es möglich wird, den Tumor an einem klinischen MRI-Scanner darzustellen.

3. Experimenteller Teil

3.1 Material

Alle verwendeten Chemikalien sind kommerziell erhältlich und wurden, falls nicht speziell erwähnt, ohne weitere Reinigung eingesetzt. Lieferanten: Aminosäuren von NOVA Biochem (Läufelfingen, Schweiz), Cyclen und DOTA(tBu)₃ von Macrocyclics (Dallas, USA), Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM) von Gibco BRL (Schweiz). Tritylchlorid-Harz (TCP-Harz, Belegung 0.95 mmol/g) von Pepchem (Tübingen, Deutschland). Radioaktivität: ¹¹¹InCl₃ (trägerfrei, in 0.05 M HCl) und ^{99m}Tc, mit 0.9% NaCl aus einem ⁹⁹Mo/^{99m}Tc-Generator eluiert, von Mallinckrodt Medical Inc. (Petten, Niederlande). ⁹⁰YCl₃ und ¹⁵³GdCl₃ (gelöst in 0.05 M HCl) von Perkin Elmer Life Science (Boston, USA).

3.2 Verwendete Geräte

Dünnschichtchromatographie (DC) zur Reaktionskontrolle: mit Kieselgel 60-F-254 beschichtete Glasplatten von Merck.

Dünnschichtchromatographie zur Qualitätskontrolle: Automatic TLC-Linear Scanner, Berthold LB 2820-1, Software „Berthold CHROMA“.

Elektrospray-Massenspektroskopie (Atmospheric Pressure Ionisierung): PHIL507: Waters ZMD (Micromass) mit HP1100 Quat. (Agilent) LC Pumpe oder GINA88: MSD 1100 SL (Agilent Technologies) mit einer Agilent 1100 Binär LC Pumpe.

Analytisches und semipräparatives HPLC-System; Hewlett Packard 1050 HPLC System mit quaternärer Pumpe, Dioden Array Detektor und einem Durchfluss- γ -Detektor von Berthold LB 506, C1.

Analytisches, semipräparatives und präparatives HPLC-System; Metrohm HPLC-System LC-CaDI 22-14, Pumpen-Einheit 2250, UV-Detektor LAMBDA 1010 und ein Durchfluss- γ -Detektor von EG&G Berthold LB 509.

HPLC-Chromatographiesäulen:

Analytische HPLC-Säulen:

AS1 Macherey Nagel MN CC250/4 Nucleosil 120-3 C₁₈, 4 x 250 mm

AS2 Interchrom UP50DB*25QS Uptisphere 5μ ODB, 4 x 250 mm

Semipräparative HPLC-Säule:

SPS1 Vydac 218TP510, Protein & Peptide C₁₈, 10 x 250 mm

Präparative HPLC-Säule:

PS1 Macherey Nagel VP 250/21 Nucleosil 100-5 C₁₈, 21 x 250 mm

PS2 Interchrom UP50DB / 25 DEP 10041 Uptisphere, 21 x 250 mm

Lyophilisator: Christ Alpha Lyophilisator von BioBlock (Illkirch, Frankreich), Jouan RC10 & RC10-22 Zentrifugal-Verdampfer der Instrumente Gesellschaft Zürich (Zürich, Schweiz).

MALDI-TOF-Massenspektroskopie: Voyager sSTR MALDI time-of-flight Massenspektrometer mit einem Nd:YAG Laser (355 nm) von Applied BioSystems (Framingham, MA, USA). Als Matrix wurden α-Cyano-4-Hydroxy Zimtsäure oder 3,5-Dimethoxy-4-Hydroxy Zimtsäure (Sinapinsäure) verwendet.

¹H/¹³C-NMR: Bruker Spektrometer (360/99 MHz), Varian VXR 400 (400/101 MHz) Spektrometer, die chemischen Verschiebungen sind auf TMS bezogen.

Peptidsynthesizer: Semiautomatischer Peptidsynthesizer von Rink Combichem (Bubendorf, Schweiz).

Quantitativer γ-Counter: NaI(Tl)-Bohrlochcounter COBRA II, D 5003 von Canberra Packard (USA).

Rotationsverdampfer: Büchi Rotavapor RE11 und R124 mit Büchi Vacuum System B-179 (Flawil, Schweiz).

Säulenchromatographie: Kieselgel 60 (Fluka, Buchs, Schweiz), Sephadex G-50 (Pharmacia, Uppsala, Schweden).

Szintigraphie: Gammakamera (Diacam, Siemens, Deutschland) mit einem Low-Energy und Medium-Energy High-Resolution-Parallel-Hole-Kollimator

UV/Vis-Spektroskopie: computergesteuertes Lambda 2 UV/Vis-Spektrophotometer von Perkin Elmer (Deutschland).

3.3 HPLC-Gradienten

Die folgenden Gradientensysteme sind zum Einsatz gekommen:

Lösungsmittel A = 0.1% TFA in deionisiertem Wasser, B = Acetonitril, C = Methanol.

Analytisch: **AG1:** 0.75 mL/min, **0'** 95% A, 5% B; **5'** 95% A, 5% B; **10'** 0% A, 100% B; **15'** 0% A, 100% B; **20'** 95% A, 5% B; $\lambda=214/254$ nm.

AG2: 0.75 mL/min, **0'** 95% A, 5% B; **30'** 55% A, 45% B; **32'** 0% A, 100% B; **34'** 0% A, 100% B; **37'** 95% A, 5% B; $\lambda=214/254$ nm.

AG3: 0.75 mL/min, **0'** 90% A, 10% B; **20'** 40% A, 60% B; **23'** 0% A, 100% B; **24'** 0% A, 100% B; **27'** 90% A, 10% B; $\lambda=214/254$ nm.

AG4: 0.75 mL/min, **0'** 95% A, 5% B; **15'** 0% A, 100% B; **20'** 0% A, 100% B; **25'** 95% A, 5% B; $\lambda=214/254$ nm.

AG5: 0.5 mL/min, **0'** 100% A, 0% C; **3'** 100% A, 0% C; **3'** 75% A, 25% C; **9'** 75% A, 25% C; **9'** 66% A, 34% C; **20'** 0% A, 100% C; **22'** 0% A, 100% C; **25'** 100% A, 0% C; $\lambda=214/254$ nm.

Semipräparativ: **SPG1:** 4.0 mL/min, **0'** 95% A, 5% B; **20'** 40% A, 60% B; **23'** 0% A, 100% B; **24'** 0% A, 100% B; **27'** 95% A, 5% B; $\lambda=214/254$ nm.

SPG2: 4.0 mL/min, **0'** 95% A, 5% B; **10'** 50% A, 50% B; **18'** 0% A, 100% B; **20'** 95% A, 5% B; $\lambda=214/254$ nm.

SPG3: 4.0 mL/min, **0'** 80% A, 20% B; **15'** 50% A, 50% B; **18'** 0% A, 100% B; **20'** 80% A, 20% B; $\lambda=214/254$ nm.

Präparativ: **PG1:** 15.0 mL/min, **0'** 90% A, 10% B; **20'** 40% A, 60% B; **23'** 0% A, 100% B; **24'** 0% A, 100% B; **27'** 90% A, 10% B; $\lambda=214/254$ nm.

PG2: 15.0 mL/min, **0'** 80% A, 20% B; **12'** 40% A, 60% B; **15'** 0% A, 100% B; **18'** 0% A, 100% B; **20'** 80% A, 20% B; $\lambda=214/254$ nm.

3.4 AAV

Für die Synthese der verschiedenen Chelator-Peptid-Konjugate wurden, wenn nicht anders beschrieben, die folgenden allgemeinen Arbeitsvorschriften (113) (AAV) verwendet.

AAV 1: Beladen von TCP-Harz

2.0 g Tritylchlorid-Harz (TCP-Harz; durchschnittlich erreichte Belegung 0.95 mmol/g) werden in einem 100 mL Glaskolben eingewogen. 2.0 mmol einer N-terminal geschützten Aminosäure werden in 20 mL trockenem DCM gelöst und mit 2.5 mmol DIPEA versetzt. Die Lösung wird zum Harz gegeben und die Suspension 60 min bei RT geschüttelt. Nach Zugabe von weiteren 2.5 mmol DIPEA und 5.0 mL Methanol wird nochmals 15 min geschüttelt, anschliessend wird das Harz über eine Glasfritte abgesaugt und fünfmal mit DCM, einmal mit DCM/Methanol 1/1 und dreimal mit Methanol gewaschen. Das Harz wird im Luftstrom trockengeblasen, dann im Trockenschrank getrocknet und gewogen. Die Beladung kann aus der Gewichtszunahme des Harzes bestimmt werden, ansonsten genauer UV-spektrophotometrisch über Fmoc-Bestimmung (**AAV 2**):

Formel 2: Beladungsbestimmung durch Gewichtszunahme des Harzes.

$$\text{mmol/g} = \frac{(m_2 - m_1) \cdot 1000}{(MW - 36.461) \cdot m_2}$$

m_1 = Einwaage des unbeladenen Harzes in g
 m_2 = Auswaage des beladenen Harzes in g
 MW = Molgewicht der Fmoc-Aminosäure

AAV 2: Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe

Das Fmoc-geschützte Peptid wird dreimal mit DMF gewaschen, danach wird einmal 5 min und einmal 15 min mit einer 20% Piperidin/DMF-Lösung inkubiert. Die Abspalllösungen werden gesammelt und in einem Messkolben mit Ethanol verdünnt. Die Fmoc-Ausbeute wird UV-spektrophotometrisch (Dibenzofulven; $\text{Abs}_{\text{max}}=300 \text{ nm}$) gemäss dem Gesetz von Beer-Lambert ermittelt. Der molare Extinktionskoeffizient von Dibenzofulven beträgt $\epsilon=7800 \text{ [L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}]$.

AAV 3: Festphasensynthese von Peptiden nach der Fmoc-Strategie

Fmoc-Aminosäuren werden am semiautomatischen Peptidsynthesizer gemäss gängiger Fmoc-Strategie gekoppelt (114,115).

Tabelle 4: Syntheseprogramm für den Peptidsynthesizer.

Schritt	Operation	Reagenzien (20 mL)	Wiederholungen	Zeit [min]
1 [‡]	quellen	DMF	1	15
2	entschützen	20% Piperidin / DMF	1	5
3	entschützen	20% Piperidin / DMF	1	15
4	waschen	DMF	2	0.5
5	waschen	DMF	1	1
6	konditionieren	NMP	1	1
7	Reaktionsschritt	Aminosäure	1	60-90
8	waschen	DMF	3	2

[‡] Schritt 1 erfolgt nur, wenn die Synthese unterbrochen und das Harz getrocknet wurde.

AAV 4: Kaisertest

Mit dem Kaisertest werden freie primäre und sekundäre Amine (116) dargestellt. Ein positiver Kaisertest zeigt an, dass z.B. die Fmoc-Schutzgruppe entfernt ist.

Lösung A: 20.0 g Phenol werden in 5 mL Ethanol gelöst und zu einer Lösung mit 1 mL 0.01 M KCN und 49 mL Pyridin gegeben.

Lösung B: 500 mg Ninhydrin werden in 10 mL Ethanol gelöst.

Test: Zu einer Spatelspitze Harz (ca. 0.1 mg), welches zuvor mit Ethanol gewaschen wurde, werden 50 μL A und 50 μL B zugegeben und 10 min bei 100°C inkubiert. Eine tiefblaue

Färbung der Lösung und des Harzes indiziert die Präsenz von (>5-10 μmol Amin pro g Harz) primären Aminogruppen. Eine schwach blaue Färbung des Harzes und keine Färbung der Lösung ergibt ca. 1-2 μmol Amin / g Harz.

AAV 5a: Kopplung der Fmoc-Aminosäure mit HOBt / DIC (AAV 3 / Schritt 7)

Es werden 2.0 mmol der jeweiligen geschützten Aminosäure, 2.3 mmol HOBt und 2.3 mmol DIC in 20 mL NMP gelöst und 20 min inkubiert. Anschliessend wird der pH der aktivierten Aminosäure durch Zugabe von 2-6 mmol DIPEA auf 7-8 eingestellt und dem Harz zugeführt. Nach einer Reaktionszeit von 60-90 min wird das Harz mit DMF gewaschen.

AAV 5b: Kopplung einer Fmoc-Aminosäure mit HOBt / DIC

Es wird pro g Harz 1.0 mmol der jeweiligen geschützten Aminosäure, 1.2 mmol HOBt und 1.2 mmol DIC in NMP (möglichst kleines Volumen) gelöst und 20 min inkubiert. Anschliessend wird der pH der aktivierten Aminosäure durch Zugabe von 2-6 mmol DIPEA der pH auf 7-8 eingestellt und dem Harz zugeführt. Nach einer Reaktionszeit von 2-3 h wird das Harz mit DMF gewaschen.

AAV 6a: Kopplung einer Fmoc-Aminosäure oder eines Prochelators mit HATU an der Festphase

Es wird pro g Harz 1.0 mmol der jeweiligen geschützten Aminosäure oder des Prochelators (z.B. DOTA(tBu)₃), 1.5 mmol HATU in NMP (möglichst kleines Volumen) gelöst und 20 min inkubiert. Anschliessend wird der pH der aktivierten Aminosäure durch Zugabe von 2-6 mmol DIPEA der pH auf 7-8 eingestellt und dem Harz zugeführt. Nach einer Reaktionszeit von 2-3 h wird das Harz mit DMF gewaschen.

AAV 6b: Kopplung eines Prochelators mit HATU in Lösung

2.0 eq eines Chelators (z.B. DOTA(tBu)₃, HYNIC-Boc) und 2.0 eq HATU werden in NMP (möglichst geringes Volumen) gelöst. Nach 20 min Inkubationszeit wird der aktivierte Prochelator zu 1.0 eq Peptid gegeben, mittels Zugabe von 2-6 eq DIPEA wird der pH auf 7-8 eingestellt. Nach einer Reaktionszeit von 4-5 h wird die Reaktionslösung in

Essigsäureethylester aufgenommen, dreimal mit 5% NaHCO₃-Lösung und dreimal mit H₂O extrahiert. Die organische Phase wird mit MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeengt.

AAV 7a: Bildung von Disulfidbindungen (Zyklisierung an der Festphase)

Peptide, welche Cys(Acm) enthalten, können unter den folgenden Bedingungen gleichzeitig die Schutzgruppe abspalten und eine Disulfidbrücke (117) bilden. Dazu wird 1.2 eq Tl(III)-trifluoracetat in DMF gelöst und zum Peptid-Harz gegeben. Nach einer Reaktionszeit von 80 min bei 0°C wird das Harz mit DMF gewaschen (113).

AAV 7b: Bildung von Disulfidbindungen (Zyklisierung in Lösung)

Das Peptid mit Cys(Acm) wird in Methanol/ 10% H₂O gelöst. Danach werden 10 eq Iod in Methanol gelöst, zum Peptid gegeben und bei RT inkubiert (118). Nach 30 min wird die Reaktion durch tropfenweise Zugabe einer 0.5 M Ascorbinsäure gequenchet, bis die Reaktionslösung farblos wird. Am Rotationsverdampfer wird das Methanol entfernt, das Rohprodukt wird in DCM aufgenommen und dreimal mit H₂O extrahiert. Die organische Phase wird MgSO₄ getrocknet und anschliessend eingeengt.

AAV 8a: Abspaltung von TCP-Harz

Das Harz wird dreimal mit DCM gewaschen, danach wird zweimal 30 min mit einer 20% Essigsäure/ DCM-Lösung inkubiert. Die Abspatlösungen werden in einen Kolben mit Toluol getropft und dreimal koevaporiert.

AAV 8b: Abspaltung von 2-Chlorotrityl-Harz

Das Harz wird dreimal mit DCM gewaschen, danach wird zweimal 30 min mit der folgenden Abspatlösung inkubiert; 0.5% TFA/ 0.5% H₂O/ 19% TFE/ DCM. Die Abspatlösungen werden in einen Kolben mit Toluol getropft und dreimal koevaporiert.

AAV 9a: Entschützung von Peptiden mit säurelabilen Schutzgruppen

Zum Entfernen von säurelabilen Schutzgruppen wie Boc und t-Butyl werden TFA-Lösungen mit bis zu 10% Scavenger verwendet.

Das Peptid wird in 5-10 mL 90% TFA/ 5% Thioanisol/ 5% H₂O gelöst und 3-6 h bei RT inkubiert. Anschliessend wird das Peptid in Isopropylether/ Petrolether 1/1 gefällt, nach kurzem Abkühlen wird der Überstand verworfen. Das zurückgebliebene Rohprodukt wird mit semipräparativer oder präparativer HPLC gereinigt.

AAV 9b: Entschützung von Peptiden mit HYNIC als Chelator

Zum Entfernen von säurelabilen Schutzgruppen wie Boc und t-Butyl von HYNIC-Peptid-Konjugaten werden TFA-Lösungen mit 10% Scavenger verwendet.

Das Peptid wird in 5-10 mL 90% TFA/ 10% H₂O gelöst und 30 min bei 0°C inkubiert. Anschliessend wird das Peptid in Isopropylether/ Petrolether 1/1 gefällt und nach kurzem Tiefkühlen der Überstand verworfen. Das zurückgebliebene Rohprodukt wird sofort mit semipräparativer oder präparativer HPLC gereinigt.

AAV 10: Bestimmung der Peptidkonzentration in wässrigen Lösungen

2-3 mg eines Peptides werden in einem beschichteten 2 mL Eppendorf-Röhrchen eingewogen und in 1 mL 100 mM Essigsäure gelöst. Aus dieser Stammlösung werden 10 µL in 500 µL verdünnt und die UV-Absorption bestimmt. Mittels Beer-Lambert'schen Gesetz und dem molaren Extinktionskoeffizienten (DOTA-TOC/ DOTA-TATE: $\epsilon=6849$ [L·mol⁻¹·cm⁻¹]) (119), kann die Konzentration der Stammlösung berechnet werden.

3.5 Synthesen

3.5.1 Peptidsynthesen

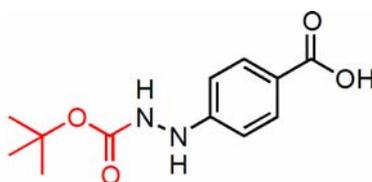
Fmoc-D-Phe¹-Cys²(Acm)-Tyr³(tBu)-D-Trp⁴(Boc)-Lys⁵(Boc)-Thr⁶(tBu)-Cys⁷(Acm)-

Thr⁸(ol)(tBu)-CTCP (DS128): Ausgehend von 2.01 g O-t-Butylthreoninol-2-chloro-trityl Harz (Belegung: 0.66 mmol/g) werden gemäss **AAV 3** das lineare Seitenketten-geschützte TOC am Harz aufgebaut. Zur Reaktionskontrolle wird nach jeder Kopplung ein Kaisertest (**AAV 4**) gemacht und nach jeder Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wird die Konzentration an Dibenzofulven bestimmt und so die Kopplungsausbeute ermittelt. Man erhält so 3.7 g Harz

mit dem linearen Seitenketten-geschützten TOC (**DS128**). Gravimetrisch wird eine Belegung von 0.26 mmol/g bestimmt, mittels UV-Spektroskopie wird der exakte Wert von 0.22 mmol/g ermittelt (Ausbeute 33%). Die analytischen Daten beziehen sich auf das vom Harz abgespaltene Derivat (DS128): HPLC (AS1/AG2): 34.8 min. ESI-MS(+): 1793.8 (22, $[M+Na]^+$); 1770.4 (100, $[M+H]^+$). ESI-MS (-): 1883.7 (100, $[M+TFA]^-$); 1769.9 (78, $[M-H]^-$).

Fmoc-D-Phe¹-Cys²(Acm)-Tyr³(tBu)-D-Trp⁴(Boc)-Lys⁵(Boc)-Thr⁶(tBu)-Cys⁷(Acm)-Thr⁸(tBu)-TCP (DS2): Ausgehend von 2.03 g TCP-Harz (Belegung: 0.95 mmol/g) werden zuerst gemäss **AAV 1** das Harz beladen, danach das Peptid gemäss **AAV 3** aufgebaut. Zur Reaktionskontrolle wird nach jeder Kopplung ein Kaisertest (**AAV 4**) durchgeführt und nach jeder Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wird die Konzentration an Dibenzofulven bestimmt. Man erhält so 4.5 g Harz mit dem linearen Seitenketten-geschützten TATE (**DS2**). Gravimetrisch wird eine Belegung von 0.56 mmol/g bestimmt, mittels UV-Spektroskopie wird der exakte Wert von 0.31 mmol/g ermittelt (Ausbeute 33%). Die analytischen Daten beziehen sich auf das vom Harz abgespaltene Derivat (DS2): HPLC (AS1/AG2): 28.1 min. ESI-MS(+): 1806.9 (30, $[M+Na]^+$); 912.3 (78, $[M+K]^{2+}$); 619.4 (100, $[M+CH_3COO]^{3+}$). ESI-MS(-): 1785.4 (28, $[M-H]^-$); 617.4 (100, $[M+CH_2COO]^{3-}$).

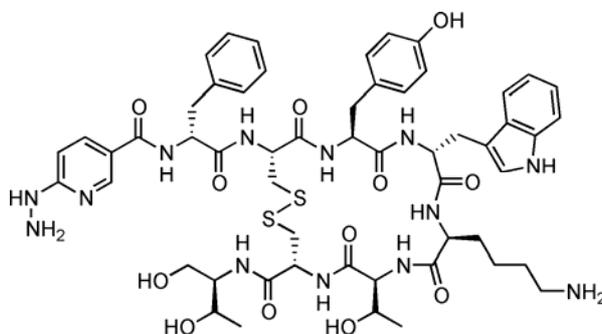
3.5.2 HYNIC-Boc



HYNIC-Boc wurde von Pia Powell nach einer Vorschrift von Abrams et al. (33) hergestellt. HPLC (AS1/AG3): 9.38 min. ESI-MS(+): 760.6 (11, $[3M+H]^+$); 507.6 (22, $[2M+H]^+$); 254.4 (100, $[M+H]^+$). ESI-MS(-): 252.4 (100, $[M-H]^-$). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO): δ = 1.4 (s, 9H, $-(CH_3)_3$), 6.5 (d, J = 14 Hz, 1H, $-C_{ar}H$), 7.9 (d, J = 14 Hz, 1H, $-C_{ar}H$), 8.6 (s, 1H, $(-C_{ar}H)$), 12.8 (b, 1H, $-COOH$). ¹³C-NMR (125.8 MHz, DMSO): δ = 28.1 (3C, $-C(CH_3)_3$), 38.99 -

39.99 (DMSO), 79.3 (1C, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 104.6 (1C, C_{ar}), 117.4 (1C, C_{ar}), 138.4 (1C, C_{ar}), 150.4 (1C, C_{ar}), 155.7 (1C, $-\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$), 166.8 (1C, C_{ar}), 172.1 (1C, $-\text{COOH}$).

3.5.3 HYNIC-TOC

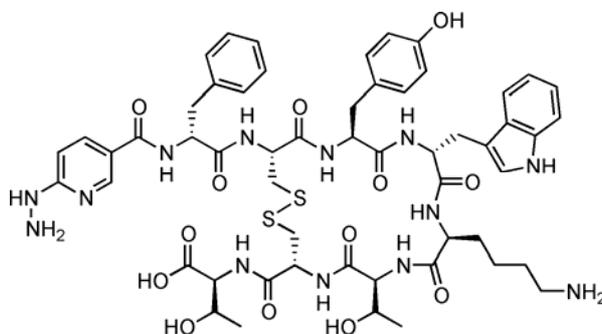


Variante A: 205 mg **DS128**-Harz werden dreimal mit THF/DMF gewaschen, danach wird die Fmoc-Schutzgruppe entfernt (**AAV 2**) und das Peptid vom Harz abgespalten (**AAV 8b**). Das Peptid wird in Lösung mit 10 eq (118.4 mg) Iod zyklisiert (**AAV 7b**), danach werden 1.5 eq (17.8 mg) HYNIC-Boc in Lösung mit HATU gekoppelt (**AAV 6b**). Die Schutzgruppen werden mit 90% TFA/H₂O bei 0°C während 30 min (**AAV 9b**) abgespalten und mittels präparativer HPLC gereinigt (HPLC, PS1/PG2). Man erhält 10 mg HYNIC-TOC (**DS129**) mit einer Reinheit von >95%; dies entspricht einer Ausbeute von 19%. HPLC (AS1/AG3): 15.43 min. ESI-MS(+): 1193.1 (7, [M+Na]⁺); 1171.0 (11, [M+H]⁺); 598.7 (30, [M+Na]²⁺); 586.2 (100, [M+2H]²⁺). ESI-MS(-): 1168.8 (33, [M-H]⁻), 584.1 (16, [M-H]²⁻). MALDI-MS: 1196.5 (15, [M+H+Na]⁺), 1170.5 (100, [M]⁺).

Variante B: 209.9 mg **DS128**-Harz werden dreimal mit DMF gewaschen, danach wird die Fmoc-Schutzgruppe entfernt (**AAV 2**). Das Peptid wird mit 1.2 eq (30 mg) $\text{I}(\text{TFA})_3$ am Harz zyklisiert (**AAV 7a**) und danach vom Harz abgespalten (**AAV 8b**). Nachdem 2.0 eq (20.3 mg) HYNIC-Boc in Lösung mit HATU gekoppelt (**AAV 6b**) werden, spaltet man die Schutzgruppen mit 90% TFA/H₂O bei 0°C während 30 min (**AAV 9b**) ab und reinigt mittels präparativer HPLC (HPLC, PS1/PG2) das Produkt. Man erhält 4.3 mg HYNIC-TOC (**DS129**) mit einer Reinheit von >90%; dies entspricht einer Ausbeute von 8.2%.

HPLC (AS1/AG3): 15.43 min. ESI-MS(+): 1193.4 (6, $[M+Na]^+$); 1170.5 (13, $[M+H]^+$), 586.3 (100, $[M+2H]^{2+}$). ESI-MS(-): 1168.8 (33, $[M-H]^-$), 584.1 (16, $[M-H]^{2-}$).

3.5.4 HYNIC-TATE



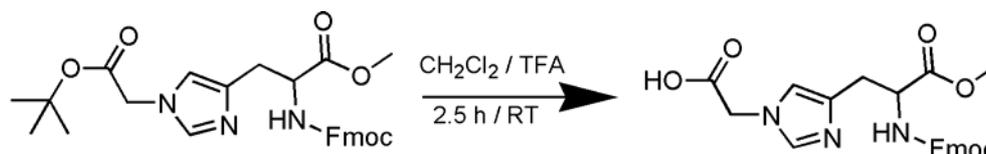
Variante A: 200 mg **DS2**-Harz (0.31 mmol/g) werden dreimal mit DMF gewaschen, danach wird die Fmoc-Schutzgruppe entfernt (**AAV 2**) und das Peptid vom Harz abgespalten (**AAV 8a**). Das Peptid wird in Lösung mit 10 eq (157 mg) Iod zyklisiert (**AAV 7b**), dann werden 1.5 eq (23.6 mg) HYNIC-Boc in Lösung mit HATU gekoppelt (**AAV 6b**). Die Schutzgruppen werden mit 90% TFA/H₂O bei 0°C während 30 min (**AAV 9b**) abgespalten und mittels präparativer HPLC gereinigt (HPLC, PS1/PG2). Man erhält 1.6 mg HYNIC-TATE (**DS5**) mit einer Reinheit von >95%; dies entspricht einer Ausbeute von 7.7%. HPLC (AS1/AG3): 14.98 min. ESI-MS(-): 1209.1 (30, $[M+H+Na]^+$); 1183.0 (65, $[M]^+$), 604.1 (65, $[M+Na]^{2+}$), 591.0 (100, $[M+H]^{2+}$).

Variante B: 131.6 mg **DS2**-Harz (0.31 mmol/g) werden dreimal mit DMF gewaschen, danach wird das Peptid mit 1.2 eq (26.6 mg) $TI(TFA)_3$ am Harz zyklisiert (**AAV 7a**). Nachdem Entfernen der Fmoc-Schutzgruppe (**AAV 2**), werden 2.0 eq (20.7 mg) HYNIC-Boc am Harz mit HATU gekoppelt (**AAV 6a**). Die Abspaltung vom Harz und die Entfernung der Schutzgruppen geschehen in einem Schritt: das Harz wird mit einer Lösung aus 90% TFA/ 5% H₂O/ 5% Thioanisol bei 0°C 40 min inkubiert, anschliessend in 25 mL Diethylether/ 5mL Toluol gefällt. Nach kurzem Abkühlen wird die Lösung zentrifugiert und der Überstand verworfen. Mittels präparativer HPLC wird das Rohprodukt gereinigt (HPLC, PS1/PG2) und

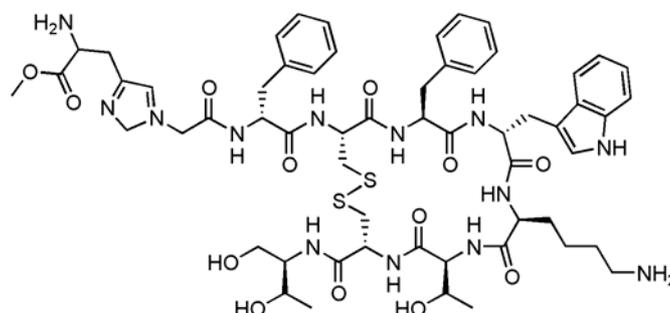
man erhält 1.0 mg HYNIC-TATE (**DS5**) mit einer Reinheit von >98%; dies entspricht einer Ausbeute von 11.6%. HPLC (AS1/AG3): 15.32 min. ESI-MS(+): 1185.0 (16, [M+H]⁺); 606.0 (100, [M+K]²⁺); 592.9 (30, [M+H]²⁺).

3.5.5 aa49-TATE

Der Chelator **aa49** (Methyl 1-(2-t-butoxy-2-oxoethyl)-N-Fmoc-histidinate), ein Histidin-derivat wurde von Jae Kyoung Pak, Uni Zürich, zur Verfügung gestellt.



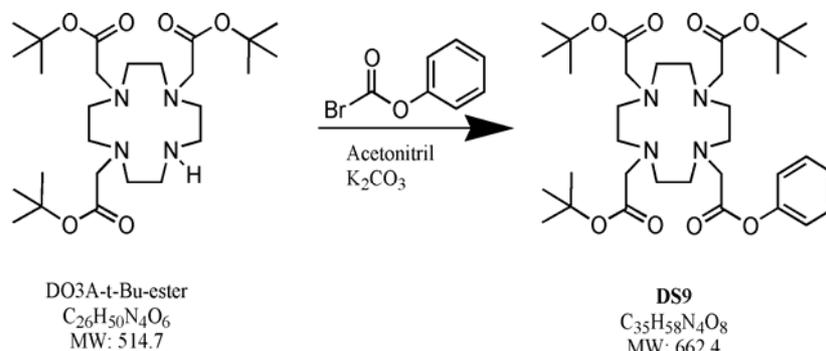
1.0 eq aa49 (29 mg, 57.4 μmol) wird in 1 mL Methylenchlorid/TFA (1:1) gelöst und 2.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wird mittels Rotationsverdampfer eingeeengt, danach in Methanol aufgenommen und solange wieder eingeeengt, bis das TFA aus der Lösung entfernt ist. ESI-MS(-): 897.6 (27, [2·M]), 448.4 (66.7, [M-H]⁻), 226.3 (100, [M]²⁻).



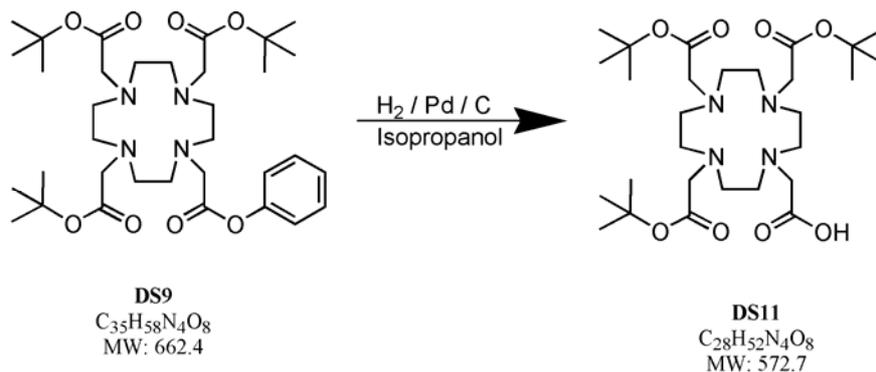
90 mg **DS2**-Harz (0.31 mmol/g) werden dreimal in DMF gewaschen, danach wird die Fmoc-Schutzgruppe entfernt (**AAV 2**) und 2.3 eq (29 mg) aa49 mit 3.5 eq (28.6 mg) HATU am Harz gekoppelt (**AAV 6a**). Nach 15 h Reaktionszeit wird die Fmoc-Schutzgruppe entfernt (**AAV 2**), danach wird das Peptid-Chelator-Konjugat vom Harz abgespalten (**AAV 8a**) und in Lösung mit 10 eq (75.9 mg) Iod zyklisiert (**AAV 7b**). Die Schutzgruppen werden mit 90% TFA/ 5% Thioanisol/ 5% H₂O während 1 h (**AAV 9a**) abgespalten und mittels präparativer HPLC gereinigt (HPLC, PS1/PG2). Man erhält 3.1 mg Histidin-TATE (**DS119**) mit einer Reinheit von >95%; dies entspricht einer Ausbeute von 9.9%. HPLC (AS1/AG5): 20.77 min

(ohne Methylgruppe) und 21.54 min (DS119). ESI-MS(+): 629.6 (38, $[M+H]^{2+}$); 525.3 (35, $[TATE]^{2+}$). ESI-MS(-): 628.1 (5, $[M-H]^{2-}$).

3.5.6 DOTA(tBu)₃



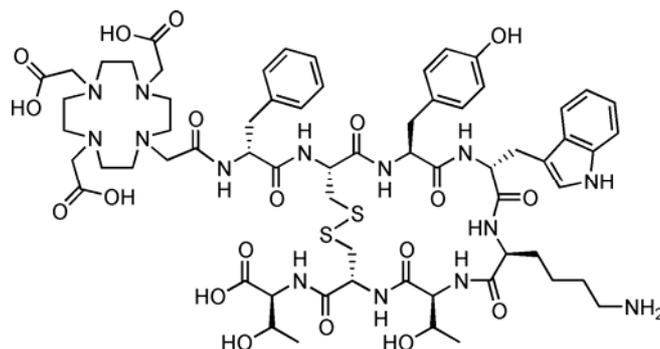
1.21 g DO3A-t-Bu-Ester werden in 25 mL Acetonitril vorgelegt, langsam werden 6.0 eq (1.95 g) K_2CO_3 und 0.95 eq (350 μ L) Bromessigsäurebenzylester zugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Die Suspension wird über Hyflo Super Gel filtriert und zweimal mit je 10 mL Acetonitril und 2 mL DCM nachgewaschen. Am Rotationsverdampfer wird das Lösungsmittel entfernt, das Rohprodukt in DCM gelöst und mittels Säulenchromatographie (Kieselgel 60, Lösungsmittel: DCM/Ethanol (9/1)) gereinigt. Nach dem Trocknen erhält man 1.66 g **DS9**, dies entspricht einer Ausbeute von 106% (enthält trotz Reinigung noch Edukt).



290 mg Pd/C-Katalysator werden mit einigen Tropfen H_2O aufgeschwemmt und zu 1.01 g **DS9** in 30 mL Isopropanol gegeben. Über Nacht wird diese Lösung unter Normaldruck hydriert. Die schwarze Suspension wird über Hyflo Super Gel filtriert und zweimal mit 10 mL Isopropanol nachgewaschen. Am Rotationsverdampfer wird die Lösung eingeeengt und anschliessend mittels Säulenchromatographie (Kieselgel 60, Lösungsmittel: Isopropanol/

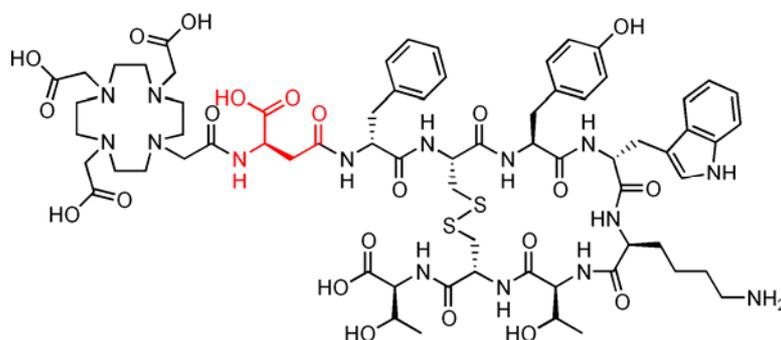
conc-NH₃ (95/5)) gereinigt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels und Trocknen am HV erhält man 0.8 g **DS11** (Ausbeute 91.6%). ESI-MS(+): 611 (33, [M+K]⁺); 595 (100, [M+Na]⁺), 573 (40, [M+H]⁺). ESI-MS(-): 653 (33, [M+Br]⁻); 607 (40, [M+Cl]⁻); 571 (100, [M-H]⁻).

3.5.7 DOTA-TATE



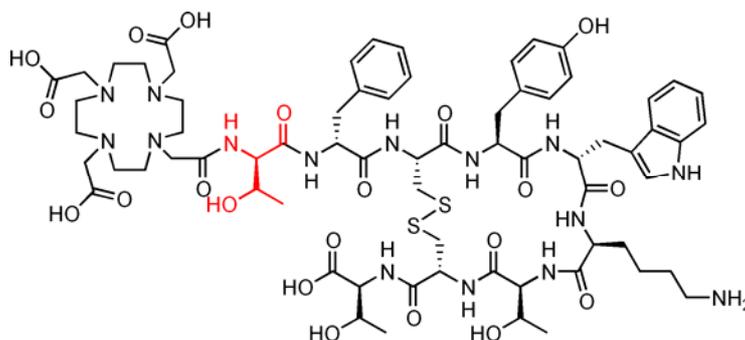
200 mg **DS2**-Harz werden dreimal mit DMF gewaschen, danach wird die Fmoc-Schutzgruppe entfernt (**AAV 2**) und 3.0 eq (51.5 mg) DOTA(tBu)₃ mit 3.3 eq (37.6 mg) HATU am Harz gekoppelt (**AAV 6a**). Nach 4 h Reaktionszeit wird das Peptid-Chelator-Konjugat vom Harz abgespalten (**AAV 8a**) und in Lösung mit 10 eq (75.9 mg) Iod zyklisiert (**AAV 7b**). Die Schutzgruppen werden mit 85% TFA/ 5% Thioanisol/ 5% Triisopropylsilan/ 5% H₂O während 5 h (**AAV 9a**) abgespalten und mittels präparativer HPLC gereinigt (HPLC, PS1/PG2). Man erhält 8.6 mg DOTA-TATE (**DS132**) mit einer Reinheit von >95%; dies entspricht einer Ausbeute von 20.0%. HPLC (AS1/AG2): 19.52 min. ESI-MS(+): 1474.6 (22, [M+K]⁺); 737.6 (100, [M+K]²⁺). ESI-MS(-): 1620.8 (67, [M+TFA+HCl+Cl]⁻); 1494.1 (45, [M+CH₂COO]⁻); 1472.5 (100, [M+Cl]⁻).

3.5.8 DOTA-Asp-TATE



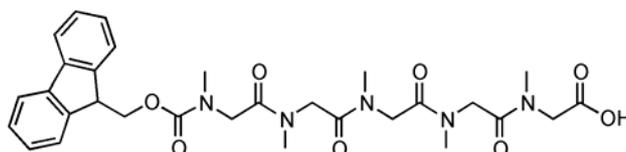
68 mg **DS2**-Harz werden dreimal mit DMF gewaschen, danach wird die Fmoc Schutzgruppe entfernt (**AAV 2**) und 3.0 eq (37.4 mg) Fmoc-Asp-ODmab mit 3.5 eq (24.9 mg) HATU am Harz gekoppelt. Nach dem Abspalten der Fmoc-Schutzgruppe (**AAV 2**) werden 2.0 eq (21.4 mg) DOTA(tBu)₃ mit 2.5 eq (17.8 mg) HATU am Harz gekoppelt (**AAV 6a**). Nach 4 h Reaktionszeit wird die Dmab-Schutzgruppe abgespalten: dazu wird Harz dreimal 2 min mit 2% Hydrazin in DMF und danach dreimal mit DMF gewaschen. Danach wird das Peptid-Chelator-Konjugat vom Harz abgespalten (**AAV 8a**) und in Lösung mit 10 eq (47.4 mg) Iod zyklisiert (**AAV 7b**). Die Schutzgruppen werden mit 90% TFA/ 5% Thioanisol/ 5% H₂O während 4 h (**AAV 9a**) abgespalten und mittels präparativer HPLC gereinigt (HPLC, PS1/PG2). Man erhält 2.2 mg DOTA-Asp-TATE (**DS107**) mit einer Reinheit von >95%; dies entspricht einer Ausbeute von 7.6%. HPLC (AS1/AG2): 20.21 min. MALDI-MS: 1663.0 (47, [M+TFA]⁺); 1550.9 (100, [M]⁺).

3.5.9 DOTA-Thr-TATE



117 mg **DS2**-Harz werden dreimal mit DMF gewaschen, danach wird die Fmoc-Schutzgruppe entfernt (**AAV 2**) und 3.0 eq (38.4 mg) Fmoc-Thr-OH mit 3.3 eq (13.1 mg) HOBt und 3.3 eq (16.4 μ L) DIC am Harz gekoppelt (**AAV 5b**). Nach dem Abspalten der Fmoc-Schutzgruppe (**AAV 2**) werden 2.0 eq (36.8 mg) DOTA(tBu)₃ mit 2.5 eq (30.6 mg) HATU am Harz gekoppelt (**AAV 6a**). Nach 4.5 h Reaktionszeit wird das Peptid-Chelator-Konjugat vom Harz abgespalten (**AAV 8a**) und in Lösung mit 10 eq (81 mg) Iod zyklisiert (**AAV 7b**). Die Schutzgruppen werden mit 90% TFA/ 5% Thioanisol/ 5% H₂O während 4 h (**AAV 9a**) abgespalten und mittels präparativer HPLC gereinigt (HPLC, PS1/PG2). Man erhält 4.8 mg DOTA-Thr-TATE (**DS124**) mit einer Reinheit von >95%; dies entspricht einer Ausbeute von 9.7%. HPLC (AS1/AG1): 8.71 min. ESI-MS(+): 1597.1 (100, [M+CH₃CN+K]⁺); 1574.8 (89, [M+K]⁺); 1559.3 (22, [M+Na]⁺). ESI-MS(-): 1573.8 (100, [M+K]⁻); 1558.2 (33, [M+Na]⁻).

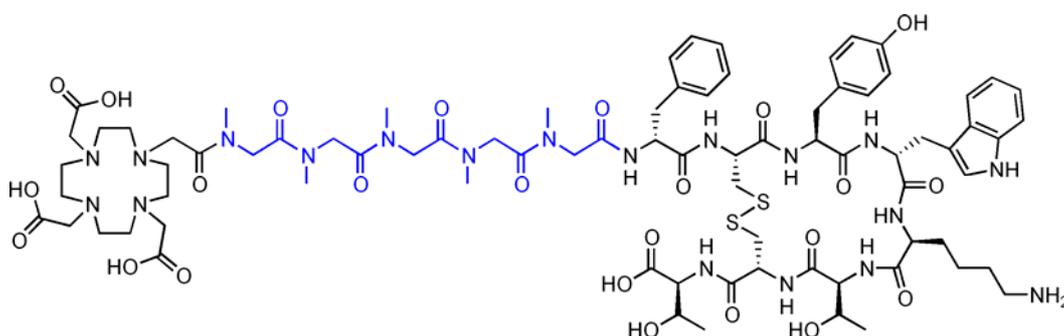
3.5.10 Pentasarcosine / Fmoc-Sar₅-OH



Synthese nach einer Laborvorschrift von J.S. Schmitt: Ausgehend von 9.5 g TCP-Harz (Belegung: 0.95 mmol/g) wird zuerst gemäss **AAV 1** das Harz mit 1.5 eq (4.2 g) Fmoc-Sar-OH beladen. Nach dem Abspalten der Fmoc-Schutzgruppe (**AAV 2**) wird an zwei Drittel des Fmoc-Sar-TCP-Harzes (6 g) 3.0 eq (1.96 g) Fmoc-Sar-OH mit 3.3 eq (0.936 g) HOBt und 3.3 eq (1.07 mL) DIC gekoppelt (**AAV 5b**) und anschliessend vom Harz abgespalten (**AAV 8a**). 2.4 eq (1.34 g) Fmoc-Sar₂-OH werden mit 2.7 eq (530 mg) HOBt und 2.7 eq (608 μ L) DIC an das restliche Drittel Harz (3.5 g) gekoppelt. Noch zweimal wird die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten und 3.0 eq (467 mg) Fmoc-Sar-OH mit 3.5 eq (236 mg) HOBt und 3.5 eq (271 μ L) DIC gekoppelt. Nach dem Abspalten vom Harz (**AAV 8a**) erhält man 359.4 mg **DS95** was einer Ausbeute von 42% entspricht. ESI-MS(+): 596.5 (100, [M+H]⁺). ESI-MS(-): 594.5 (40, [M]⁻); 372.3 (100, [M-Fmoc]⁻). ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ = 2.74 - 3.1 (m, 15H, N-CH₃),

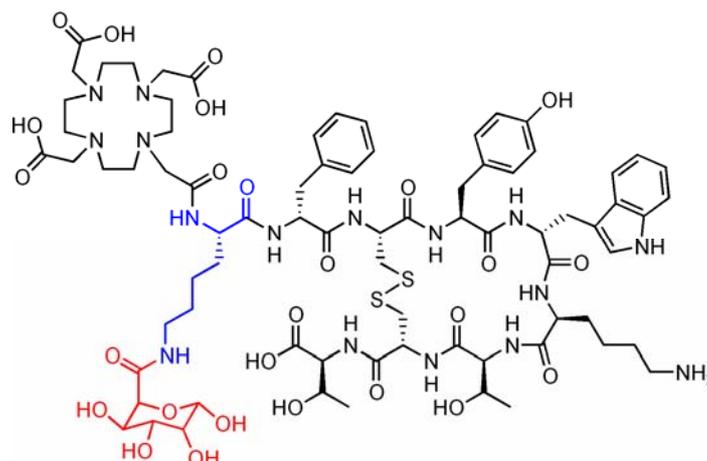
3.82 - 4.48 (m, 10H, -CO-CH₂-NR₂), 4.94 (m, 2H, R₂C-CH₂-O-), 5.22 (m, 1H, R₂-CH-CR), 7.14 - 7.96 (m, 8H, Ph). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ = 34.3, 34.7, 35.4 (N-CH₃), 46.4 (R₂-CH-R), 48.4, 48.8, 49.4, 49.6 (R-CH₂-R), 119.8, 124.9, 125.0, 127.0, 127.4, 128.0, 128.7, 140.6, 143.7 (Ph), 155.7 (-O-CO-NR₂), 166.5, 167.7, 167.9, 168.4, 168.8, 169.1, 170.3, 170.5 (R-CO-NR₂).

3.5.11 DOTA-Sar₅-TATE



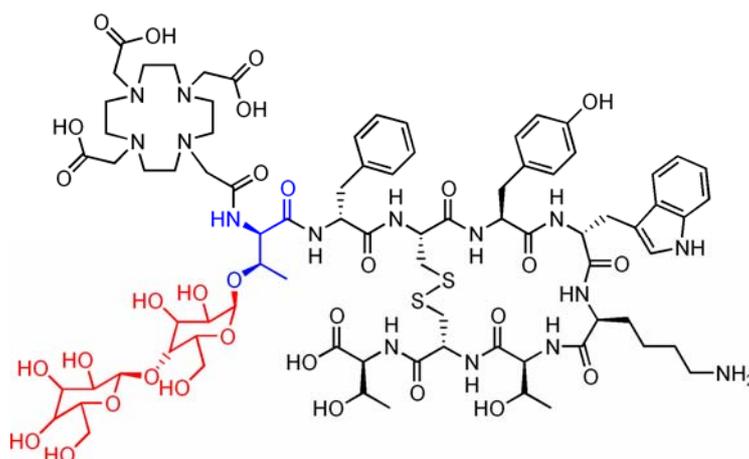
59 mg **DS2**-Harz werden dreimal mit DMF gewaschen, danach wird die Fmoc-Schutzgruppe entfernt (**AAV 2**) und 2.0 eq (18.2 mg) Fmoc-Sar₅-OH mit 2.5 eq (14.5 mg) HATU am Harz gekoppelt (**AAV 5a**). Nach dem Abspalten der Fmoc-Schutzgruppen (**AAV 2**) werden 2.0 eq (17.2 mg) DOTA(tBu)₃ mit 2.5 eq (14.3 mg) HATU am Harz gekoppelt (**AAV 6a**). Nach 5 h Reaktionszeit wird das Peptid-Chelator-Konjugat vom Harz abgespalten (**AAV 8a**) und in Lösung mit 10 eq (37.9 mg) Iod zyklisiert (**AAV 7b**). Die Schutzgruppen werden mit 90% TFA/ 5% Thioanisol/ 5% H₂O während 7 h (**AAV 9a**) abgespalten und mittels präparativer HPLC gereinigt (HPLC, PS1/PG2). Man erhält 2.5 mg DOTA-Sar₅-TATE (**DS110**) mit einer Reinheit von >95%; dies entspricht einer Ausbeute von 9.3%. HPLC (AS1/AG1): 9.04 min. MALDI-MS: 1790.6 (100, [M]⁺).

3.5.12 DOTA-Lys(Gluc)-TATE



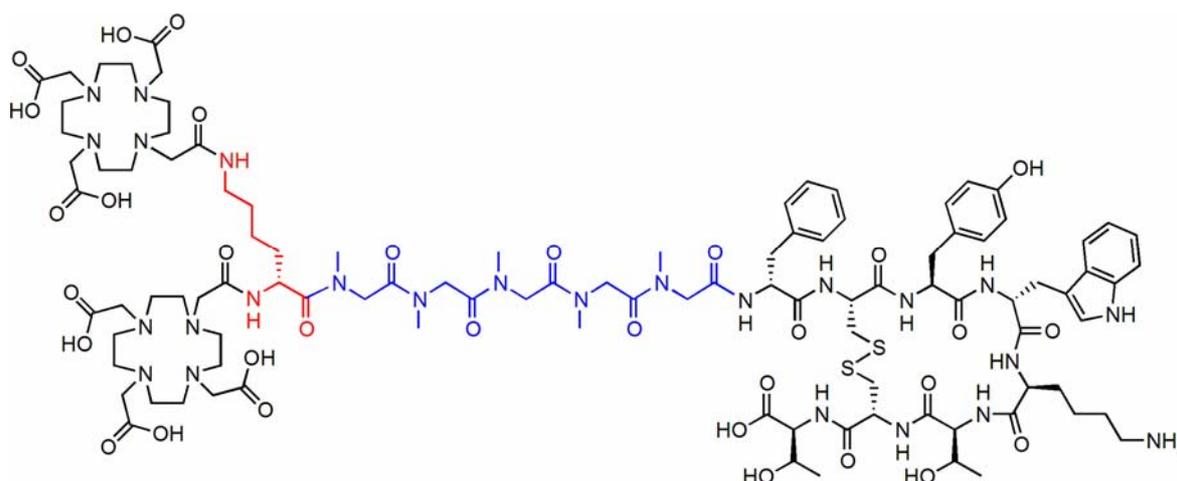
70 mg **DS2**-Harz werden dreimal mit DMF gewaschen, danach wird die Fmoc-Schutzgruppe entfernt (**AAV 2**) und 3.0 eq (17.8 mg) Fmoc-Lys(ivDde)-OH mit 3.3 eq (4.6 mg) HOBt und 3.3 eq (5.3 μ L) DIC am Harz gekoppelt (**AAV 5b**). Nach dem Abspalten der Fmoc-Schutzgruppe (**AAV 2**) werden 2.0 eq (12.2 mg) DOTA(tBu)₃ mit 2.2 eq (8.9 mg) HATU am Harz gekoppelt (**AAV 6a**). Nach 5 h Reaktionszeit wird die ivDde-Schutzgruppe abgespalten: Das Harz wird dreimal je 3 min mit 2% Hydrazin in DMF und danach dreimal mit DMF gewaschen. 3.0 eq (5.8 mg) Glucuronsäure, 3.2 eq (4.3 mg) HOBt und 3.2 eq (5.0 μ L) DIC werden über Nacht gekoppelt (**AAV 5b**), danach wird das Peptid-Chelator-Konjugat vom Harz abgespalten (**AAV 8a**) und in Lösung mit 10 eq (81 mg) Iod zyklisiert (**AAV 7b**). Die Schutzgruppen werden mit 90% TFA/ 5% Thioanisol/ 5% H₂O während 4 h (**AAV 9a**) abgespalten und mittels präparativer HPLC gereinigt (HPLC, PS1/PG2). Man erhält 0.9 mg DOTA-Lys(Gluc)-TATE (**DS89**) mit einer Reinheit von >95%; dies entspricht einer Ausbeute von 5.0%. HPLC (AS1/AG2): 22.06 min. MALDI-MS: 1772.2 (100, [M+33.5]⁺); 1740.2 (100, [M+H]⁺).

3.5.13 DOTA-Thr(Cellobiose)-TATE



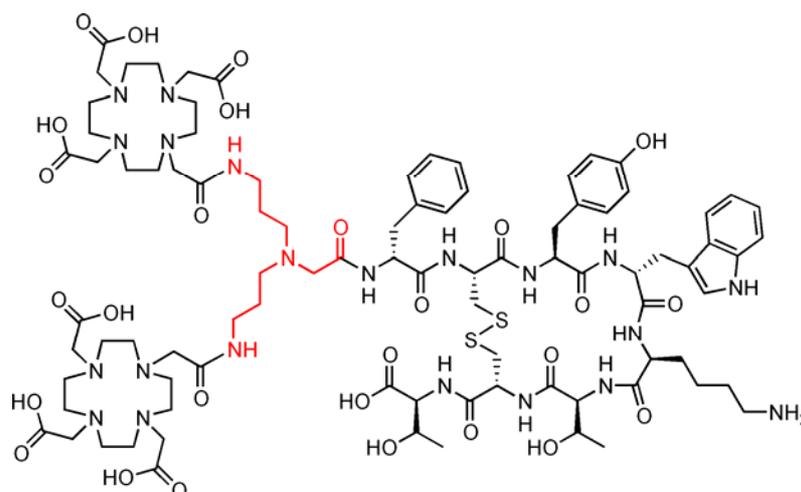
1.5 eq (21.6 mg) Fmoc-Thr(Cellobiose)-OH und 1.5 eq (8.6 mg) HATU werden in NMP gelöst und 15 min inkubiert, danach wird 1.0 eq (18.2 mg) Lys⁵(ivDde)-TATE zugegeben und während 5 h inkubiert (**AAV 6b**). Die Fmoc-Schutzgruppe wird durch Zugabe von THF/Triethylamin abgespalten. Nach 12 h Inkubationszeit wird die Abspaltung mittels Rotationsverdampfer entfernt. Danach werden 3.0 eq (12.9 mg) DOTA(tBu)₃ mit 3.3 eq (10 mg) HATU gekoppelt und 4.5 h inkubiert (**AAV 6b**). Die Acetyl- und ivDde-Schutzgruppen werden durch 15 min Inkubation mit einer Hydrazin/ Methanol/ H₂O (3/3/4)-Lösung abgespalten. Die restlichen säurelabilen Schutzgruppen werden mit 90% TFA/ 5% Thioanisol/ 5% H₂O während 5 h abgespalten (**AAV 9a**) und mittels präparativer HPLC gereinigt (HPLC, PS1/PG2). Man erhält 0.2 mg DOTA-Thr(Cellobiose)-TATE (**DS123**) mit einer Reinheit von >95%; dies entspricht einer Ausbeute von 1.4%. HPLC (AS1/AG1): 8.00 min. MALDI-MS: 1900.1 (10, [M+K]⁺); 1883.1 (10, [M+Na]⁺); 1861.1 (100, [M]⁺); 1474.8 (15, [M-DOTA]⁺).

3.5.15 DOTA-Lys(DOTA)-Sar₅-TATE



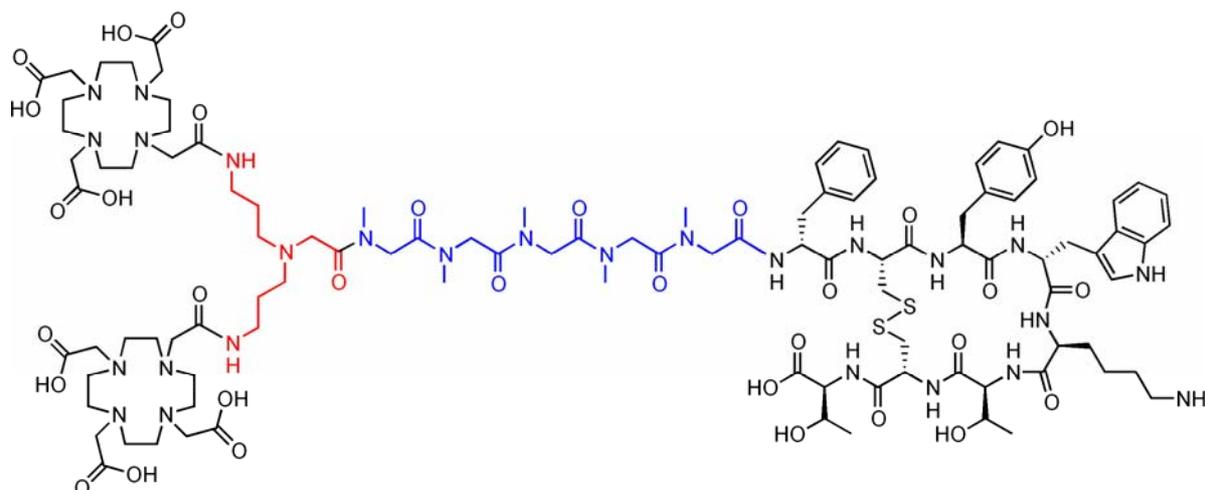
87.6 mg **DS2**-Harz werden dreimal mit DMF gewaschen, danach wird die Fmoc-Schutzgruppe entfernt (**AAV 2**) und 2.0 eq (27.2 mg) Fmoc-Sar₅-OH mit 2.5 eq (21.7 mg) HATU am Harz gekoppelt (**AAV 5a**). Nach dem Abspalten der Fmoc Schutzgruppen (**AAV 2**) werden 2.0 eq (25.7 mg) Fmoc-Lys(ivDde)-OH mit 2.5 eq (21.3 mg) HATU gekoppelt (**AAV 5a**). Die ivDde-Schutzgruppe wird durch dreimal 3 min Inkubation mit einer 2% Hydrazin/DMF-Lösung abgespalten, nach der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe (**AAV 2**) werden 4.0 eq (51.2 mg) DOTA(tBu)₃ mit 5.0 eq (42.6 mg) HATU am Harz gekoppelt (**AAV 6a**). Nach 5 h Reaktionszeit wird das Peptid-Chelator-Konjugat vom Harz abgespalten (**AAV 8a**) und in Lösung mit 10 eq (63.3 mg) Iod zyklisiert (**AAV 7b**). Die Schutzgruppen werden mit 90% TFA/ 5% Thioanisol/ 5% H₂O während 7 h (**AAV 9a**) abgespalten und mittels präparativer HPLC gereinigt (HPLC, PS1/PG2). Man erhält 1.2 mg DOTA-Lys(DOTA)-Sar₅-TATE (**DS112**) mit einer Reinheit von >95%; dies entspricht einer Ausbeute von 2.3%. HPLC (AS1/AG1): 8.27 min. MALDI-MS: 2327.3 (13, [M+Na]⁺); 2305.3 (100, [M]⁺).

3.5.16 DOTA₂-Apg-TATE



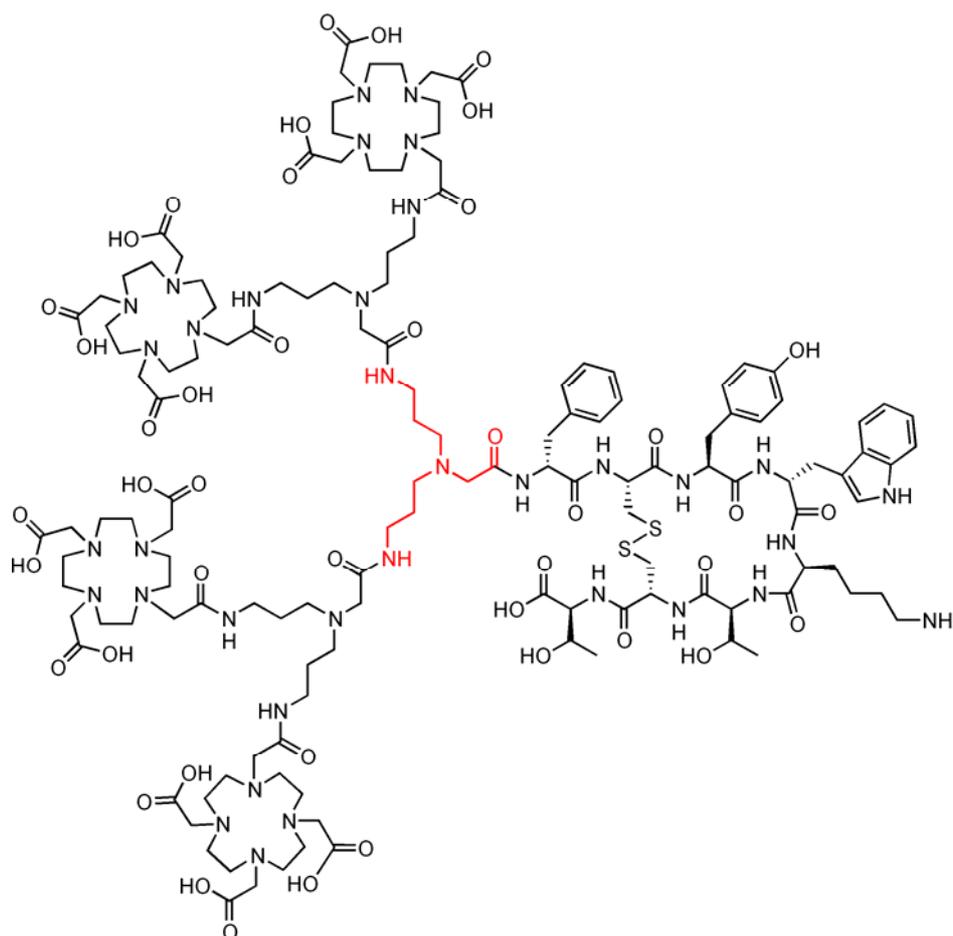
50 mg **DS2**-Harz werden dreimal mit DMF gewaschen, danach wird die Fmoc-Schutzgruppe entfernt (**AAV 2**) und 2.0 eq (21.1 mg) Fmoc₂-Apg-OH mit 2.5 eq (13.1 mg) HATU am Harz gekoppelt (**AAV 5a**). Nach dem Abspalten der Fmoc-Schutzgruppen (**AAV 2**) werden bezüglich Peptidmenge 4.0 eq (29.6 mg) DOTA(tBu)₃ mit 5.0 eq (24.2 mg) HATU am Harz gekoppelt (**AAV 6a**). Nach 5 h Reaktionszeit wird das Peptid-Chelator-Konjugat vom Harz abgespalten (**AAV 8a**) und in Lösung mit 10 eq (38.1 mg) Iod zyklisiert (**AAV 7b**). Die Schutzgruppen werden mit 90% TFA/ 5% Thioanisol/ 5% H₂O während 8 h (**AAV 9a**) abgespalten und mittels präparativer HPLC gereinigt (HPLC, PS2/PG2). Man erhält 1.6 mg DOTA₂-Apg-TATE (**DS77**) mit einer Reinheit von >95%; dies entspricht einer Ausbeute von 6.0%. HPLC (AS1/AG2): 20.84 min. MALDI-MS: 2015.0 (20, [M+Na]⁺); 1993.7 (100, [M]⁺).

3.5.17 DOTA₂-Apg-Sar₅-TATE



334.4 mg **DS2**-Harz werden dreimal mit DMF gewaschen, danach wird die Fmoc-Schutzgruppe entfernt (**AAV 2**) und 2.0 eq (71.3 mg) Fmoc-Sar₅-OH mit 2.5 eq (57 mg) HATU am Harz gekoppelt (**AAV 5a**). Nach dem Abspalten der Fmoc-Schutzgruppen (**AAV 2**) werden 2.0 eq (76.7 mg) Fmoc₂-Apg-OH mit 2.5 eq (47.3 mg) HATU gekoppelt (**AAV 5a**). Nach der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe (**AAV 2**) werden 4.0 eq (91.6 mg) DOTA(tBu)₃ mit 4.4 eq (66.9 mg) HATU am Harz gekoppelt (**AAV 6a**). Nach 4 h Reaktionszeit wird das Peptid-Chelator-Konjugat vom Harz abgespalten (**AAV 8a**) und in Lösung mit 10 eq (101 mg) Iod zyklisiert (**AAV 7b**). Die Schutzgruppen werden mit 90% TFA/ 5% Thioanisol/ 5% H₂O während 9 h (**AAV 9a**) abgespalten und mittels präparativer HPLC gereinigt (HPLC, PS1/PG2). Man erhält 25.5 mg DOTA₂-Apg-Sar₅-TATE (**DS98**) mit einer Reinheit von >95%; dies entspricht einer Ausbeute von 18.2%. HPLC (AS1/AG2): 19.48 min. MALDI-MS: 2370.9 (38, [M+Na]⁺); 2349.0 (100, [M]⁺).

3.5.18 DOTA₄-Apg₃-TATE



162.4 mg **DS2**-Harz werden dreimal mit DMF gewaschen, danach wird die Fmoc-Schutzgruppe entfernt (**AAV 2**) und 2.0 eq (38.5 mg) Fmoc₂-Apg-OH mit 2.2 eq (20.9 mg) HATU am Harz gekoppelt (**AAV 5a**). Nach dem Abspalten der Fmoc-Schutzgruppen (**AAV 2**) werden bezüglich Peptidmenge 4.0 eq (61.5 mg) Fmoc₂-Apg-OH mit 2.2 eq (33.4 mg) HATU am Harz gekoppelt (**AAV 5a**). Nach dem Abspalten der Fmoc Schutzgruppen (**AAV 2**) werden bezüglich Peptidmenge 8.0 eq (91.5 mg) DOTA(tBu)₃ mit 8.8 eq (66.9 mg) HATU am Harz gekoppelt (**AAV 6a**). Nach 5 h Reaktionszeit wird das Peptid-Chelator-Konjugat vom Harz abgespalten (**AAV 8a**) und in Lösung mit 10 eq (46.7 mg) Iod zyklisiert (**AAV 7b**). Die Schutzgruppen werden mit 90% TFA/ 5% Thioanisol/ 5% H₂O während 7 h (**AAV 9a**) abgespalten und mittels präparativer HPLC gereinigt (HPLC, PS2/PG2). Man erhält 1.3 mg DOTA₄-Apg₃-TATE (**DS72**) mit einer Reinheit von >95%; dies entspricht einer Ausbeute

Sar₅-TATE (**DS113**) mit einer Reinheit von >95%; dies entspricht einer Ausbeute von 1.7%. HPLC (AS1/AG2): 19.49 min. MALDI-MS: 3372.6 (50, [M+H+K]⁺); 3358.6 (27, [M+H+Na]); 3334.7 (100, [M+H]⁺).

3.6 Metallkomplexe der Chelator-Peptid-Konjugate

Zur Herstellung der Metallkomplexe der verschiedenen Chelator-Peptid-Konjugate wurde wie folgt vorgegangen: Ein Aliquot des jeweiligen Chelator-Peptid-Konjugats (0.1-1.4 μ mol, 1 mM) wird mit ca. 500 μ L Natriumacetatpuffer (0.4 M, pH 5.0) verdünnt. Anschliessend erfolgt die Zugabe eines 3-fachen Überschusses (pro Chelator) des jeweiligen Metallsalzes (10 mM InCl₃ /10 mM Y(NO₃)₃ /10 mM Gd(Ac)₃). Das Reaktionsgemisch wird bei 95°C 30 min inkubiert und nach dem Abkühlen auf eine zuvor konditionierte SepPak C-18-Kartusche (10 mL MeOH gefolgt von 20 mL Natriumacetatpuffer) aufgetragen. Das überschüssige Metall wird mit 10 mL Natriumacetatpuffer und das reine Peptid mit 10 mL MeOH eluiert. Die MeOH Fraktion wird dann mittels Zentrifugal-Verdampfer zuerst aufkonzentriert und dann entweder aus *tert*-Butanol oder H₂O lyophilisiert. Die Reinheit der so erhaltenen „kalten“ Metallkomplexe wird mittels analytischer HPLC (AS 1/AG 1,2) und MS überprüft und der Peptidgehalt spektroskopisch bestimmt (**AAV 10**).

Tabelle 5: Metallkomplexe der verschiedenen Chelator-Peptid-Konjugate.

Chelator-Peptid-Konjugat	Menge [μ mol]	Salz	Menge [μ mol]	MW [g/mol]	MALDI-MS
[In-DOTA]-TATE	1.40	InCl ₃	4.20	1547.42	1548.4 (100, [M+H] ⁺)
[Y-DOTA]-TATE	1.40	Y(NO ₃) ₃	4.20	1521.51	1522.2 (100, [M+H] ⁺)
[Gd-DOTA]-TATE	1.40	Gd(Ac) ₃	4.20	1589.85	1588.3 (100, [M+H] ⁺)
[In-DOTA]-Lys(Gluc)-TATE	0.10	InCl ₃	1.00	1850.6	1851.5 (14, [M+H] ⁺)
[Y-DOTA]-Lys(Gluc)-TATE	0.10	Y(NO ₃) ₃	1.00	1824.6	1825.4 (14, [M+H] ⁺)
[In-DOTA]-Lys([In-DOTA])-TATE	0.67	InCl ₃	3.60	2173.8	2174.8 (100, [M+H] ⁺)
[Y-DOTA]-Lys([Y-DOTA])-TATE	0.60	Y(NO ₃) ₃	3.60	2121.96	2122.8 (100, [M+H] ⁺)
[In-DOTA] ₂ -Apg-TATE	0.11	InCl ₃	0.63	2216.85	1133.9 (100, [M+Na] ²⁺)
[Y-DOTA] ₂ -Apg-TATE	0.11	Y(NO ₃) ₃	0.63	2165.03	2187.2 (43, [M+Na] ⁺), 2165.3 (100, [M] ⁺)

[In-DOTA] ₂ -Apg-Sar ₅ -TATE	0.68	InCl ₃	6.80	2572.2	2572.8 (100, [M] ⁺)
[Y-DOTA] ₂ -Apg-Sar ₅ -TATE	0.70	Y(NO ₃) ₃	4.20	2520.42	2521.2 (100, [M+H] ⁺)
[In-DOTA] ₄ -Apg ₃ -TATE	0.07	InCl ₃	0.84	3555.72	3556.0 (100, [M+H] ⁺)
[Y-DOTA] ₄ -Apg ₃ -TATE	0.07	Y(NO ₃) ₃	0.84	3452.07	3453.2 (100, [M+H] ⁺)
[In-DOTA] ₄ -Apg ₃ -Sar ₅ -TATE	0.14	InCl ₃	1.70	3912.12	3912.6 (71, [M] ⁺)
[Y-DOTA] ₄ -Apg ₃ -Sar ₅ -TATE	0.14	Y(NO ₃) ₃	1.70	3808.3	3808.6 (70, [M] ⁺)
[Gd-DOTA] ₄ -Apg ₃ -Sar ₅ -TATE	1.40	Gd(Ac) ₃	22.4	4081.85	4080.9 (38, [M-H] ⁺), 3483.8 (100, [M-Gd ₄] ⁺)
[In-DOTA] _{4-LIN} lys ₃ -Sar ₅ -TATE	0.60	InCl ₃	10.9	3781.9	3782.1 (100, [M+H] ⁺)

3.7 Kitformulierung für [^{99m}Tc/EDDA/Tricine-HYNIC]-Derivate

Für die Markierung der HYNIC-Derivate mit Pertechnetat ^{99m}TcO₄⁻ wurde ein 2-Stufen-Kit hergestellt. Alle Lösungen werden zuerst steril filtriert und danach in einer Laminar- Flowbox verarbeitet.

Kit 1: In einem sterilen Eluatfläschchen werden 1.0 mL einer 0.1 M Tricine-Lösung vorgelegt, 100 µL einer 0.1 mM HYNIC-Lösung dazu gegeben, mit flüssigen Stickstoff eingefroren und mit Argongas gespült. Danach werden 25 µL einer 7 mM Zinn-(II)-chlorid Lösung in 0.1 M HCl zugegeben.

Kit 2: In ein zweites Eluatfläschchen werden 0.5 mL einer 56.8 mM EDDA-Lösung pH 7.0 gegeben und mit flüssigem Stickstoff eingefroren.

Die gefrorenen Eluatfläschchen werden lyophilisiert und danach unter Vakuum mit einem Gummistopfen verschlossen.

Zusammensetzung der Kits:

HYNIC-Kits: **20 µg** HYNIC-TATE, HYNIC-TOC oder HYNIC-OC

15 mg Tricine (83.7 µmol)

40 µg SnCl₂ · 2 H₂O (177 nmol)

EDDA-Kit: **5 mg** EDDA (28.4 µmol)

Für eine noch einfachere und effizientere Markierung werden 1-Stufen-Kits von HYNIC-TATE hergestellt. Dabei werden alle Kit-Bestandteile in ein einzelnes Eluatfläschchen gegeben, eingefroren und lyophilisiert.

Zusammensetzung des Kits:

20 µg	HYNIC-TATE (16.9 nmol)
15 mg	Tricine (83.7 µmol)
40 µg	SnCl ₂ · 2 H ₂ O (177 nmol)
5 mg	EDDA (28.4 µmol)

3.8 Markierprotokolle

3.8.1 Kit-Markierung der HYNIC-Derivate

2-Stufen-Kit: Der EDDA-Kit wird mit 0.5 mL physiologische NaCl-Lösung rekonstituiert und zum HYNIC-Kit gegeben. Nach Zugabe von 1 GBq ^{99m}TcO₄⁻ in 0.5 mL NaCl-Lösung wird bei 95°C 10 min inkubiert und anschliessend 15 min abgekühlt. Zur Bestimmung der radiochemischen Reinheit werden 5 µL der Markierlösung in 1 mL NaCl gelöst und mittels analytischer HPLC (AS 1/AG 3) und Dünnschichtchromatographie (Kieselgel auf einer Glasplatte; Laufmittel: Pyridin/ Essigsäure/ H₂O; 5/ 3/ 1.5) analysiert.

1-Stufen-Kit: Zum Kit wird 1 GBq ^{99m}TcO₄⁻ in 0.5 mL NaCl-Lösung zugegeben, bei 95°C 10 min inkubiert und anschliessend 15 min abgekühlt. Die Bestimmung der radiochemischen Reinheit wird analog dem 2-Stufen-Kit durchgeführt.

Markierung für Internalisierungs- und Bioverteilungsexperimente: Die Markierung verläuft wie oben erwähnt; nach der Bestimmung der radiochemische Reinheit wird die Markierlösung entsprechend dem Experiment verdünnt. Für Internalisierungs-Experimente wird die Markierlösung mit physiologischer NaCl-Lösung (+1% BSA) verdünnt (Internalisierungskonzentration 16.7 nM; 2.5 pmol in 150 µL). Für die Bioverteilungs-

Experimente wird die Markierlösung in physiologischer NaCl-Lösung (+1% HSA) verdünnt (Konzentration 1.75 nM; 0.35 pmol in 200 µL).

3.8.2 Markierung mit Technetium-Carbonylen

a. Herstellung der aktiven Spezies $(42,120)_{fac}\text{-}[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$

Zur Herstellung wird ein so genannter „Technetium-Carbonyl-Kit“ (IsoLink[®], Mallinckrodt) verwendet. Zum Markieren werden 300 MBq $^{99m}\text{TcO}_4^-$ in 1 mL physiologischer NaCl-Lösung zum Kit gegeben und bei 95°C 20 min inkubiert. Nach dem Abkühlen im Eisbad werden 300 µL Puffer-Lösung (1 M Phosphatpuffer pH 7.4 / 1 N HCl (1:2)) zugegeben, um den pH auf etwa 7 einzustellen. Zur Bestimmung der radiochemischen Reinheit werden 5 µL der Markierlösung in 1 mL NaCl gelöst und mittels analytischer HPLC (AS 1/AG 5) analysiert.

b. Markierung des Radiopharmakons:

Zu einem Aliquot des jeweiligen Chelator-Peptid-Konjugats (10 µL, 1 mM) wird $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ (spezifische Aktivität ~3 Ci/µmol) gegeben und 30 min bei 95°C inkubiert. Nach dem Abkühlen wird die Markierausbeute mittels HPLC (AS 1/ AG 5) bestimmt.

3.8.3 Markierung von DTPA-Octreotide

Zu einem Aliquot DTPA-OC (37.5 µL, 1 mM) und Ammoniumacetat Puffer (150 µL, 0.25 M, pH 5.5) wird ^{111}In (1.4 mCi) gegeben und 30 min bei RT inkubiert. Nach dem Abkühlen wird die radiochemische Reinheit mittels analytischer HPLC (AS 1/ AG 1) bestimmt. Für Internalisierungs-Experimente wird die Markierlösung mit physiologischer NaCl-Lösung (+1% BSA) verdünnt (16.7 nM/ 2.5 pmol in 150 µL) und für Bioverteilungs-Experimente wird die Markierlösung in physiologischer NaCl-Lösung (+1% HSA) verdünnt (1.75 nM/ 0.35 pmol in 200 µL).

3.8.4 Markierung von DOTA-Peptid-Konjugaten

Zu einem Aliquot des jeweiligen DOTA-Peptid-Konjugats (10 μL , 1 mM) und Ammoniumacetat-Puffer (150 μL , 0.25 M, pH 5.5) wird ^{111}In , ^{90}Y oder ^{153}Gd (spezifische Aktivität 37 GBq/ μmol) gegeben und bei 95°C 30 min inkubiert. Nach dem Abkühlen wird die Markierausbeute mittels analytischer HPLC (AS 1/ AG 1) bestimmt. Für Bioverteilungs-Experimente wird die Markierlösung entsprechend mit physiologischer NaCl-Lösung (+1% HSA) verdünnt (1.75 nM/ 0.35 pmol in 200 μL).

Markierung der DOTA-Peptid-Konjugate für Internalisierungen: Zu einem Aliquot des jeweiligen DOTA-Peptid-Konjugats (10 μL , 1 mM) und Ammoniumacetat-Puffer (150 μL , 0.25 M, pH 5.5) wird ^{111}In , ^{90}Y oder ^{153}Gd (spezifische Aktivität 37 GBq/ μmol) gegeben und bei 95°C 30 min inkubiert. Danach wird ein 3-facher Überschuss pro Chelator InCl_3 , $\text{Y}(\text{NO}_3)_3$ oder $\text{Gd}(\text{Ac})_3$ zugegeben und nochmals 30 min bei 95°C inkubiert. Nach dem Abkühlen wird die Markierlösung auf eine zuvor konditionierte SepPak C-18-Kartusche (Konditionieren: 10 mL MeOH und 20 mL Natriumacetatpuffer (0.1 M, pH 5.0)) aufgetragen. Die Kartusche wird zuerst mit 10 mL Natriumacetatpuffer eluiert, danach mit 2-3 mL MeOH. Die MeOH Fraktion, die das markierte Peptid enthält, wird mittels N_2 -Gas und Föhn eingengt. Der Rückstand wird in physiologischer NaCl-Lösung (+1% BSA) aufgenommen und entsprechend verdünnt (16.7 nM, 2.5 pmol in 150 μL), die radiochemische Reinheit wird mittels analytischer HPLC (AS1/ AG1, 2) bestimmt.

3.9 Serumstabilitätsstudien

Für die Bestimmung der Stabilität von Chelator-Peptid-Konjugaten werden diese in menschlichem Blutserum bei 37°C inkubiert. Die Konzentration entspricht einer diagnostischen Applikation der Konjugate im Menschen (10 μg in 3 L Blutserum). 5 pmol des markierten Chelator-Peptid-Konjugats werden in 3 mL Blutserum im Zellbrutschrank bei

37°C/ 5% CO₂ inkubiert. Nach festgelegten Zeitpunkten werden 100 µL Serum entnommen, durch Zugabe von 200 µL Ethanol die Proteine gefällt und anschliessend 15 min zentrifugiert (1800 g). Der Überstand wird mittels analytischer HPLC analysiert. Der ausgefallene Serumproteinrest (Pellet) wird im NaI(Tl)-Gamma-Counter gemessen, um den proteingebundenen Anteil des Chelator-Peptid-Konjugates zu bestimmen.

3.10 Internalisierung mit AR4-2J-Tumorzellen

In einer Zellkulturplatte mit 6 Löchern „6-well-plate“ werden jeweils 10⁶ AR4-2J-Tumorzellen (Rattenpankreas-Tumorzellen) zugegeben, mit 3 mL Medium (DMEM/ 1% FCS) aufgefüllt und über Nacht bei 37°C/ 5% CO₂ inkubiert. Kurz vor dem Versuch wird der fixierte Zellteppich zweimal mit Medium (DMEM/ 1% FCS) gewaschen und jedes Loch anschliessend mit 1.2 mL Medium aufgefüllt. Nach einer weiteren Stunde Inkubation bei 37°C/ 5% CO₂ im Brutschrank sind die Zellen bereit für den Internalisierungsversuch (64, 121).

In die eine Hälfte der Zellkulturplatte werden jeweils 150 µL/ well einer 1 µM Octreotide-Lösung gegeben, in die andere Hälfte 150 µL/ well Medium (DMEM/ 1% FCS). Danach werden in alle Löcher 150 µL des markierten Radiopeptids gegeben und im Zellbrutschrank bei 37°C/ 5% CO₂ inkubiert.

Nach bestimmten Zeitpunkten (30 min/ 1 h/ 2 h/ 4 h) wird die betreffende Zellkulturplatte auf Eis gelegt, um die Internalisierung zu stoppen. Das Medium wird abpipettiert, die Zellen noch zweimal mit 1 mL kalter Phosphatpuffer-Lösung (PBS, pH 7.2) gewaschen; alle Fraktionen werden gesammelt und ergeben so den nicht gebundenen, freien Peptidanteil (**A**, Abbildung 25). Die Zellen werden danach zweimal mit 1 mL Glycin-Pufferlösung (0.05 M Glycin, pH 2.8) jeweils 5 min bei 0°C inkubiert; diese Fraktionen werden ebenfalls gesammelt, daraus ermittelt sich der rezeptorgebundene Peptidanteil (**B**, Abbildung 25). Zum Schluss werden die Zellen 10 min mit 1 mL 1 M Natriumhydroxid-Lösung bei 37°C inkubiert und noch zweimal mit 1 mL nachgewaschen. Die nun vom Boden abgelösten Zellen entsprechen dem

internalisierten Peptidanteil (C, Abbildung 25). Alle Fraktionen werden in separaten Röhrcchen gesammelt und einzeln mit einem Gamma-Counter gemessen.

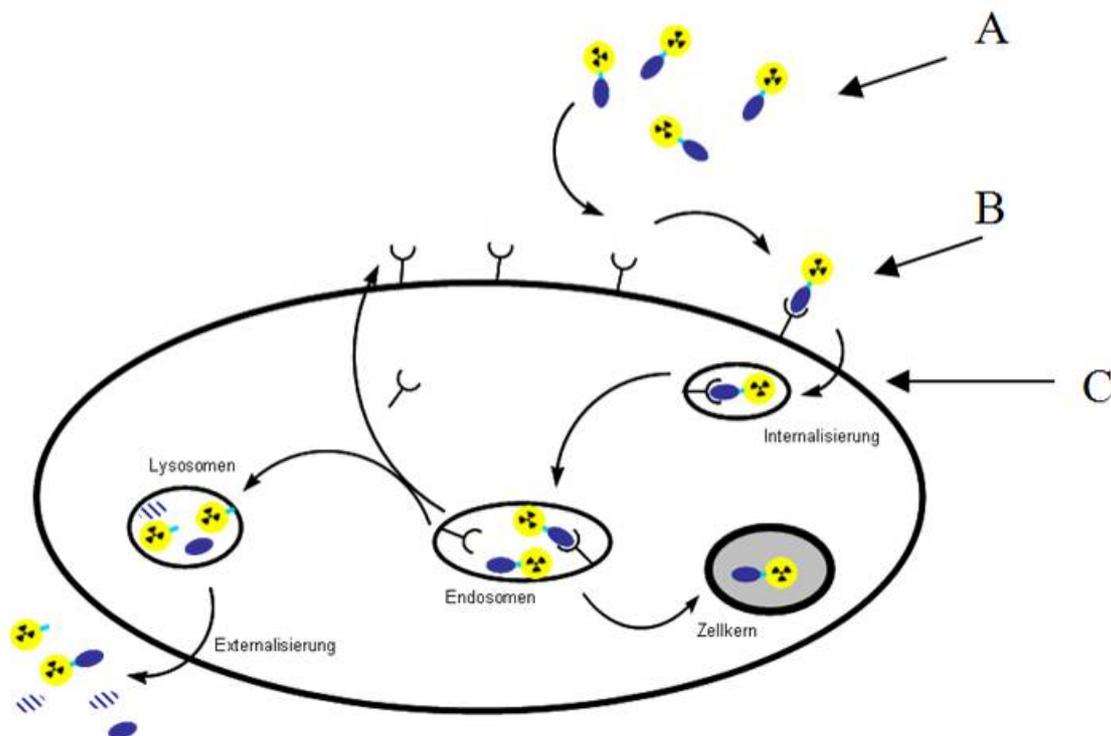


Abbildung 25: Schematische Darstellung einer rezeptor-vermittelten Endozytose (Internalisierung): Nach der Bindung des Radioliganden an den Rezeptor wird der Rezeptor-Ligand-Komplex internalisiert und ergibt intrazelluläre Vesikel. In den Endosomen werden unter sauren Bedingungen die Liganden von den Rezeptoren getrennt. Die Rezeptoren werden rezykliert, die Liganden werden entweder an das Target (z.B. Zellkern) gebracht oder in die Lysosomen transportiert, rezykliert und ausgeschieden.

Zur Berechnung der rezeptorspezifischen Internalisierung wird die Differenz aus den Werten mit und ohne Überschuss an Octreotide bestimmt. Um die Internalisierungswerte miteinander vergleichen zu können, werden die Werte zusätzlich normiert. Dazu wird die Zellzahl in einer Zellkulturplatte bestimmt. Die so erhaltenen Werte entsprechen einer rezeptorspezifischen Internalisierung in Prozent der eingesetzten Menge pro Million Zellen (Abbildung 26).

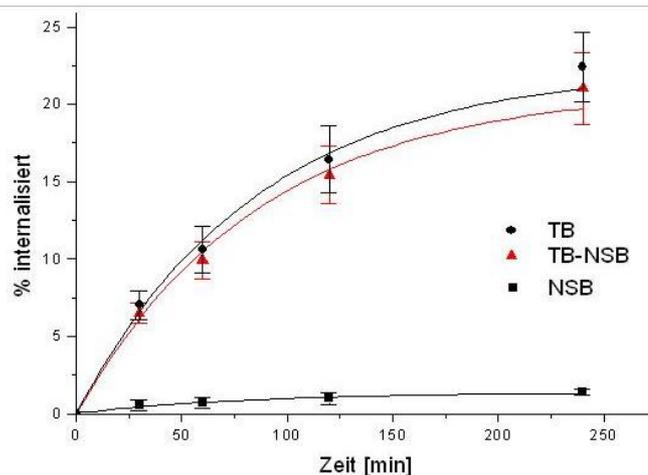


Abbildung 26: Internalisierung von [^{111}In -DOTA]-TATE; TB (=Total Binding) totale Menge an Internalisierung, NSB (Non Specific Binding) Menge an nicht-rezeptorspezifischer Internalisierung, TB-NSB entspricht der rezeptorspezifischen Internalisierung. Die Standardabweichung berechnet sich aus mindestens 3 Messwerten.

3.11 Externalisierung

Um die Externalisierung eines Peptid-Chelator-Konjugats zu bestimmen, wird eine Zellkulturplatte gemäss Kapitel 3.10 bearbeitet (Inkubationszeit normalerweise 2 h); das freie, nicht-gebundene Peptid und das rezeptor-gebundene Peptid werden entfernt. Danach werden in die 6 Löcher der Platte jeweils 3 mL Medium (DMEM/ 1% FCS) zugegeben und im Zellbrutschrank bei 37°C/ 5% CO₂ inkubiert. Nach bestimmten Zeitpunkten (5'/ 10'/ 15'/ 20'/ 25'/ 30'/ 45'/ 60'/ 90' und 120') wird das Medium entnommen und frisches Medium wieder zugegeben. Nach dem letzten definierten Zeitpunkt werden die Zellen mit 1 mL 1 M Natriumhydroxid-Lösung bei 37°C 10 min inkubiert und zweimal mit 1 mL nachgewaschen. Die einzelnen Fraktionen werden anschliessend am Gamma-Counter gemessen. Der 100% Wert entspricht der Summe aller Externalisierungsfractionen und der NaOH Fraktion.

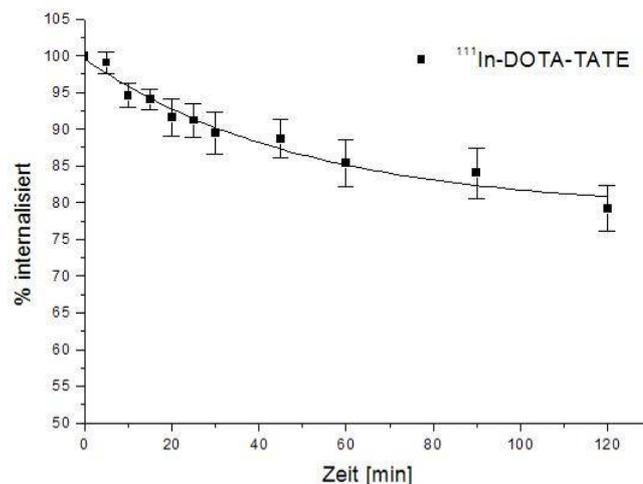


Abbildung 27: Externalisierung von [^{111}In -DOTA]-TATE; 100% entsprechen der internalisierten Substanz nach 2 h. Die Standardabweichung berechnet sich aus mindestens 3 Messwerten.

Zusätzlich werden einzelne Fraktionen der Externalisierung (Abbildung 27) mittels analytischer HPLC analysiert, um zu bestätigen, dass das Peptid im Medium noch intakt ist.

3.12 Bioverteilung

Für die Bioverteilung werden 6 Wochen alte männliche Lewis Ratten verwendet. Diesen Ratten werden unter Narkose (3 vol% Isofluran/ 0.6 L O_2/min) 10^7 AR4-2J-Tumorzellen subkutan in den Oberschenkel oder in die Flanke injiziert. Nach 10-14 Tagen sind die Tumoren genügend gross (\varnothing 0.5-1.0 cm), um für Bioverteilungsexperimente verwendet werden zu können.

0.35 nmol des betreffenden Radioliganden werden in maximal 200 μL Volumen den Ratten unter Narkose in die „Vena Saphena Magna“ injiziert. Zur Bestimmung von nichtspezifischer Anreicherung im Tumor und in sstr-positiven Organen werden einer Kontrollgruppe von 3-4 Ratten zusätzlich jeweils 100 μg Tyr³-Octreotide koinjiziert. Nach bestimmten Zeitpunkten (1 h/ 4 h/ 24 h) werden jeweils Gruppen von 3-4 Tieren getötet, bestimmte Organe entnommen, gewogen und anschliessend mit dem Gamma-Counter gemessen. Bei der Auswertung werden die gemessenen Aktivitäten der Organe normiert auf die total injizierte Dosis pro Ratte und

pro Gramm Gewebe (% i.D./ g Gewebe). Alle Tierversuche werden gemäss den Vorschriften des Bundesamtes für Veterinärwesen (Gesuch 789) durchgeführt.

3.13 Bioverteilung-Cocktail-Experiment

Gemäss den Ideen der Stiftung „Forschung 3R“ (Reduce, Refine, Replace/ Vermindern, Verbessern, Vermeiden) geht es darum, die Anzahl Tiere pro Versuch zu reduzieren. In einem so genannten Cocktail-Experiment werden pro Tier mehrere Substanzen gleichzeitig appliziert. Die Substanzen sind mit Radionukliden mit unterschiedlichen γ -Energien markiert, was es anschliessend möglich macht, die verschiedenen Substanzen zu unterscheiden. Die folgenden Kombinationen von Radionukliden werden hauptsächlich benutzt:

- ^{99m}Tc (140 keV) und ^{111}In (171 keV & 245 keV)
- ^{111}In (171 keV & 245 keV) und ^{177}Lu (113 keV & 208 keV)
- ^{111}In (171 keV & 245 keV), ^{88}Y (898 keV) und ^{177}Lu (113 keV & 208 keV)

Da die gesamte Menge an applizierter Substanz auf 0.35 nmol beschränkt ist, wird bei Cocktail-Experimenten mit 2 verschiedenen Radionukliden jeweils nur 0.175 nmol Radiopeptid verabreicht.

4. Resultate und Diskussion

4.1 Technetium-99m-markierte Derivate

4.1.1 Synthese von HYNIC-Derivaten

Die Synthese der Peptidsequenzen Tyr³-Octreotide (TOC) und Tyr³-Thr⁸-Octreotide (TATE) wurden an der Festphase mittels Fmoc-Strategie aufgebaut, alle Seitenketten der Aminosäuren besitzen orthogonale Schutzgruppen. Als Kopplungsreagenzien wurde HOBt und DIC verwendet (Abbildung 4).

Zuerst wurde das Harz mit der ersten Aminosäure Fmoc-Thr-OH belegt, danach wurde das Harz im Reaktorgefäß mit einer Filterfritte in einem halbautomatischen Peptidsynthesizer vorgelegt. Das Steuerprogramm (**AAV 3**) des Peptidsynthesizers steuert die Zugabe der verschiedenen Lösungsmittel, die Inkubationszeiten und die Entfernung der Lösungsmittel mittels Vakuum.

Da die Festphase in unterschiedlichen Lösungsmitteln ein unterschiedliches Quellverhalten aufweist, musste das Harz zuerst mit DMF gewaschen werden. Danach wurden mit einer 20%igen Piperidin-DMF-Lösung die Fmoc-Schutzgruppen abgespalten. Das abgespaltene Dibenzofulven-Piperidin-Addukt (*122*) wurde gesammelt, mit Ethanol verdünnt und mittels UV-Vis-Spektrophotometrie ($\lambda=300$ nm/ $\epsilon=7800$) gemessen und die Konzentration bestimmt. Die entsprechende Aminosäure wurde während 15-30 Minuten mit den Kopplungsreagenzien vorinkubiert, dann wurde mittels Zugabe von DIPEA der pH auf 7-8 eingestellt und zum Harz gegeben. Nach einer Reaktionszeit von üblicherweise 60-90 Minuten wurde das Harz mehrere Male mit DMF gewaschen. Zur Reaktionskontrolle wurde ein Kaiser-Test (**AAV 4**) durchgeführt, der selektiv kleinste Mengen primärer und sekundärer Amine anzeigt.

Die Synthese der Substanzen HYNIC-OC und HYNIC-TOC wurden ursprünglich von Pia Powell und Martin Béhé durchgeführt: das Seitenketten-geschützte Peptid wurde am Harz

aufgebaut, danach vom Harz abgespalten und in Lösung mit Iod zyklisiert. Der Chelator wurde dann mit HATU (113) als Kopplungsreagenz an das Seitenketten-geschützte Peptid in Lösung gekoppelt. Zum Entfernen der tert-Butyl- und BOC-Schutzgruppen wurde das Chelator-Peptid-Konjugat mit TFA inkubiert, als Radikalfänger (Scavenger) wurden Wasser und Thioanisol zugegeben. Die Produkte wurden anschliessend mittels präparativer HPLC gereinigt und lyophilisiert. Die Ausbeute an HYNIC-TOC betrug 30% und von HYNIC-OC 20% (112).

Ausgehend von den Laboraufzeichnungen von Pia Powell und Martin Béhé wurden die Reaktionsschritte optimiert und auch vereinfacht. Die Zyklisierungsreaktion wurde mit $Tl(TFA)_3$ am Harz durchgeführt, wodurch sich der Ablauf vereinfacht und beschleunigt, da es keine zeitraubende Aufreinigung braucht. Weiter wurde die Inkubationszeit des Seitenketten-geschützten Peptids zur Abspaltung der säurelabilen Schutzgruppen zeitlich verkürzt. Probeinkubationen von HYNIC-TOC mit TFA ergaben bei der Analyse mittels analytischer HPLC eine rasche Zersetzung des Produkts (Abbildung 28). Eine Entschützungslösung bestehend aus 90% TFA, 5% H_2O und 5% Thioanisol, und eine Inkubationszeit von 30 min bei $0^\circ C$ hat sich als ideal erwiesen.

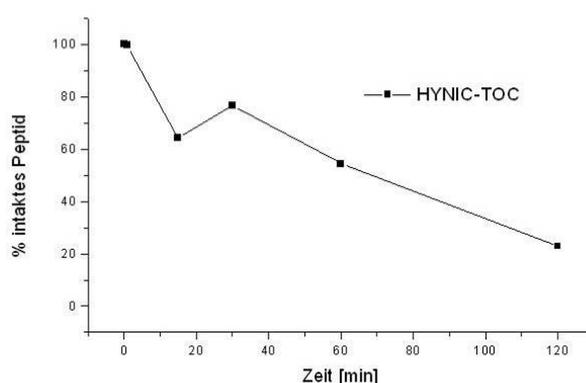


Abbildung 28: Überprüfung der Stabilität mittels analytischer HPLC von HYNIC-TOC inkubiert mit TFA.

Eine weitere Optimierung stellt das modifizierte Octreotide-Derivat TATE dar. Hierbei wurde neben der Modifikation an der dritten Stelle des Peptides (Tyr^3 anstelle Phe^3) zusätzlich das

endständige Threoninol durch ein Threonin ausgetauscht. Diese Modifikationen erhöhen die Hydrophilie des Peptides weiter, wodurch eine bessere Ausscheidung durch die Nieren erwartet wird.

Die Synthese von HYNIC-TATE wurde auf zwei alternative Weisen durchgeführt: einmal gemäss der Standardmethode wie sie für HYNIC-TOC beschrieben wurde, um einen Referenz-Wert zu erhalten (112), und zum anderen gemäss einer neuen und einfacheren Festphasen-Methode.

Die Synthese entsprechend der Standardmethode ergab nach der Reinigung mittels präparativer HPLC eine Ausbeute von 7.7%. Die Festphasen-Methode beschleunigte und vereinfachte den Arbeitsablauf enorm. Dabei wurde das vollgeschützte Peptid wiederum am Harz aufgebaut, dann an der Festphase das Peptid mit $\text{Ti}(\text{TFA})_3$ zyklisiert, ohne weitere Aufreinigung wurde nach der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe HYNIC-Boc mittels HATU ans Peptid gekoppelt. Die Abspaltung vom Harz und die anschliessende Entschützung wurden in einen einzigen Schritt zusammengefasst; das Harz wurde 40 min bei 0°C mit $\text{TFA}/\text{H}_2\text{O}/\text{Thioanisol}$ inkubiert, anschliessend in Diethylether/ Toluol gefällt und mittels präparativer HPLC gereinigt. Nach dem Lyophilisieren erhielt man eine Ausbeute von 11.6%.

4.1.2 Bestimmung des Extinktionskoeffizienten von HYNIC

Für die Anwendung der synthetisierten Substanzen und Herstellung von Kits ist es wichtig, die genaue Konzentration einer Peptidlösung zu kennen. Verschiedene Methoden wurden von Axel Heppeler (123) beschrieben. Eine einfache und sehr elegante Methode ist die Messung der UV-Absorption des Peptids, sofern der Extinktionskoeffizient (ϵ) bekannt ist.

Tryptophan ($5050 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (280 nm)), Tyrosin ($1440 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (274 nm)) und Phenylalanin ($220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (257 nm)) besitzen wegen ihrer aromatischen Ringe eine Absorptionsbande im ultravioletten Bereich. Axel Heppeler hat durch die Einwaage der einzelnen Aminosäuren die molaren Extinktionskoeffizienten von verschiedenen Chelator-Peptid-Konjugaten

experimentell bestimmt. Ergänzend wurden HYNIC und HYNIC-Boc, die ebenfalls eine Absorptionsbande im ultravioletten Bereich haben, eingewogen und die entsprechende UV Absorption bei $\lambda=280$ nm bestimmt.

Tabelle 6 zeigt die molaren Extinktionskoeffizienten einer Auswahl häufig verwendeter Chelator-Peptid-Konjugate.

Tabelle 6: Experimentell bestimmte molare Extinktionskoeffizienten bei $\lambda=280$ nm.

Peptid	ϵ_{280} (obs) [$M^{-1}cm^{-1}$]
DOTA-OC	6575
DOTA-TOC / TATE	6849
HYNIC-Boc	2020
HYNIC	5070
HYNIC-OC	11645
HYNIC-TOC / TATE	11919

4.1.3 Internalisierung von HYNIC-Derivaten

Bei der Internalisierung werden verschiedene radioaktiv markierte Radiopharmaka miteinander verglichen. Koenig et al. (124) erklären ihre Internalisierungsexperimente mit radioiodierten Peptiden wie folgt: Das Radiopeptid bindet an die Rezeptoren der Zellen. Sobald die Konzentration an Radiopeptiden an der Zelloberfläche einen gewissen Wert überschritten hat, wird der Radiopeptid-Rezeptor-Cluster internalisiert (via Endozytose). Das Radiopeptid gelangt via Endosomen zu einem Teil in die Lysosomen und wird abgebaut, ein anderer Teil wird intakt wieder ausgeschieden (via Exozytose).

Die zur Internalisierung verwendete Zelllinie AR4-2J wurde aus Ratten-Pankreastumoren isoliert und besitzt hauptsächlich nur Somatostatinrezeptoren des Subtyps 2 (sst2) (125). Jeweils 1 Million Zellen wurden mit radioaktiv markiertem Peptid in 1.5 mL Medium bei 37°C inkubiert (2.5 pmol/ well, 1.67 nM). In Tabelle 8 sind die Resultate der rezeptorspezifischen Internalisierung aufgezeigt. Die mit ^{99m}Tc markierten HYNIC-Derivate

werden mit [^{111}In -DTPA]-Octreotide verglichen. Das kommerziell erhältliche Octreoscan[®] gilt als Referenzsubstanz für die Diagnostik von neuroendokrinen Tumoren.

Tabelle 7: Rezeptorspezifische Internalisierung von [^{111}In -DTPA]-Octreotide und verschiedenen $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-Derivaten (10^6 AR4-2J Tumorzellen / 1.67 nM) in % i.D. \pm Standardabweichung.

Zeit [min]	[^{111}In -DTPA]-OC (Octreoscan [®])	[$^{99\text{m}}\text{Tc}$ /EDDA/Tricine/ HYNIC]-OC	[$^{99\text{m}}\text{Tc}$ /EDDA/Tricine/ HYNIC]-TOC	[$^{99\text{m}}\text{Tc}$ /EDDA/Tricine/ HYNIC]-TATE
30	0.2 \pm 0.2	0.3 \pm 0.2	2.4 \pm 1.1	6.0 \pm 0.6
60	0.3 \pm 0.2	0.5 \pm 0.2	5.1 \pm 3.4	9.5 \pm 1.5
120	1.5 \pm 0.9	1.1 \pm 1.0	6.0 \pm 2.3	12.0 \pm 0.9
240	4.0 \pm 1.5	2.2 \pm 0.7	11.9 \pm 3.2	18.8 \pm 2.7
360		3.4 \pm 1.0	16.3 \pm 4.1	24.3 \pm 0.3

Alle hier verglichenen Substanzen zeigen eine rezeptorspezifische Internalisierung. Der Anteil nicht-spezifischer Internalisierung lag bei allen Substanzen unter 1.5%. Zu allen Zeitpunkten zeigt sich ein signifikanter Unterschied der Internalisierungswerte der verschiedenen HYNIC-Derivate. Nach 4h sind 4.0% [^{111}In -DTPA]-OC internalisiert, was keinem signifikanten Unterschied zu [$^{99\text{m}}\text{Tc}$ /EDDA/Tricine/HYNIC]-OC (2.2%/ $p=0.14$) entspricht. Deutlich höhere Internalisierungsraten haben [$^{99\text{m}}\text{Tc}$ /EDDA/Tricine/HYNIC]-TOC mit 11.9% und [$^{99\text{m}}\text{Tc}$ /EDDA/Tricine/HYNIC]-TATE mit 18.8%. Die Internalisierungswerte (Abbildung 29) korrelieren in hohem Masse mit den Bindungsaffinitäten zu sst2 von Octreotide (2.0 nM), Tyr³-Octreotide (2.1 nM) und Tyr³-Thr⁸-Octreotide (1.1 nM). Weiter entspricht diese Reihenfolge auch den Elutionszeiten mit der HPLC (AS1/ AG3): [$^{99\text{m}}\text{Tc}$ /EDDA/Tricine/HYNIC]-OC (10.5 min) > [$^{99\text{m}}\text{Tc}$ /EDDA/Tricine/HYNIC]-TOC (10.3 min) > [$^{99\text{m}}\text{Tc}$ /EDDA/Tricine/HYNIC]-TATE (10.0 min).

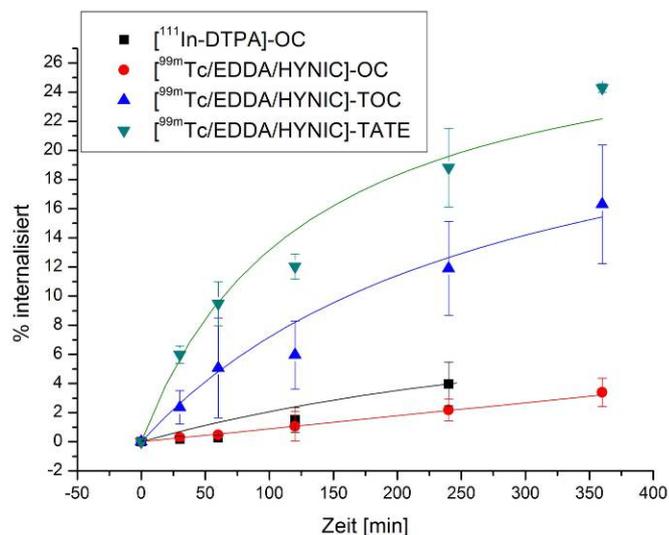


Abbildung 29: Graphische Auswertung der Rezeptorspezifischen Internalisierung von [¹¹¹In-DTPA]-OC und ^{99m}Tc-markierten HYNIC-Derivaten (10⁶ AR4-2J-Tumorzellen / 1.67 nM).

In weiteren Experimenten wurde untersucht, wie die Zellzahl mit den Internalisierungsraten zusammenhängt: Dabei wurde [^{99m}Tc/EDDA/Tricine/HYNIC]-TOC mit unterschiedlichen Zellzahlen internalisiert. Nach 4 h erhielt man bei einer Million Zellen 11.9 % (6 h: 16.3%) und bei zwei Millionen Zellen ungefähr den doppelten Wert: 20.1% (6 h: 27.2%). Dieses Experiment zeigt einen linearen Zusammenhang zwischen Zellzahl und Internalisierung. Alle Internalisierungswerte werden in den weiteren Experimenten auf eine Million Zellen normiert, um vergleichbare Werte zu erhalten.

Weiter wurde untersucht, wie Peptidkonzentration und Internalisierungsraten zusammenhängen. Eine Million AR4-2J Tumorzellen wurde mit 2.5 pmol (1.67 nM) und mit 0.25 pmol (0.17 nM) [^{99m}Tc/EDDA/Tricine/HYNIC]-TATE inkubiert (Tabelle 8).

Tabelle 8: Internalisierung von [^{99m}Tc/EDDA/Tricine/HYNIC]-TATE in 1 Million AR4-2J Tumorzellen und unterschiedlichen Peptidkonzentrationen (% i.D.)

	1.67 nM	0.17 nM
30 min	5.98%	10.59%
60 min	9.48%	18.14%
120 min	12.03%	26.90%
240 min	18.82%	38.43%
360 min	24.28%	47.31%

Um bei diesem Experiment die Zahlen vergleichen zu können, berechnete man zuerst die Anzahl internalisierter Moleküle pro Zelle: 24.3% Internalisierung nach 6 h bei 1.67 nM Konzentration entsprechen 365'414 Molekülen pro Zelle, 47.31% bei 0.167 nM entsprechen 71'202 Molekülen pro Zelle. Also ist die Internalisierung bei niedriger Konzentration (0.167 nM) nicht schneller oder besser als mit höherer Konzentration (1.67 nM), wie es auf den ersten Blick in Tabelle 8 erscheint, nur der prozentuale Anteil an internalisiertem Peptid ist höher. Alle weiteren Internalisierungsexperimente wurden mit einer Konzentration von 1.67 nM durchgeführt, um alle Resultate miteinander vergleichen zu können.

4.1.4 Externalisierung

Für die Bestimmung der Externalisierung wurden die einzelnen Radiopeptide jeweils 2 h in AR4-2J-Tumorzellen internalisiert. Nach dem Entfernen des freien, nicht gebundenen und des rezeptorgebundenen Radiopeptids wurden die Zellen mit 3 ml Medium überdeckt und bei 37°C/ 5% CO₂ inkubiert. Nach bestimmten Zeitpunkten wurde das Medium gewechselt und mit dem γ -Counter gemessen. Die Menge an Radioaktivität im Medium zeigt an, wie viel Substanz aus der Zelle ausgeschieden wurde (Externalisierung).

Tabelle 9: Externalisierungsexperiment (% in der Zelle verbliebene Radioaktivität), nachdem das Radiopeptid 2 h internalisiert wurde.

Zeit [min]	[¹¹¹ In-DTPA]-OC	[^{99m} Tc/EDDA/Tricine/ HYNIC]-OC	[^{99m} Tc/EDDA/Tricine/ HYNIC]-TOC	[^{99m} Tc/EDDA/Tricine/ HYNIC]-TATE
0	100.0	100.0	100.0	100.0
10	82.3 ± 1.2	81.2 ± 1.3	96.4 ± 4.0	94.1 ± 0.8
20	77.6 ± 1.4	73.0 ± 1.7	89.9 ± 2.4	92.1 ± 1.3
30	74.8 ± 1.3	67.6 ± 2.3	83.1 ± 1.8	89.0 ± 1.7
60	69.4 ± 1.6	60.5 ± 2.2	77.1 ± 2.5	88.1 ± 1.0
120	58.1 ± 2.7	53.3 ± 2.7	70.8 ± 2.6	84.1 ± 1.2

In Tabelle 9 ist die in der Zelle verbliebene Menge an Radioaktivität angegeben. Die Substanzen mit der höchsten Internalisierungsrate werden am langsamsten wieder ausgeschieden; nach 2 h sind nur gerade 15.9% [^{99m}Tc/EDDA/Tricine/HYNIC]-TATE

ausgeschieden. Entsprechend der niedrigeren Internalisierung werden 29.2% [$^{99m}\text{Tc}/\text{EDDA}/\text{Tricine}/\text{HYNIC}$]-TOC ausgeschieden. [$^{111}\text{In}-\text{DTPA}$]-OC und [$^{99m}\text{Tc}/\text{EDDA}/\text{Tricine}/\text{HYNIC}$]-OC zeigen keinen signifikanten Unterschied bei der Internalisierung und entsprechend keinen signifikanten Unterschied bei der Externalisierung: 41.9% vs. 46.7% ($p=0.26$) nach 2 h.

Bei der Externalisierung wurde ausserdem das Medium mittels HPLC analysiert, um zu bestimmen, ob das Radiopeptid intakt oder in Bruchstücken externalisiert wurde. Nach 1 h Externalisierung sind noch 50% des Radiopeptids intakt. Als Zerfallsprodukte kommen hauptsächlich ^{99m}Tc -Komplexe mit Tricine und/oder EDDA in Frage.

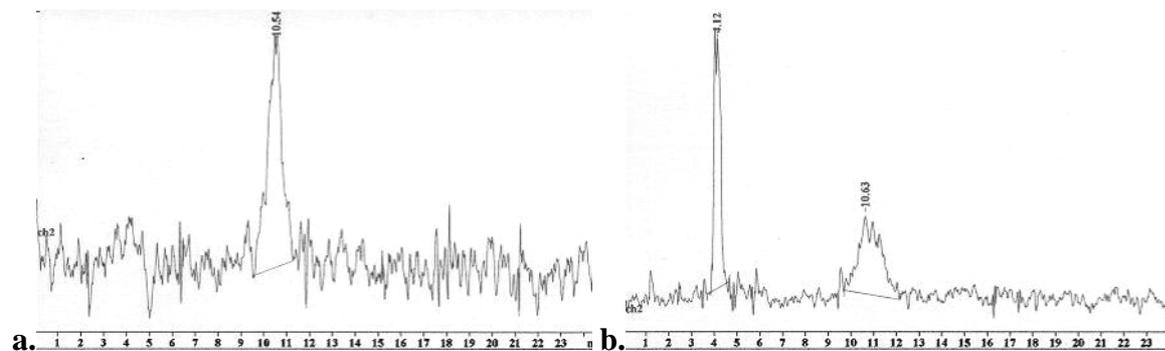


Abbildung 30: HPLC-Chromatogramm von [$^{99m}\text{Tc}/\text{EDDA}/\text{Tricine}/\text{HYNIC}$]-TOC: **a.)** intaktes Radiopeptid vor der Internalisierung. **b.)** nach 1 h Externalisierung.

4.1.5 Serumstabilität

Aus dem Resultat der Externalisierung (Abbildung 30) erkennt man, dass das Radiopeptid [$^{99m}\text{Tc}/\text{EDDA}/\text{Tricine}/\text{HYNIC}$]-TOC in den Tumorzellen nicht intakt bleibt. Um die Substanz aber im Patienten anwenden zu können, muss die Stabilität in menschlichem Blutserum bestimmt werden.

Ausgehend von der möglichen Patientendosierung (10 μg pro 3 L Blutserum) werden 10 ng [$^{99m}\text{Tc}/\text{EDDA}/\text{Tricine}/\text{HYNIC}$]-TATE in 3 mL Blutserum bei 37°C/ 5% CO_2 inkubiert.

In Tabelle 9 sind die Resultate der HPLC-Auswertung aufgelistet. Nach 8 h sind immer noch mehr als 95% [$^{99m}\text{Tc}/\text{EDDA}/\text{Tricine}/\text{HYNIC}$]-TATE intakt. Zum Vergleich: Die meisten

^{99m}Tc -markierten Radiopharmaka müssen eine Markierausbeute von mindestens 95% aufweisen, um dem Patienten appliziert werden zu können.

Tabelle 10: Serumstabilität; HPLC-Auswertung des Ethanol-Überstandes.

Zeit [min]	$^{99m}\text{Tc/EDDA/Tricine/}$ HYNIC]-TATE	$^{99m}\text{Tc/EDDA/Tricine}$
20	96.54	3.46
60	97.43	2.57
120	98.21	1.79
180	97.65	2.35
240	98.93	1.07
300	95.49	4.51
1440	63.85	36.15

$^{99m}\text{Tc/EDDA/Tricine/HYNIC}$]-TATE ist in menschlichem Blutserum mindestens 5 h stabil und zeigt keinerlei Degradationsprodukte. Nach 24 h sind immer noch 64% des Radiopeptids intakt.

4.1.6 Toxizitäts-Test

Die Firma RCC Ltd, (Füllinsdorf/ Schweiz) bietet Toxizitätsstudien von Substanzen in Mäusen an. Ausgehend von der applizierten Menge HYNIC-TATE pro Patient (20 μg Kit für 1-4 Patienten) wurde die Menge auf ~ 10 ng pro Maus festgelegt. Um eine Toxizität ausschliessen zu können, wurde den weiblichen Test-Mäusen jeweils die 500-fache Dosis appliziert. Die Mäuse wurden während 15 Tagen beobachtet und anschliessend pathologisch untersucht. Keines der Versuchstiere zeigte irgendeine Auffälligkeit, somit wurde der LD_{50} -Wert wie folgt definiert: LD_{50} (weibliche Mäuse) > 500-fache Dosis.

4.1.7 Bioverteilung

Um die Substanzen *in vivo* zu testen, verwendete man Lewis-Ratten, denen man subkutan am Bauch AR4-2J-Tumorzellen in die Flanke injizierte. Nach ungefähr 2 Wochen sind die Somatostatinrezeptor-positiven Tumore gross genug (\varnothing 1 cm). Auf Grund der kurzen

Halbwertszeit von ^{99m}Tc (6.02 h) wurden die Werte der Bioverteilung nach 1 h und nach 4 h bestimmt (Tabelle 11).

Abbildung 31 zeigt die Bioverteilung von [$^{99m}\text{Tc}/\text{EDDA}/\text{Tricine}/\text{HYNIC}$]-TATE zu verschiedenen Zeitpunkten. Nach einer Stunde erhält man eine hohe Anreicherung im Tumor (5.0%) und den Somatostatinrezeptor-positiven Organen wie Nebennieren (5.5%) und Pankreas (10.7%). Der Magen besitzt nur eine geringe Rezeptordichte und hat deshalb nach 1 h nur eine Anreicherung von 2.1%. Nach 4 h ist ein Optimum im Verhältnis von Tumor zu Hintergrund erreicht, das Tumor-zu-Blut-Verhältnis beträgt: 45.3:1. Der Nierenuptake nach 1 h beträgt 4.9%, nach 4 h nur noch 1.6%. Das Tumor-zu-Nieren-Verhältnis verbessert sich von 1.03:1 nach 1 h auf 2.5:1 nach 4 h.

Die Zugabe von 100 μg an Tyr³-Octreotide blockiert die Somatostatinrezeptoren einer Gruppe von 3 Tieren. Die Anreicherung im Tumor konnte so um 93.3% verringert werden, in den Somatostatinrezeptor-positiven Organen um 84.1% (Nebennieren) und 93.8% (Pankreas). Die Anreicherung in den Nieren konnte nicht blockiert werden, da [$^{99m}\text{Tc}/\text{EDDA}/\text{Tricine}/\text{HYNIC}$]-TATE unspezifisch von den tubulären Zellen der Niere aufgenommen wird.

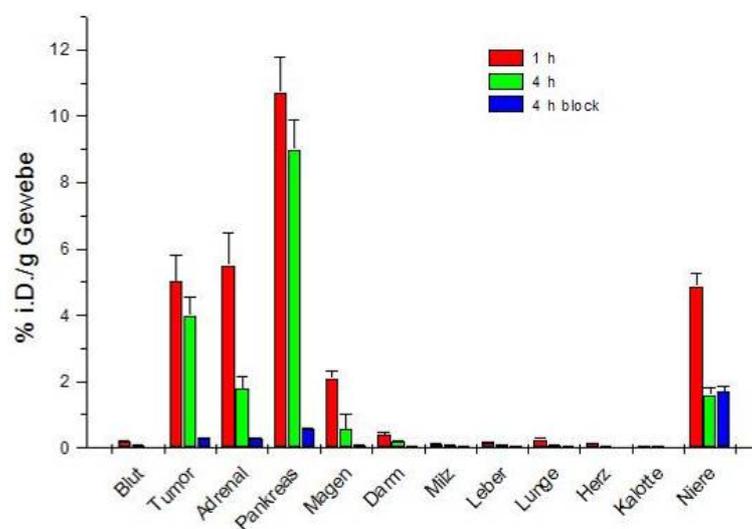


Abbildung 31: Bioverteilung von [$^{99m}\text{Tc}/\text{EDDA}/\text{Tricine}/\text{HYNIC}$]-TATE in AR4-2J-tumortragenden Lewisratten.

Der Tumoruption nach 4 h von [^{111}In -DTPA]-OC (0.9%) und [$^{99\text{m}}\text{Tc}$ /EDDA/Tricine/HYNIC]-OC (0.7%) ist nicht signifikant verschieden ($p=0.13$) und zeigt im Vergleich zu [$^{99\text{m}}\text{Tc}$ /EDDA/Tricine/HYNIC]-TOC und [$^{99\text{m}}\text{Tc}$ /EDDA/Tricine/HYNIC]-TATE einen sehr niedrigen Wert. Dasselbe zeigt sich für die Verhältnisse von Tumor-zu-Nieren und Tumor-zu-Leber, die signifikant schlechter sind.

[$^{99\text{m}}\text{Tc}$ /EDDA/Tricine/HYNIC]-TOC und [$^{99\text{m}}\text{Tc}$ /EDDA/Tricine/HYNIC]-TATE besitzen den gleichen Tumoruption (3.9% vs. 4.0%), jedoch ist das Verhältnis von Tumor-zu-Nieren deutlich besser für [$^{99\text{m}}\text{Tc}$ /EDDA/Tricine/HYNIC]-TATE (Tabelle 11).

Tabelle 11: Bioverteilung von [¹¹¹In-DTPA]-OC und [^{99m}Tc-HYNIC]-Derivate in AR4-2J-tumortragenden Lewis Ratten

	[¹¹¹ In-DTPA]-OC		[^{99m} Tc/EDDA/Tricine/HYNIC]-OC		[^{99m} Tc/EDDA/Tricine/HYNIC]-TOC		[^{99m} Tc/EDDA/Tricine/HYNIC]-TATE		
	4 h	4 h block	4 h	4 h	4 h block	1 h	4 h	4 h block	
Blut	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.05 ± 0.03	0.03 ± 0.00	0.21 ± 0.03	0.09 ± 0.01	0.03 ± 0.00	
Tumor	0.99 ± 0.08	0.06 ± 0.00	0.70 ± 0.13	3.85 ± 1.00	0.15 ± 0.03	5.01 ± 0.81	3.99 ± 0.58	0.27 ± 0.02	
Niere	1.75 ± 0.16	1.39 ± 0.08	2.79 ± 0.27	2.60 ± 1.47	1.89 ± 0.09	4.88 ± 0.38	1.60 ± 0.22	1.69 ± 0.18	
Nebenniere	0.70 ± 0.12	0.08 ± 0.04	0.65 ± 0.35	3.06 ± 1.22	0.08 ± 0.02	5.50 ± 1.00	1.79 ± 0.36	0.29 ± 0.01	
Pankreas	0.87 ± 0.33	0.04 ± 0.00	0.71 ± 0.11	5.47 ± 2.81	0.15 ± 0.02	10.71 ± 1.09	9.01 ± 0.86	0.56 ± 0.04	
Milz	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.08 ± 0.02	0.05 ± 0.00	0.11 ± 0.01	0.08 ± 0.00	0.05 ± 0.00	
Magen	0.20 ± 0.02	0.01 ± 0.00	0.24 ± 0.01	1.32 ± 0.32	0.05 ± 0.00	2.10 ± 0.22	0.56 ± 0.45	0.08 ± 0.01	
Darm	0.07 ± 0.02	0.02 ± 0.00	0.07 ± 0.01	0.29 ± 0.13	0.04 ± 0.01	0.39 ± 0.08	0.19 ± 0.02	0.05 ± 0.01	
Leber	0.09 ± 0.02	0.09 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.08 ± 0.02	0.07 ± 0.00	0.17 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.05 ± 0.00	
Lunge	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.06 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.05 ± 0.00	0.25 ± 0.04	0.09 ± 0.01	0.05 ± 0.00	
Herz	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.13 ± 0.02	0.04 ± 0.00	0.02 ± 0.00	
Kalotte	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.05 ± 0.01	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.01	
Verhältnisse									
Tumor/Blut	49.5		35.0	77		23.9	44.3		
Tumor/Nieren	0.6		0.3	1.5		1.0	2.5		
Tumor/Leber	11		6.4	48.1		29.5	49.9		

4.1.8 Szintigraphie an tumortragenden Ratten

Zusätzlich zur Bioverteilung wurden Szintigraphiebilder mittels γ -Kamera gemacht, dazu wurden 2 Ratten verwendet. Nach einer Stunde sieht man eine hohe Anreicherung von [$^{99m}\text{Tc}/\text{EDDA}/\text{Tricine}/\text{HYNIC}$]-TATE im Tumor und im Pankreas. Bei einer Ratte wurden zusätzlich $100\ \mu\text{g}$ Tyr³-Octreotide koinjiziert um die Somatostatinrezeptoren abzusättigen. Bei diesem Tier wurde die Aktivität von keinem Organ spezifisch aufgenommen und über die Nieren und Blase schnell wieder ausgeschieden. Nach 4 h wird das Tumor-zu-Hintergrund-Verhältnis besser und man kann deutlich den Tumor und den Pankreas erkennen.

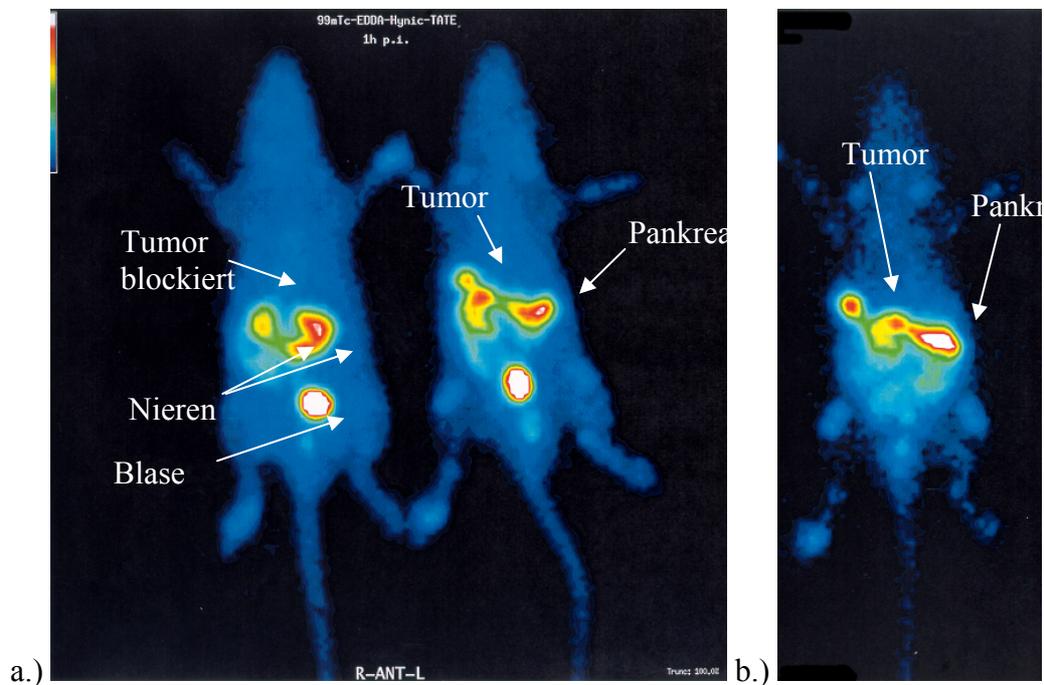


Abbildung 32: Szintigraphie von [$^{99m}\text{Tc}/\text{EDDA}/\text{Tricine}/\text{HYNIC}$]-TATE in AR4-2J-tumortragenden Lewis-Ratten. a.) nach 1 h, links Ratte mit Koinjektion von $100\ \mu\text{g}$ Tyr³-Octreotide, rechts ohne Blockierung der Somatostatinrezeptoren. b.) nach 4 h, ohne Blockierung.

4.1.9 Szintigraphie

Nachdem die präklinischen Untersuchungen, wie Internalisierung und Bioverteilungen, einen Vorteil für [$^{99m}\text{Tc}/\text{EDDA}/\text{Tricine}/\text{HYNIC}$]-TATE gegenüber [$^{99m}\text{Tc}/\text{EDDA}/\text{Tricine}/\text{HYNIC}$]-TOC gezeigt haben, wurden im Rahmen einer Kooperation mit der Universität Istanbul erste Patientenstudien durchgeführt. L. Kabasakal verglich in mehreren Patienten die beiden ^{99m}Tc -

markierten HYNIC-Derivate: [$^{99m}\text{Tc}/\text{EDDA}/\text{Tricine}/\text{HYNIC}$]-TOC und [$^{99m}\text{Tc}/\text{EDDA}/\text{Tricine}/\text{HYNIC}$]-TATE.

Abbildung 33 zeigt die Szintigramme eines Patienten mit einem inoperablen papillären Schilddrüsenkarzinom nach 1 h. Die beiden Aufnahmen links (ant/post) wurden mit [$^{99m}\text{Tc}/\text{EDDA}/\text{Tricine}/\text{HYNIC}$]-TOC aufgenommen. Man sieht deutlich eine Anreicherung der Radioaktivität im Tumor, aber auch in der Leber, der Milz und den Nieren. In den Aufnahmen rechts (ant/post) mit [$^{99m}\text{Tc}/\text{EDDA}/\text{Tricine}/\text{HYNIC}$]-TATE sieht man in derselben Intensität die Anreicherung im Tumor, der Milz und den Nieren. Eine deutlich geringere Anreicherung sieht man in der Leber und ausgehend von der Tatsache, dass neuroendokrine Tumoren hauptsächlich in die Leber metastasieren, zeigt [$^{99m}\text{Tc}/\text{EDDA}/\text{Tricine}/\text{HYNIC}$]-TATE auch in der Patientenstudie einen deutlichen Vorteil gegenüber [$^{99m}\text{Tc}/\text{EDDA}/\text{Tricine}/\text{HYNIC}$]-TOC.

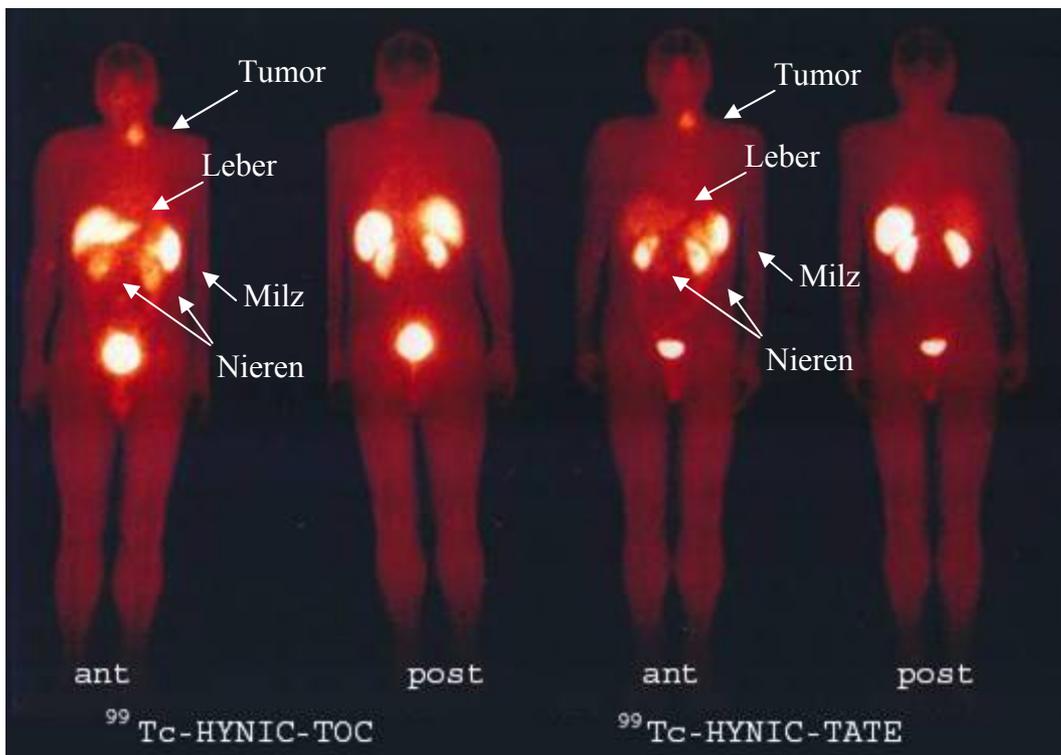


Abbildung 33: Vergleichende 1 h Szintigraphie-Aufnahmen eines Patienten mit einem inoperablen papillären Schilddrüsenkarzinom (72 / m). Links: $^{99m}\text{Tc}/\text{EDDA}/\text{Tricine}/\text{HYNIC}$ -TOC, rechts: $^{99m}\text{Tc}/\text{EDDA}/\text{Tricine}/\text{HYNIC}$ -TATE. Das Bild wurde von L. Kabasakal, Universität Istanbul, Türkei, zur Verfügung gestellt.

4.1.10 Technetium-Carbonyl-Derivate

Alberto et al. (42) zeigten eine Möglichkeit auf, Peptide mit Technetium-Carbonylen zu markieren. Sie zeigten, dass diese Tc^I Komplexe sehr stabil sind und sich hervorragend für die Markierung von Radiopharmaka eignen.

In diesem Teilprojekt geht es um die Synthese eines auf Histidin basierenden Chelators, der an das bekannte Peptid (TATE) gekoppelt wurde. Der Chelator aa49, ein Histidin Derivat wurde uns von der Universität Zürich zur Verfügung gestellt (siehe 3.5.5). Im ersten Schritt wurde die tert-Butyl-Schutzgruppe entfernt, danach mittels sorgfältiger Koevaporation sämtliches TFA. Nach der Kopplung an das Peptid (TATE) und der Zyklisierung in Lösung mit Iod wurden die Schutzgruppen des Chelator-Peptid-Konjugats entfernt und man erhielt das Produkt DS119 mit 3.3% Ausbeute. Eines der Nebenprodukte wurde als TFA-TATE identifiziert. Nach der Abspaltung der tert-Butyl-Schutzgruppe konnte das TFA nicht vollständig entfernt werden und wurde anstelle des Chelators aa49 an das Peptid gekoppelt.

Zum Vergleich dieser Substanz mit anderen Carbonyl-Derivaten wurden unter anderem NODAGA-TATE (Synthese von Klaus Eisenwiener) und ein weiteres Derivat (Synthese Joao C.) verwendet (Abbildung 34).

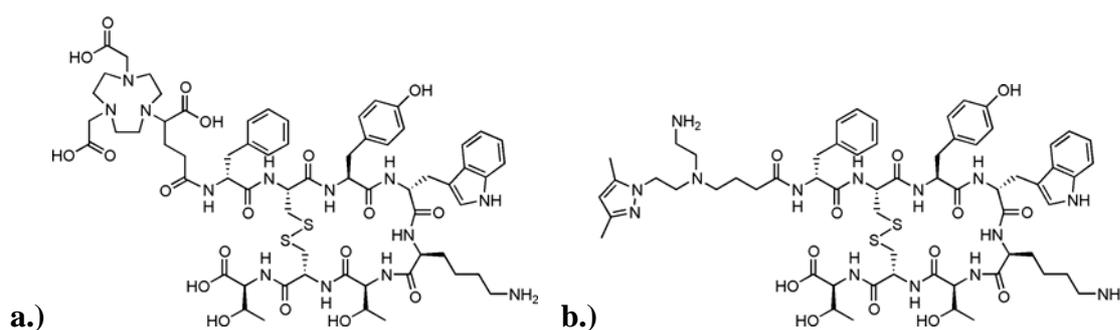


Abbildung 34: Struktur von TATE-Derivaten für die Markierung mit $[^{99m}Tc(CO)_3(H_2O)_3]^+$ **a.)** NODAGA-TATE und **b.)** JC1-TATE.

Zur Markierung wurden „Technetium-Carbonyl-Kits“ der Firma Mallinckrodt (IsoLink[®]) verwendet, diese Kits lassen sich mit bis zu 30 GBq $^{99m}TcO_4^-$ markieren. Die Chelator-Peptid-

Derivate werden mit durchschnittlich 111 GBq/ μmol markiert und zeigten eine Markierausbeute von mindestens 95%.

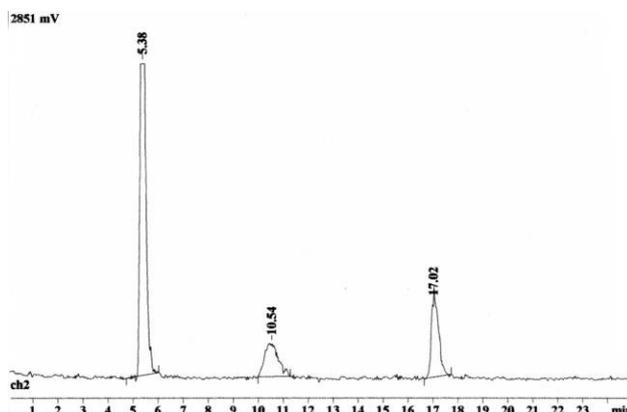


Abbildung 35: Vergleich der Retentionszeiten mittels analytischer HPLC. Koinjektion von $[\text{}^{99\text{m}}\text{TcO}_4]^-$ (5.38 min), $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ (10.54 min) und $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}](\text{CO})_3\text{Histidin}$ (17.02 min).

Abbildung 35 zeigt das HPLC-Chromatogramm einer Koinjektion der Edukte $[\text{}^{99\text{m}}\text{TcO}_4]^-$ und $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ und einem möglichen Produkt $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{Histidin}]$. In Tabelle 12 sind die weiteren Retentionszeiten im Vergleich aufgelistet.

Tabelle 12: HPLC Retentionszeiten von $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Carbonyl-Derivaten (AS1/AG5).

Substanz	Retentionszeit [min]
$[\text{}^{99\text{m}}\text{TcO}_4]^-$	5.38
$[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$	10.54
$[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{Histidin}]$	17.02
$[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{Histidin}]\text{-TATE}$	23.45
$[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{NODAGA}]\text{-TATE}$	23.48
$[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{JC1}]\text{-TATE}$	25.01

Von den drei Technetium-Carbonyl-Derivaten wurden Internalisierungen mit AR4-2J-Tumorzellen durchgeführt (Abbildung 14). Im Vergleich zur Referenzsubstanz $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}/\text{EDDA}/\text{Tricine}/\text{HYNIC}]\text{-TATE}$ mit einer Internalisierung von 18.8% nach 4 h sind alle Technetium-Carbonyl-Derivate signifikant schlechter. $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-NODAGA}]\text{-TATE}$ (4 h: 6.5%) zeigt gegenüber der Referenzsubstanz eine geringe Internalisierungsrate; diese ist aber trotzdem etwa doppelt so hoch wie die von $[\text{}^{111}\text{In-DTPA}]\text{-OC}$ (3.0%). $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-Histidin}]\text{-$

TATE (4 h: 1.1%) zeigt eine sehr geringe spezifische Internalisierung und für [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-JC1}$]-TATE wurde keine rezeptorspezifische Internalisierung gefunden.

Tabelle 13: Internalisierung von Technetium-Carbonyl-Derivaten im Vergleich mit [$^{99m}\text{Tc}/\text{EDDA}/\text{Tricine}/\text{HYNIC}$]-TATE (10^6 AR4-2J-Tumorzellen / 1.67 nM) in % i.D. \pm Standardabweichung.

Zeit [min]	[$^{99m}\text{Tc}/\text{EDDA}/\text{Tricine}/\text{HYNIC}$]-TATE	[$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-Histidin}$]-TATE	[$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-NODAGA}$]-TATE	[$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-JC1}$]-TATE
30	6.0 \pm 0.6	0.4 \pm 0.5	1.3 \pm 1.4	1.8 \pm 3.5
60	9.5 \pm 1.5	0.7 \pm 0.7	1.7 \pm 1.8	0.1 \pm 0.3
120	12.0 \pm 0.9	1.3 \pm 0.2	4.9 \pm 0.9	0.3 \pm 0.5
240	18.8 \pm 2.7	1.1 \pm 0.3	6.5 \pm 1.6	-1.0 \pm 1.6

4.2 DOTA-xyz-TATE

4.2.1 Synthese

Um die Eigenschaften der Chelator-Peptid-Konjugate weiter zu verbessern, wurden verschiedene Spacermoleküle zwischen Chelator und Peptid eingeführt. Man erwartete von diesen Modifikationen schnellere Internalisierungen, eine bessere Aufnahme in den Tumor oder aber eine Verbesserung des Verhältnisses zwischen Tumor und Niere.

Als einfache Spacer-Moleküle wurden die folgenden Aminosäuren verwendet: Threonin und Asparaginsäure. Als längeren Spacer, was vor allem für die Tetra-DOTA-Derivate wichtig sein wird (siehe Kapitel 4.4), verwendete man Pentasarcosine (Sar_5). Sarcosine ist eine unnatürliche, N-methylierte Aminosäure, die bekannt dafür ist, als Oligopeptid keine Sekundärstrukturen zu bilden.

Die Synthese des Pentasarcosine-Spacers wurde wie folgt durchgeführt: Im ersten Schritt wird Sarcosine an die Festphase gebunden, dann wird das Dipeptid (Fmoc-Sar₂-OH) gekoppelt. Würde man nur Fmoc-Sar-OH koppeln, würde es nach der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe zur Bildung von Diketopiperazinen (126) führen und die Ausbeute signifikant verringern. Die letzten beiden Aminosäuren können dann wieder gemäss dem Standard Programm einzeln gekoppelt werden.

Die Synthese der Spacer-Konjugate DOTA-xyz-TATE verläuft immer nach demselben Schema: Das Peptid wird an der Festphase aufgebaut, danach wird die einzelne Aminosäure (Fmoc-Thr-OH/ Fmoc-Asp(O-Dmab)) oder Pentasarcosine (Fmoc-Sar₅-OH) gekoppelt; nach der Kopplung von DOTA(tBu)₃ wird das Konjugat von Harz abgespalten, in Lösung zyklisiert und die Seitenketten-Schutzgruppen entfernt. Nach dem Reinigen mittels präparativer HPLC und Lyophilisierung erhält man Ausbeuten zwischen 7.6% bis 9.7%.

Besonderes Interesse wurde auf die so genannten trifunktionellen Peptide gelegt. Von Herrn H. Rink wurde ein Threonin-Cellobiose-Derivat zur Verfügung gestellt (Abbildung 36), welches in Lösung an Lys⁵(ivDde)-TATE gekoppelt wird.

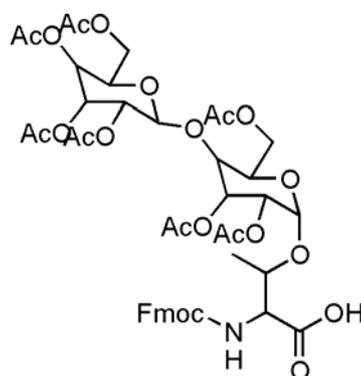


Abbildung 36: Strukturformel von Fmoc-Thr(Cellobiose)-OH.

Nach dem Reinigen der Substanz mittels HPLC erhielt man 0.2 mg DOTA-Thr(Cellobiose)-TATE, was einer Ausbeute von nur 1.4% entspricht. Die niedrige Ausbeute ergibt sich aus dem Umstand, dass alle Reaktionsschritte in Lösung gemacht wurden und nicht an der Festphase.

Als ein weiteres trifunktionelles Derivat koppelte man Glucuronsäure mit der Carboxylgruppe an das ϵ -NH₂ Ende von Lysin. Nach der Reinigung mittels präparativer HPLC erhält man 0.9 mg DOTA-Lys(Gluc)-TATE mit einer Ausbeute von 5.0%.

In vivo wird normalerweise Glucuronsäure über die 1'-Position als Glucuronid gebunden und nicht über die Carboxylgruppe. Kellam et al. (127) immobilisierten die Glucuronsäure an der Festphase und koppelten Asparaginsäure daran. An diesen „Building Block“ wurden dann

DOTA(t-Bu)₃ und TATE gekoppelt. Diese Synthesestrategie führte aber nie zum gewünschten Produkt.

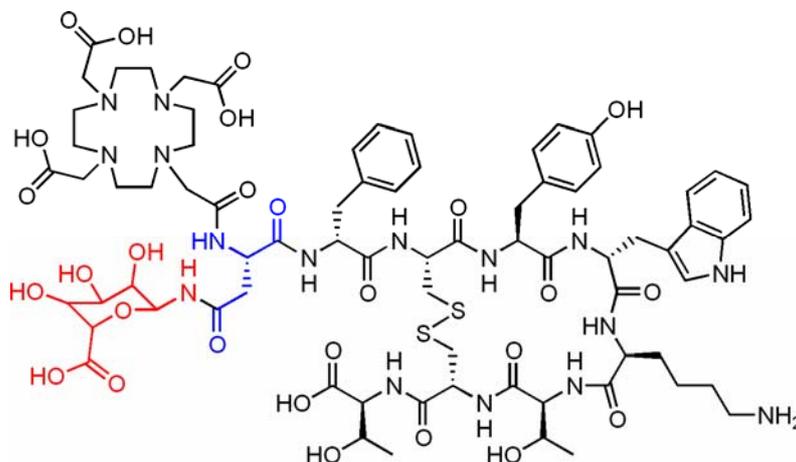


Abbildung 37: Struktur von DOTA-Asp(Gluc)-TATE (Synthese war nicht erfolgreich).

Auch zu keinem Erfolg führte die Strategie, den C-Terminus von TATE zu modifizieren. Ausgehend von der immobilisierten Glucuronsäure (127) wurde zuerst das Seitenketten geschützte Peptid TATE gekoppelt, danach DOTA(t-Bu)₃.

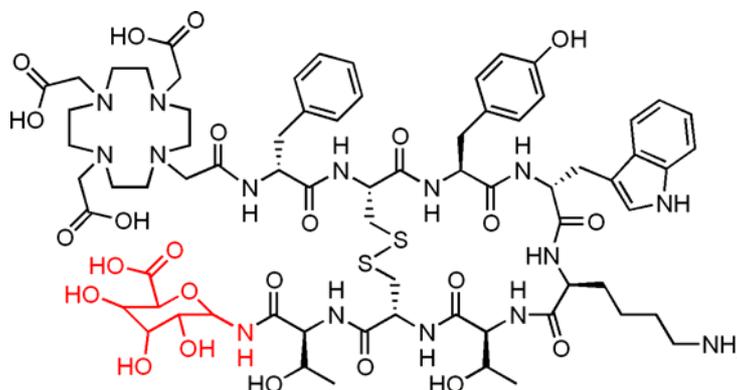


Abbildung 38: Struktur von DOTA-TATE-Gluc (Synthese nicht erfolgreich).

4.2.2 Internalisierung

Um die synthetisierten Substanzen *in vitro* zu testen und zu vergleichen, wurden die Chelator-Peptid-Konjugate mit ¹¹¹In markiert, zu AR4-2J-Tumorzellen gegeben und die rezeptorspezifische Internalisierung bestimmt.

Tabelle 14: Internalisierung von ^{111}In -markierten Radioliganden (10^6 AR4-2J-Tumorzellen / 1.67 nM) in % i.D. \pm Standardabweichung.

	30 min	60 min	120 min	240 min
$[^{111}\text{In-DOTA}]\text{-TATE}$	6.5 ± 0.6	9.9 ± 1.2	15.4 ± 1.9	21.0 ± 2.3
$[^{111}\text{In-DOTA}]\text{-Asp-TATE}$	7.0 ± 0.6	12.8 ± 1.4	19.0 ± 2.5	28.6 ± 3.5
$[^{111}\text{In-DOTA}]\text{-Thr-TATE}$	13.1 ± 2.6	16.6 ± 1.2	24.8 ± 2.4	32.9 ± 1.2
$[^{111}\text{In-DOTA}]\text{-Sar}_5\text{-TATE}$	6.1 ± 0.7	9.8 ± 1.3	11.2 ± 0.8	15.4 ± 0.9
$[^{111}\text{In-DOTA}]\text{-Lys(Glucuronsäure)-TATE}$	9.9 ± 1.0	15.8 ± 1.2	24.3 ± 1.9	35.9 ± 1.5
$[^{111}\text{In-DOTA}]\text{-Thr(Cellobiose)-TATE}$	2.3 ± 1.1	3.5 ± 1.3	7.0 ± 2.0	11.5 ± 3.0

In Tabelle 14 sind die Resultate der Internalisierung aufgelistet. $[^{111}\text{In-DOTA}]\text{-TATE}$ wurde als Referenzsubstanz verwendet und zeigt nach 4 h eine receptorspezifische Internalisierung von 21.0%. Wenn man einfache natürliche L-Aminosäuren als Spacer einfügt, dann wird die Internalisierung signifikant erhöht: $[^{111}\text{In-DOTA}]\text{-Asp-TATE}$ (28.6%) internalisiert nach 4 h 1.4-mal und $[^{111}\text{In-DOTA}]\text{-Thr-TATE}$ (32.9%) 1.6-mal besser als die Referenzsubstanz $[^{111}\text{In-DOTA}]\text{-TATE}$. Pentasarcosine als Spacer verringert die Internalisierung signifikant um den Faktor 1.4 auf nunmehr 15.4% nach 4 h.

Die Modifikationen mit den Zucker-Aminosäure-Derivaten zwischen dem Chelator und dem Peptid beeinflusst die Internalisierung ebenfalls signifikant. $[^{111}\text{In-DOTA}]\text{-Lys(Glucuronsäure)-TATE}$ hat nach 4 h den höchsten Wert an receptorspezifisch internalisierter Substanz mit 35.9%. Das Derivat mit Thr(Cellobiose) verlangsamt die Internalisierung, sodass nach 4 h nur gerade 11.5% in der Zelle sind. Offensichtlich gibt es einen Zusammenhang zwischen der Spacerlänge und dem Zuckerderivat. Die sterische Hinderung der Cellobiose verhindert eine hohe Internalisierungsrate.

4.2.3 Externalisierung

Tabelle 15 zeigt die verbliebene Radioaktivität in der Zelle nach bestimmten Zeitpunkten. Von der Referenzsubstanz $[^{111}\text{In-DOTA}]\text{-TATE}$ (Internalisierung: 21.0% nach 4 h) werden nach 2 h Externalisierung 19.9% der Radioaktivität ausgeschieden. Gemäss unserer Beobachtung mit anderen Konjugaten sollten Substanzen mit einer besseren Internalisierung

weniger schnell aus der Zelle ausgeschieden werden. Allerdings zeigt sich dieser Trend nur für [¹¹¹In-DOTA]-Sar₅-TATE (37.5%) und [¹¹¹In-DOTA]-Thr(Cellobiose)-TATE (28.9%). Die folgenden Substanzen haben allesamt eine bessere Internalisierung im Vergleich zu [¹¹¹In-DOTA]-TATE werden aber auch schneller wieder ausgeschieden: [¹¹¹In-DOTA]-Asp-TATE (41.1%), [¹¹¹In-DOTA]-Thr-TATE (30.4%) und [¹¹¹In-DOTA]-Lys(Gluc)-TATE (28.8%).

Interessanterweise zeigen die beiden Zucker-Aminosäuren-Derivate [¹¹¹In-DOTA]-Lys(Gluc)-TATE und [¹¹¹In-DOTA]-Thr(Cellobiose)-TATE nur in der Internalisierung einen signifikanten Unterschied (36.0±1.5% vs. 11.6±3.0%). Die Externalisierungsraten sind nicht signifikant verschieden (28.8% vs. 28.9%; p=0.9).

Tabelle 15: Externalisierungsexperiment (% in der Zelle verbliebene Radioaktivität), nachdem das Radiopeptid 2 h internalisiert wurde.

Zeit [min]	[¹¹¹ In-DOTA]- TATE	[¹¹¹ In-DOTA]-Asp- TATE	[¹¹¹ In-DOTA]-Thr- TATE	[¹¹¹ In-DOTA]-Sar ₅ - TATE	[¹¹¹ In-DOTA]- Lys(Glucuronsäure)-TATE	[¹¹¹ In-DOTA]- Thr(Cellobiose)-TATE
0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
5		85.4 ± 0.7	93.0 ± 0.2	91.5 ± 0.8	97.1 ± 0.1	90.7 ± 0.3
10	94.7 ± 0.5	74.7 ± 1.1	90.9 ± 0.3	82.7 ± 1.4	94.2 ± 0.8	88.9 ± 0.4
15		71.0 ± 1.5	89.9 ± 0.4	77.9 ± 1.2	91.1 ± 1.1	88.2 ± 0.4
20	92.3 ± 0.7	69.2 ± 1.6	89.0 ± 0.5	75.4 ± 1.6	89.2 ± 1.3	87.6 ± 0.5
25		67.9 ± 1.7	88.4 ± 0.7	73.1 ± 1.6	87.7 ± 1.6	87.2 ± 0.7
30	90.5 ± 0.8	66.8 ± 1.8	87.9 ± 0.9	71.4 ± 1.7	86.6 ± 1.7	86.9 ± 0.8
45		64.8 ± 2.0	86.5 ± 1.2	68.9 ± 2.0	83.8 ± 2.1	85.9 ± 0.9
60	86.9 ± 0.7	63.3 ± 2.0	83.9 ± 1.4	67.3 ± 2.1	80.7 ± 2.4	83.5 ± 0.8
90		60.9 ± 2.1	75.5 ± 1.4	64.7 ± 2.0	75.3 ± 2.1	75.5 ± 0.7
120	80.1 ± 0.7	58.9 ± 2.1	69.6 ± 1.3	62.5 ± 2.0	71.2 ± 1.6	71.1 ± 0.6

4.2.4 Bindungsaffinitäten

Die Rezeptor-Autoradiographie wurde an Zellmembran-Pellets durchgeführt, die mit den fünf Somatostatinrezeptor-Subtypen (sst1-sst5) transfektiert wurden. Für jede Substanz wurde ein Verdrängungsexperiment mit dem universalen Somatostatin-Radioliganden [¹²⁵I-Leu⁸-D-Trp²²-Tyr²⁵]-Somatostatin-28 mit ansteigenden Konzentrationen (0.1-1000 nM) an nicht markiertem Peptid durchgeführt (119).

Tabelle 16: Bindungsaffinitäten (IC₅₀) in nM für die Somatostatinrezeptor-Subtypen 1-5 (sst1-5), in Klammern Anzahl Experimente.

	sst1	sst2	sst3	sst4	sst5
SS28	2.9 ± 0.4 (6)	2.8 ± 0.3 (6)	3.9 ± 0.4 (6)	3.0 ± 0.5 (6)	3.0 ± 0.3 (6)
[In-DOTA]-TATE	>10'000 (3)	2.5 ± 0.3 (3)	147 ± 19 (3)	227 ± 73 (3)	30 ± 6.4 (3)
[In-DOTA]-Lys(Gluc)-TATE	>10'000 (2)	1.1 ± 0.1 (2)	>1'000 (2)	67 ± 22 (2)	128 ± 33 (2)

Tabelle 16 zeigt die IC₅₀-Werte von In^{III}-komplexiertem DOTA-TATE und DOTA-Lys(Gluc)-TATE. [In-DOTA]-TATE besitzt eine hohe Affinität zu sst2, wenig Affinität zu sst3, 4 und 5 und keine Affinität zu sst1. [In-DOTA]-Lys(Gluc)-TATE besitzt eine signifikant höhere Affinität zu sst2 (p=5·10⁻⁴), nur wenig Affinität zu sst4 und 5 und keine Affinität zu sst1 und 3.

Im Vergleich der Bindungsaffinitäten (sst2) zu den Internalisierungsergebnissen mit AR4-2J-Tumorzellen zeigt sich eine hohe Korrelation.

4.2.5 Bioverteilungen

Auf Grund der guten *in vitro*-Daten der Internalisierung wurden von [¹¹¹In-DOTA]-Asp-TATE und [¹¹¹In-DOTA]-Lys(Gluc)-TATE jeweils Bioverteilungen mit AR4-2J-tumortragenden Lewis-Ratten gemacht und mit der Referenzsubstanz [¹¹¹In-DOTA]-TATE verglichen. In Tabelle 17 sind die Resultate als % injizierte Dosis pro Gramm Gewebe (% i.D./g) aufgelistet.

Alle Substanzen zeigen eine schnelle Auswaschung aus dem Blut (0.01-0.08 % i.D./g) nach nur 4 h. Die Anreicherung in den rezeptorpositiven Organen wie Nebennieren, Pankreas und Magen zeigt nach 4 h keine Unterschiede bei [¹¹¹In-DOTA]-TATE und [¹¹¹In-DOTA]-Asp-TATE und signifikant erhöhte Werte für [¹¹¹In-DOTA]-Lys(Gluc)-TATE. Die Anreicherung im Tumor zeigt keinen Unterschied für [¹¹¹In-DOTA]-Lys(Gluc)-TATE (4.4%) und [¹¹¹In-DOTA]-TATE (4.1%) (p=0.54), beide Werte sind aber signifikant höher im Vergleich zu [¹¹¹In-DOTA]-Asp-TATE (2.4%) (p=0.02).

Jeweils eine Gruppe von 3-4 Tieren bekam eine Koinjektion mit 100 µg Tyr³-Octreotide, um die Anreicherung in den Tumor und in den Somatostatinrezeptor-positiven Organen zu blockieren. Für [¹¹¹In-DOTA]-TATE, [¹¹¹In-DOTA]-Asp-TATE und [¹¹¹In-DOTA]-Lys(Gluc)-TATE wurde die Anreicherung im Tumor um 70%-96% reduziert, ~90% im Pankreas, Magen und Nebennieren.

Die Anreicherung in den Nieren ist nicht rezeptorgesteuert und konnte daher nicht blockiert werden. Interessant sind die Tumor-zu-Nieren-Verhältnisse, nach 4 h beträgt dieses für [¹¹¹In-DOTA]-TATE 1.7:1, für [¹¹¹In-DOTA]-Asp-TATE 0.8:1 und für [¹¹¹In-DOTA]-Lys(Gluc)-TATE 0.6:1. Somit zeigt sich, dass die Referenzsubstanz [¹¹¹In-DOTA]-TATE] das beste Tumor-zu-Nieren-Verhältnis besitzt und jegliche Modifikationen dieses Moleküls dieses Verhältnis signifikant verschlechtern.

Die Auswaschung der Radioaktivität aus den nicht rezeptorspezifischen Organen ist sehr schnell und resultiert in einem niedrigen 4 h-Wert. Nach 24 h sind von der aufgenommenen Aktivität nur noch 38.8% [¹¹¹In-DOTA]-TATE, 84.4 % [¹¹¹In-DOTA]-Asp-TATE und 66.3% [¹¹¹In-DOTA]-Lys(Gluc)-TATE im Tumor.

Einige wichtige Verhältnisse von Tumor-zu-rezeptorspezifischen Organen und unspezifischen Organen sind in Tabelle 17 angegeben. Allgemein ist das Verhältnis von Tumor-zu-Blut und Tumor-zu-Leber nach 4 h sehr gut und für alle Substanzen etwa gleich.

Tabelle 17: Bioverteilung von [¹¹¹In-DOTA]-TATE, [¹¹¹In-DOTA]-Asp-TATE und [¹¹¹In-DOTA]-Lys(Gluc)-TATE in AR4-2J-tumortragenden Lewis Ratten (% i.D./g).

	[¹¹¹ In-DOTA]-TATE			[¹¹¹ In-DOTA]-Asp-TATE			[¹¹¹ In-DOTA]-Lys(Glucuronsäure)-TATE		
	4 h	4 h block	24 h	4 h	4 h block	24 h	4 h	4 h block	24 h
Blut	0.08 ± 0.09	0.01 ± 0.00	0.03 ± 0.02	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.05 ± 0.01	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00
Tumor	4.12 ± 0.74	0.17 ± 0.06	1.60 ± 0.25	2.35 ± 0.42	0.71 ± 0.21	1.98 ± 0.10	4.38 ± 0.60	0.55 ± 0.13	2.90 ± 0.39
Niere	2.42 ± 0.78	1.77 ± 0.75	1.82 ± 0.13	3.11 ± 0.63	4.98 ± 0.74	3.13 ± 0.53	7.97 ± 0.73	9.60 ± 0.78	10.70 ± 0.70
Nebenniere	6.46 ± 1.56	0.38 ± 0.29	3.74 ± 0.85	5.91 ± 0.95	1.15 ± 0.20	4.46 ± 0.72	11.05 ± 0.91	0.46 ± 0.05	11.86 ± 0.75
Pankreas	9.31 ± 1.00	0.17 ± 0.06	3.05 ± 0.17	10.67 ± 1.56	1.23 ± 0.28	3.53 ± 0.39	16.11 ± 0.91	1.13 ± 0.09	6.40 ± 0.34
Milz	0.11 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.08 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.07 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.12 ± 0.02	0.10 ± 0.01	0.13 ± 0.03
Magen	1.08 ± 0.62	0.07 ± 0.04	0.59 ± 0.04	0.94 ± 0.59	0.11 ± 0.03	0.64 ± 0.15	2.07 ± 0.54	0.12 ± 0.05	1.21 ± 0.34
Darm	0.24 ± 0.03	0.18 ± 0.27	0.10 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.41 ± 0.03	0.06 ± 0.01	0.27 ± 0.03
Leber	0.09 ± 0.06	0.03 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.00	0.07 ± 0.01
Lunge	0.09 ± 0.05	0.02 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.11 ± 0.10	0.09 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.01
Herz	0.03 ± 0.02	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00
Kalotte	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.02	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.00	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.00	0.03 ± 0.05
Verhältnisse									
Tumor-zu-Blut	51.5		53.3	102.0		152.3	87.5		170.7
Tumor-zu-Leber	45.8		32	54.5		45.0	67.3		40.9
Tumor-zu-Niere	1.7		0.9	0.8		0.6	0.6		0.3

4.2.6 Szintigraphien

Zusätzlich zur Bioverteilung von [^{111}In -DOTA]-Lys(Gluc)-TATE wurden von 2 Ratten Szintigraphieaufnahmen nach 1 h, 3.5 h und 22 h mit einer γ -Kamera gemacht.

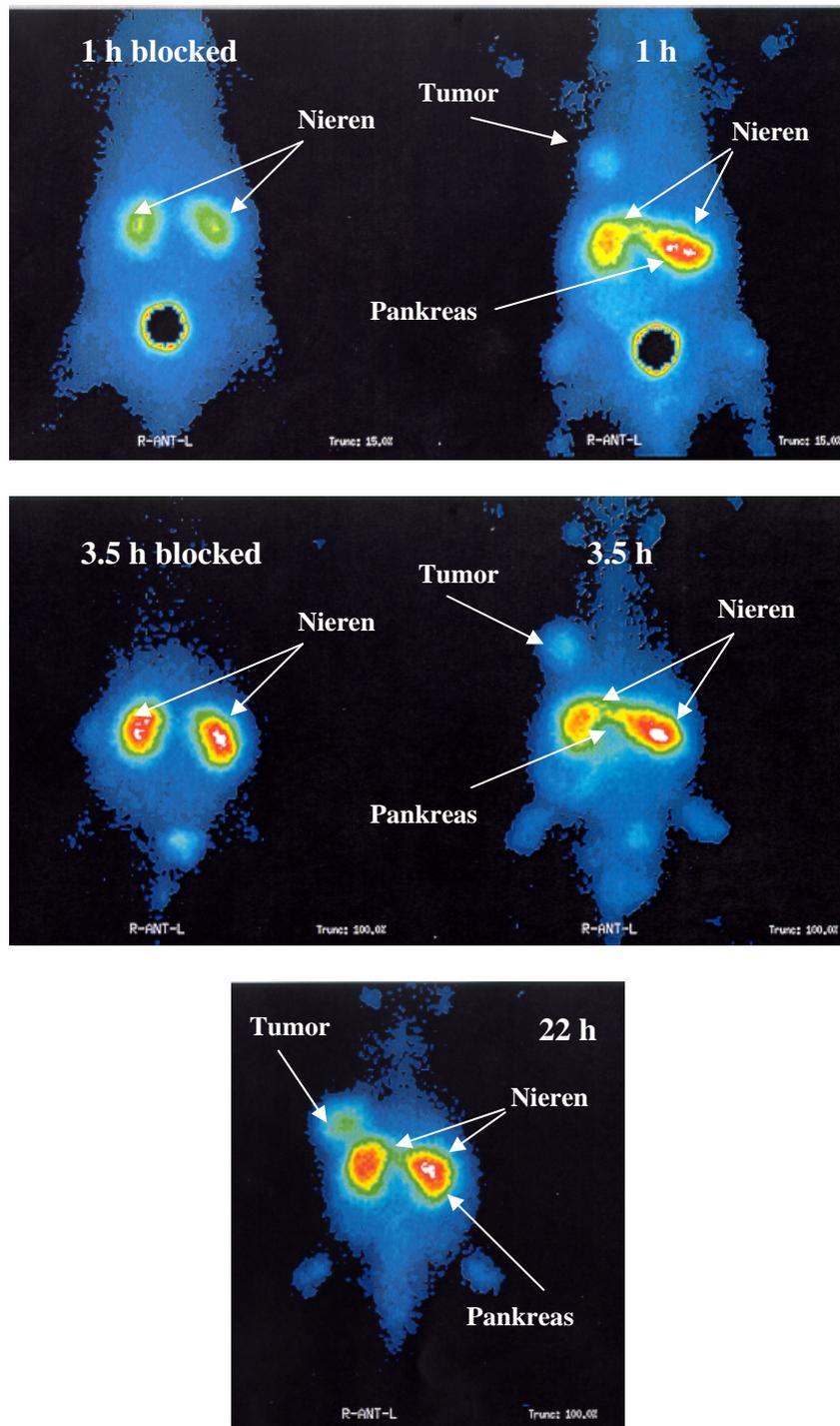


Abbildung 39: Szintigraphie von [^{111}In -DOTA]-Lys(Gluc)-TATE in AR4-2J-tumortragenden Lewis-Ratten zu verschiedenen Zeitpunkten. Blockierung durch Koinjektion von 100 μg Tyr³-Octreotide.

Nach einer Stunde sieht man eine Anreicherung von [^{111}In -DOTA]-Lys(Gluc)-TATE im Pankreas und im Tumor. Bei der linken Ratte („blocked“) wurden zusätzlich 100 μg Tyr³-Octreotide koinjiziert um die Somatostatinrezeptoren abzusättigen. In diesem Fall gibt es keine rezeptorspezifische Anreicherung der Substanz und [^{111}In -DOTA]-Lys(Gluc)-TATE wird nach kurzer Zeit über die Nieren und Blase wieder ausgeschieden. Nach 3.5 h ist die Anreicherung im Pankreas (16.1%) und Tumor (4.4%) optimal und nimmt nach 22 Stunden wieder leicht ab (Pankreas: 6.4% / Tumor: 2.9%). Das Tumor-zu-Hintergrund-Verhältnis wird von 3.5 h zu 22 h immer besser.

Zusätzlich zur Bioverteilung wurden auch Szintigraphieaufnahmen mit [^{111}In -DOTA]-Asp-TATE gemacht. Entsprechend der Bioverteilung sieht man eine Anreicherung im Tumor (2.3%) und im Pankreas (10.7%). Bei der Ratte mit zusätzlichem Tyr³-Octreotide wird die Aktivität in keinem Organ spezifisch angereichert und wird über die Nieren und die Blase wieder ausgeschieden.

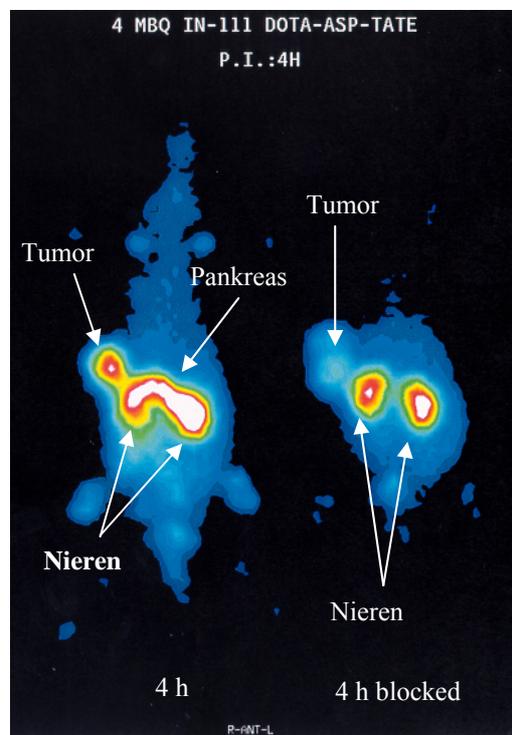


Abbildung 40: Szintigraphie von [^{111}In -DOTA]-Asp-TATE nach 4 h p.i. in AR4-2J-tumortragenden Lewis-Ratten. Rechts: Koinjektion mit 100 μg Tyr³-Octreotide.

Im optischen Vergleich der Szintigraphieaufnahmen hat [^{111}In -DOTA]-Asp-TATE einen wesentlich besseren Uptake im Tumor im Vergleich zu [^{111}In -DOTA]-Lys(Gluc)-TATE. Dieses Resultat wäre gerade entgegen demjenigen der Bioverteilung, wo [^{111}In -DOTA]-Lys(Gluc)-TATE einen Tumoruptake von 4.4% (4 h) hat im Vergleich zu [^{111}In -DOTA]-Asp-TATE mit 2.4% (4 h). Das Problem liegt hier in der Auswertung und der Einstellung der Farbtintensitäten. Bei vergleichenden Aufnahmen ist es notwendig, die Tiere gleichzeitig aufzunehmen, wie dies der Fall ist bei den Aufnahmen von normalen und geblockten Tieren.

4.2.7 Pharmakokinetik via Szintigraphie

Um die Kinetik von [^{111}In -DOTA]-TATE in einer tumortragenden Ratte zu bestimmen, wurde nach der Applikation der Substanz die Ratte narkotisiert und auf den Kollimator einer γ -Kamera gelegt. Für jede Aufnahme wurden 10 Minuten Aufnahmezeit gebraucht; auf die wichtigsten Organe wurden ROI's (Regions of Interests) gelegt und die Counts bestimmt.

Nach etwa 60 min ist das Plateau der Anreicherung im Tumor erreicht, und die Werte von Leber und Niere erreichen einen konstanten Wert. Über den Zeitraum von 3 Stunden nimmt der Wert der Radioaktivität im Blut kontinuierlich ab und verbessert somit das Verhältnis von Organ-zu-Hintergrund.

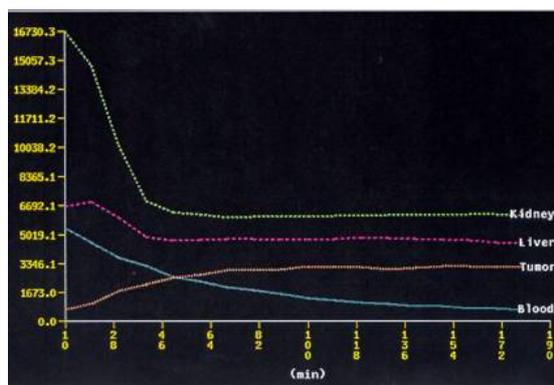


Abbildung 41: Kinetik einer Bioverteilung. Applikation von [^{111}In -DOTA]-TATE i.v. in eine AR4-2J-tumortragende Lewis Ratte.

Die Bioverteilungswerte (%i.D./g Gewebe) nach 4 Stunden ergeben eine Anreicherung im Tumor von 3.8%, im Blut 0.1%, in den Nieren 4.3% und in der Leber 0.1%. Der Nieren-Wert

von 4.3% ist etwa doppelt so hoch wie normal, was darauf zurückzuführen ist, dass die Ratte während des ganzen Experiments narkotisiert war und es zu keiner Ausscheidung des Urins kam.

4.3 Bis-DOTA-TATE-Derivate

4.3.1 Synthese

Bei der Synthese von bis-DOTA-Konjugaten ging es im Grundsatz um die Signal- und Dosis-Erhöhung („Signal and Dose Enhancement“). Für eine therapeutische Anwendung ist es wichtig, eine hohe spezifische Aktivität zu erreichen (siehe Einleitung Kapitel 1.5).

In einem ersten Ansatz wurde der N-Terminus des Peptids (TATE) mit Fmoc-Lys(Fmoc)-OH modifiziert. Nach der Abspaltung der beiden Fmoc-Schutzgruppen wurden zwei DOTA-Chelatoren gekoppelt. Da Lysin ein chirales Zentrum besitzt, wurde ausserdem das nicht chirale Aminopropylglycin (Fmoc₂-Apg-OH) als Linker verwendet, das zwei gleichlange Linkerarme besitzt, um eine noch bessere Separation der DOTA Chelatoren zu ermöglichen. Unter physiologischen Bedingungen liegt der Stickstoff von Apg in protonierter Form vor, was die pharmakokinetischen und biologischen Eigenschaften beeinflusst. Das Derivat mit D-Lys als Linker-Molekül wurde von Franz Bürgler im Rahmen einer medizinischen Dissertation synthetisiert (128). Die Ausbeuten der synthetisierten Chelator-Peptid-Konjugate lagen bei DOTA-TATE (20.0%), DOTA-Lys(DOTA)-TATE (22.9%), und DOTA₂-Apg-TATE (6%).

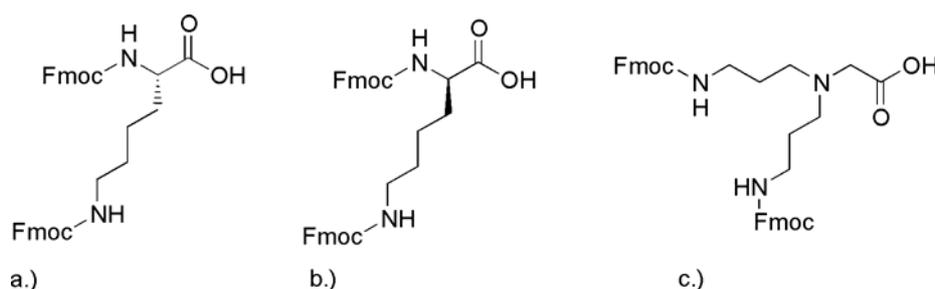


Abbildung 42: Strukturen der Linkermoleküle: **a.)** Fmoc-Lys(Fmoc)-OH **b.)** Fmoc-D-Lys(Fmoc)-OH **c.)** N,N'-bis(N-Fmoc-3-aminopropyl)-glycine (Fmoc₂-Apg-OH).

Um den Abstand zwischen den beiden Chelatoren zum Peptid zu vergrössern, wurde zusätzlich ein Spacer eingeführt. Damit soll verhindert werden, dass der sterisch relativ anspruchsvolle Chelatorteil die Bindungsaffinität des Peptids zum Rezeptor ungünstig beeinflusst. Der Spacer Pentasarcosine (Fmoc-Sar₅-OH) wurde am N-Terminus des Peptids gekoppelt. Sarcosine (L-Methylglycin) ist eine unnatürliche, N-methylierte Aminosäure, deren Oligopeptide keine Sekundärstrukturen ausbilden. Danach wurde Lysin (Fmoc-Lys(Fmoc)-OH) oder Aminopropylglycin (Fmoc₂-Apg-OH) als Linker und zwei DOTA-Chelatoren gekoppelt. Man erhielt DOTA-Lys(DOTA)-Sar₅-TATE mit 2.3% Ausbeute und DOTA₂-Apg-Sar₅-TATE mit 18.2% Ausbeute.

DOTA-D-Lys(DOTA)-TATE: Für die Synthese von DOTA-Lys(DOTA)-TATE wurde zuerst L-Lysin als Linker verwendet; diese Stelle könnte aber potentiell enzymatisch gespalten werden. Deshalb wurde einerseits DOTA-D-Lys(DOTA)-TATE synthetisiert und zum anderen die Serumstabilität des L-Aminosäurederivat DOTA-Lys(DOTA)-TATE (Kapitel 4.3.2) durchgeführt. Franz Bürgler (128) synthetisierte im Rahmen seiner Dissertation unter anderem DOTA-D-Lys(DOTA)-TATE. Er überprüfte die biologischen Eigenschaften und verglich diese mit DOTA-L-Lys(DOTA)-TATE.

4.3.2 Serumstabilität

Die Serumstabilität von [¹¹¹In-DOTA]-Lys([¹¹¹In-DOTA])-TATE soll aufzeigen, ob L-Lysin ein geeigneter Linker ist. Hierzu wurde entsprechend der Konzentration im Patienten 10 ng [¹¹¹In-DOTA]-Lys([¹¹¹In-DOTA])-TATE in 3 mL Blutserum bei 37°C inkubiert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden 100 µL des Blutserums entnommen, die Serumproteine wurden mit Ethanol gefällt und der Überstand mittels analytischer HPLC analysiert.

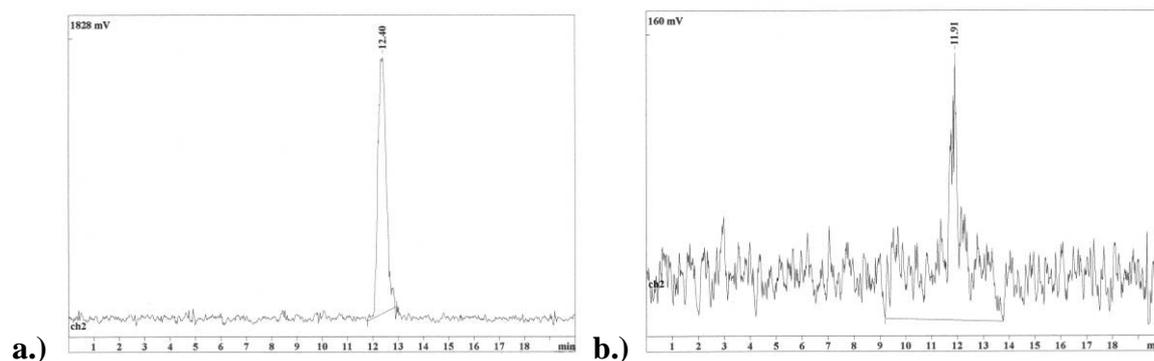


Abbildung 43: Serumstabilität von $[^{111}\text{In-DOTA}]\text{-Lys}([^{111}\text{In-DOTA}])\text{-TATE}$. **a.)** vor der Inkubation im Serum, **b.)** nach 22 h Inkubation in Serum.

Die Spektren der analytischen HPLC zeigen zu allen Zeitpunkten (1 h, 2 h, 3 h und 22 h) nur ein Signal mit derselben Retentionszeit (12 min) an, welches der intakten Substanz $[^{111}\text{In-DOTA}]\text{-Lys}([^{111}\text{In-DOTA}])\text{-TATE}$ entspricht. Somit konnte gezeigt werden, dass das bis-DOTA-Derivat mit L-Lys als Linker im Blutserum stabil bleibt und nicht enzymatisch abgebaut wird.

4.3.3 Markierungsexperimente

In einem ersten Experiment wurden DOTA-TATE, DOTA-Lys(DOTA)-TATE und DOTA₂-Apg-Sar₅-TATE mit den beiden Radionukliden ^{111}In und ^{90}Y markiert. Mittels analytischer HPLC wurden die Retentionszeiten der einzelnen Verbindungen ermittelt und miteinander verglichen. Eine kürzere Retentionszeit entspricht dabei einer hydrophileren Substanz.

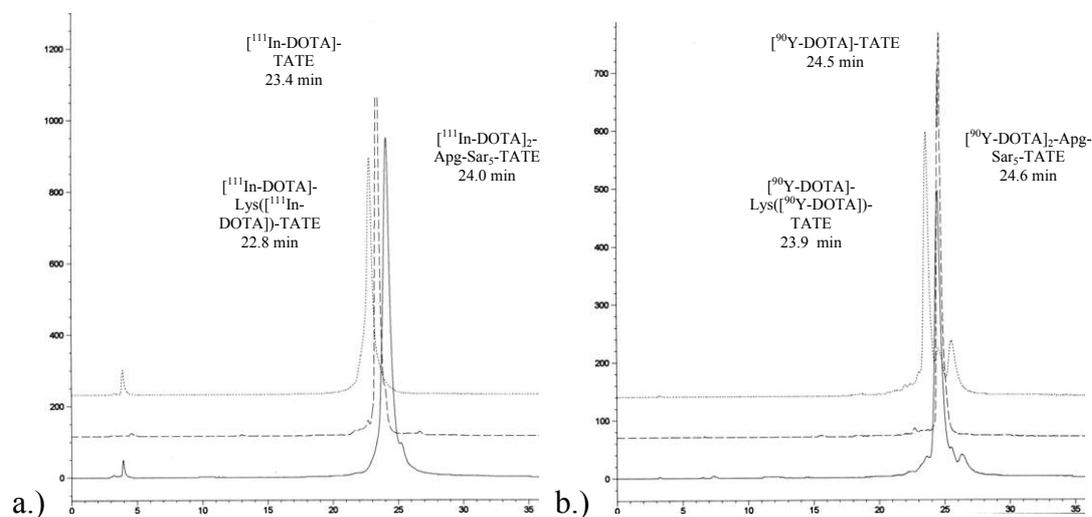


Abbildung 44: Vergleich der Retentionszeiten mittels analytischer HPLC. **a.)** ^{111}In -markierte Derivate, **b.)** ^{90}Y -markierte Derivate.

Die Retentionszeiten der ^{111}In -markierten Verbindungen zeigen die folgende Reihenfolge: $[^{111}\text{In-DOTA}]\text{-Lys}([^{111}\text{In-DOTA}])\text{-TATE}$ (22.8 min), $[^{111}\text{In-DOTA}]\text{-TATE}$ (23.4 min) und $[^{111}\text{In-DOTA}]_2\text{-Apg-Sar}_5\text{-TATE}$ (24.0 min). Dieselbe Reihenfolge zeigt sich bei den ^{90}Y -markierten Derivaten: $[^{90}\text{Y-DOTA}]\text{-Lys}([^{90}\text{Y-DOTA}])\text{-TATE}$ (23.9 min), $[^{90}\text{Y-DOTA}]\text{-TATE}$ (24.5 min) und $[^{90}\text{Y-DOTA}]_2\text{-Apg-Sar}_5\text{-TATE}$ (24.6 min).

Um die Kinetik der Markierung zu messen, wurden jeweils ein 1 mM Aliquot von DOTA-TATE und DOTA-Lys(DOTA)-TATE in 150 μL Natriumacetat Puffer (0,4 M, pH 5.0) gelöst. Entsprechend der Peptidmenge wurde eine 0.1 mM $\text{Y}(\text{NO}_3)_3$ -Lösung zugegeben, welche mit $^{90}\text{YCl}_3$ getracert wurde. Um die Reaktion zu stoppen, wurden nach bestimmten Zeitpunkten 10 μL der Markierlösung zu 50 μL DTPA gegeben und die Markierausbeute mittels analytischer HPLC bestimmt (Abbildung 45). $[^{90/\text{nat}}\text{Y-DOTA}]\text{-Lys}([^{90/\text{nat}}\text{Y-DOTA}])\text{-TATE}$ zeigt eine deutlich schnellere Markierung als $[^{90/\text{nat}}\text{Y-DOTA}]\text{-TATE}$ und entsprechende Reaktionsgeschwindigkeiten von $2.4 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ vs. $1.6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

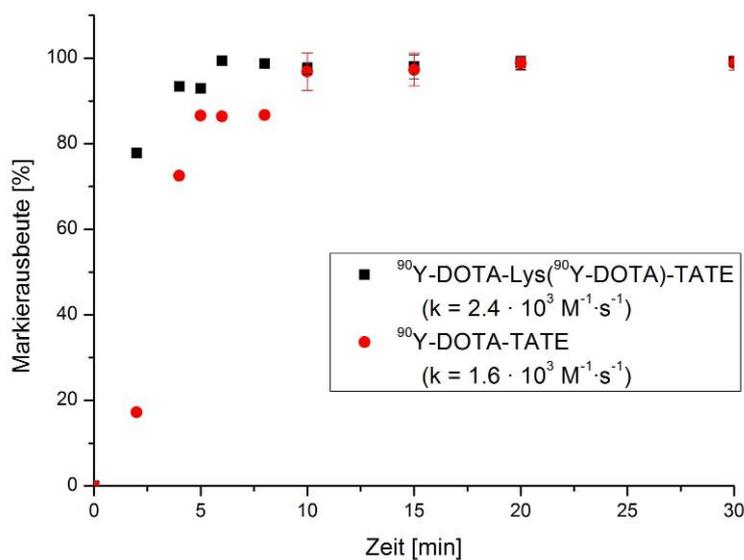


Abbildung 45: Markierausbeuten von $[^{90}\text{Y-DOTA}]\text{-TATE}$ und $[^{90}\text{Y-DOTA}]\text{-Lys}([^{90}\text{Y-DOTA}])\text{-TATE}$ (95°C , Verhältnis Peptid zu Metall = 1:1).

In einem weiteren Markierexperiment wurde DOTA-Lys(DOTA)-TATE mit ^{90}Y bei verschiedenen Temperaturen markiert. Tabelle 18 zeigt die Markierausbeuten bei verschiedenen Verhältnissen von Peptid zu Metall. Bei 95°C und einer Metall-zu-Peptid-

Verhältnis von 1:1 beträgt die Ausbeute nach 30 min 98.6%; dies entspricht einer spezifischen Aktivität von 1783.4 GBq/ μ mol (48.2 Ci/ μ mol). Bei gleicher Temperatur aber doppelter Metallkonzentration beträgt die Ausbeute nach 30 min 80.3%; dies entspricht aber einer spezifischen Aktivität von 2926.7 GBq/ μ mol (79.1 Ci/ μ mol). Nach 30 min bei 50°C beträgt die Markierausbeute noch 53.6%, was einer spezifischen Aktivität von 1983.2 GBq/ μ mol (53.6 Ci/ μ mol) entspricht.

Tabelle 18: Markierausbeuten von [90 Y-DOTA]-Lys([90 Y-DOTA])-TATE bei verschiedenen Temperaturen und verschiedenen Peptid-Metall-Verhältnissen.

Zeit [min]	95°C / 1:1	50°C / 1:2	95°C / 1:2
5	93.0	27.3	78.0
10	96.7	40.4	78.7
15	96.0	44.5	79.5
20	97.8	47.5	80.3
30	98.6	53.6	80.3

4.3.4 Bindungsaffinitäten

Die Rezeptor-Autoradiographie wurde an Zellmembran-Pellets durchgeführt, die mit den 5 Somatostatinrezeptor-Subtypen (sst1-sst5) transfektiert wurden. Für jede Substanz wurde ein Verdrängungsexperiment mit dem universalen Somatostatin-Radioliganden [125 I-Leu⁸-D-Trp²²-Tyr²⁵]-Somatostatin-28 mit ansteigenden Konzentrationen (0.1 bis 1000 nM) an nichtmarkiertem Peptid durchgeführt (119).

In Tabelle 19 sind die IC₅₀-Werte von In^{III}- und Y^{III}-komplexierten DOTA-TATE, DOTA-Lys(DOTA)-TATE, DOTA₂-Apg-TATE und DOTA₂-Apg-Sar₅-TATE zusammengefasst.

Tabelle 19: Bindungsaffinitäten (IC_{50}) in nM für die Somatostatinrezeptor-Subtypen 1-5 (sst1-5), in Klammern Anzahl Experimente

	sst1	sst2	sst3	sst4	sst5
SS28	2.9 ± 0.4 (6)	2.8 ± 0.3 (6)	3.9 ± 0.4 (6)	3.0 ± 0.5 (6)	3.0 ± 0.3 (6)
DOTA-TATE	$>10'000$ (3)	1.5 ± 0.4 (3)	$>1'000$ (3)	453 ± 176 (3)	547 ± 160 (3)
DOTA-Lys(DOTA)-TATE	$>10'000$ (2)	2.5 ± 0.7 (4)	$>10'000$ (4)	497 ± 62 (3)	$>1'000$ (3)
[In-DOTA]-TATE	$>10'000$ (3)	2.5 ± 0.3 (3)	147 ± 19 (3)	227 ± 73 (3)	30 ± 6.4 (3)
[In-DOTA]-Lys([In-DOTA])-TATE	$>10'000$ (2)	2.2 ± 2.4 (2)	465 ± 85 (2)	180 ± 0.0 (2)	48.5 ± 25 (2)
[In-DOTA] ₂ -Apg-TATE	$>10'000$ (2)	5.5 ± 2.6 (2)	455 ± 45 (2)	5.9 ± 0.4 (2)	760 ± 40 (2)
[In-DOTA] ₂ -Apg-Sar ₅ -TATE	$>1'000$ (2)	2.6 ± 0.9 (2)	$>1'000$ (2)	$>1'000$ (2)	380 ± 200 (2)
[Y-DOTA]-TATE	$>10'000$ (4)	1.6 ± 0.4 (3)	$>1'000$ (3)	523 ± 239 (3)	187 ± 50 (3)
[Y-DOTA]-Lys([Y-DOTA])-TATE	$>10'000$ (2)	1.9 ± 0.5 (4)	$>10'000$ (4)	393 ± 58 (3)	$>1'000$ (3)
[Y-DOTA] ₂ -Apg-TATE	$>10'000$ (2)	6.4 ± 3.7 (2)	750 (1)	13 ± 1.4 (2)	900 ± 141 (2)
[Y-DOTA] ₂ -Apg-Sar ₅ -TATE	$>1'000$ (2)	2.5 ± 0.3 (3)	$>10'000$ (3)	720 ± 242 (3)	137 ± 15 (3)

Grundsätzlich besitzen alle Substanzen in Tabelle 19 eine hohe Affinität zum Rezeptorsubtyp 2 und keine zum sst1.

Die Y^{III}-komplexierten Substanzen zeigen eine hohe Affinität zu sst2 und keine Affinität zu sst1 und 3. Zu sst4 hat nur [Y-DOTA]₂-Apg-TATE eine hohe Affinität (13 nM), alle anderen Substanzen binden nur schwach. Ausserdem besitzen [Y-DOTA]-TATE und [Y-DOTA]₂-Apg-Sar₅-TATE eine Affinität zu sst5.

Alle Substanzen sind fast ausschliesslich sst2-spezifische Liganden, [Y-DOTA]-TATE (1.6 nM), [Y-DOTA]-Lys([Y-DOTA])-TATE (1.9 nM) und [Y-DOTA]₂-Apg-Sar₅-TATE (2.5 nM) zeigen keinen signifikanten Unterschied im IC_{50} -Wert.

[Y-DOTA]₂-Apg-TATE (sst2: 6.4) zeigt eine signifikant niedrigere Affinität, was darauf hindeutet, dass die DOTA-Chelatoren und der kurze Spacer die Rezeptorbindung negativ beeinflussen. Interessanterweise zeigt aber [Y-DOTA]₂-Apg-TATE von allen gemessenen Substanzen die höchste Affinität zu sst4. Dieser Wert 13.0 ist nur gerade um den Faktor 4 schlechter als das native SS28.

Die In^{III}-komplexierten Substanzen haben eine hohe Affinität zu sst2 und nur eine geringe Affinität zu sst3, 4, 5, mit Ausnahme von [In-DOTA]₂-Apg-TATE (sst4: 5.9 nM) und [In-DOTA]-TATE (sst5: 30 nM). [In-DOTA]-TATE, [In-DOTA]-Lys([In-DOTA])-TATE und [In-DOTA]₂-Apg-Sar₅-TATE zeigen keinen signifikanten Unterschied im IC₅₀-Wert. [In-DOTA]₂-Apg-TATE bindet signifikant schlechter zu sst2, besitzt aber wieder die beste Affinität zu sst4.

Die IC₅₀-Werte von den nicht-komplexierten Substanzen DOTA-TATE und DOTA-Lys(DOTA)-TATE zeigen nur zu sst2 eine hohe Affinität. Die Werte ohne Metallkomplex entsprechen den Werten von In^{III}- und Y^{III}-komplexierten Substanzen.

Im direkten Vergleich der In^{III}- und Y^{III}-komplexierten Substanzen zeigen sich keine Unterschiede bezüglich Affinität zu sst2. Allerdings verlieren die Y^{III}-komplexierten Substanzen ihre Affinität vollständig zu sst3 und deutlich zu sst5.

4.3.5 Internalisierung

a.) mit Indium-111:

Um die sst2 spezifischen Substanzen zu testen wurden, AR4-2J-Ratten-Pankreas-Tumorzellen verwendet, da diese *in vivo* und *in vitro* sst2-Rezeptoren exprimieren (129). Tabelle 20 zeigt die Werte der Internalisierung der ¹¹¹In-markierten Radioliganden.

Tabelle 20: Internalisierung von ¹¹¹In-markierten Radioliganden (10⁶ AR4-2J-Tumorzellen/ 1.67 nM) in % i.D. ± Standardabweichung.

	30 min	60 min	120 min	240 min
[¹¹¹ In-DOTA]-TATE	6.5 ± 0.6	9.9 ± 1.2	15.4 ± 1.9	21.0 ± 2.3
[¹¹¹ In-DOTA]-Lys([¹¹¹ In-DOTA])-TATE	4.9 ± 0.4	8.5 ± 1.1	14.3 ± 1.1	22.1 ± 2.4
[¹¹¹ In-DOTA]-D-Lys([¹¹¹ In-DOTA])-TATE	5.0 ± 0.2	8.1 ± 0.9	11.6 ± 2.0	22.7 ± 1.0
[¹¹¹ In-DOTA]-Lys([¹¹¹ In-DOTA])-Sar ₅ -TATE	5.1 ± 0.4	11.1 ± 1.8	18.7 ± 2.1	28.8 ± 5.3
[¹¹¹ In-DOTA] ₂ -Apg-TATE	2.9 ± 0.2	5.6 ± 0.3	7.3 ± 0.3	18.3 ± 2.2
[¹¹¹ In-DOTA] ₂ -Apg-Sar ₅ -TATE	6.7 ± 0.4	12.1 ± 0.9	18.6 ± 3.8	23.7 ± 2.6

Alle Radioliganden internalisieren zeitabhängig und AR4-2J/sst2-rezeptorspezifisch. Nach 4 h Inkubation bei 37°C wurde noch kein Plateau erreicht. Nach 4 h Internalisierung zeigen sich

folgende Aufnahmewerte: Als Referenzsubstanz wird [^{111}In -DOTA]-TATE mit einem Wert von 21.0% verwendet. [^{111}In -DOTA] $_2$ -Apg-TATE zeigt eine niedrigere Internalisierung (18.3%; $p=0.06$), [^{111}In -DOTA]-Lys([^{111}In -DOTA])-TATE (22.1%; $p=0.44$) und [^{111}In -DOTA]-D-Lys([^{111}In -DOTA])-TATE (22.7%; $p=0.14$) ohne signifikanten Unterschied und [^{111}In -DOTA] $_2$ -Apg-Sar $_5$ -TATE (23.7%; $p=0.08$) und [^{111}In -DOTA]-Lys([^{111}In -DOTA])-Sar $_5$ -TATE (28.8%; $p=0.01$) haben eine signifikant höhere Internalisierung im Vergleich zur Referenz.

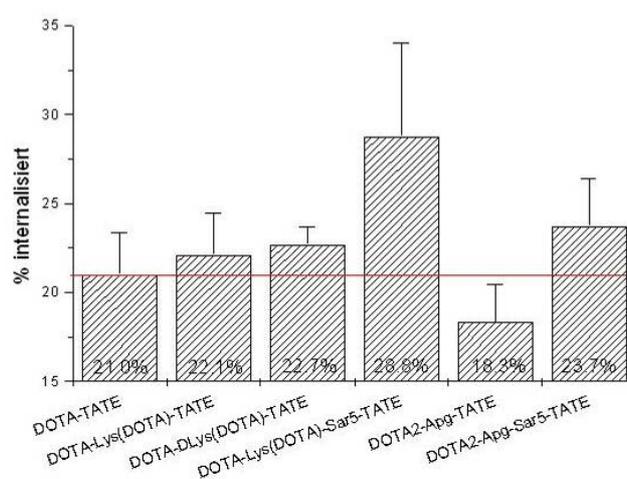


Abbildung 46: Internalisierungswerte von ^{111}In -markierten bis-DOTA-Derivaten nach 4 h.

Das Pentasarcosine, das als Spacer zur Separierung der Chelatoren vom Peptid eingesetzt wurde, beeinflusst die Internalisierung positiv. Die Resultate der Internalisierungen und der Bindungsaffinitäten zu sstr2 korrelieren in hohem Masse.

Tabelle 21: Korrelation zwischen Internalisierungswerten (4 h) und Werten der Bindungsaffinitäten (IC_{50} /hsst2).

	Internalisierung	Bindungsaffinität
	4 h	hsst2
	(% int)	(nM)
[^{111}In -DOTA]-TATE	21.0 ± 2.3	2.5 ± 0.3
[^{111}In -DOTA]-Lys([^{111}In -DOTA])-TATE	22.1 ± 2.4	2.2 ± 2.4
[^{111}In -DOTA] $_2$ -Apg-TATE	18.3 ± 2.2	5.5 ± 2.6
[^{111}In -DOTA] $_2$ -Apg-Sar $_5$ -TATE	23.7 ± 2.6	2.6 ± 0.3

b.) *Yttrium-90*:

DOTA-TATE und DOTA-Lys(DOTA)-TATE wurden zusätzlich mit dem Therapienuklid ^{90}Y markiert und internalisiert. Wie man in Tabelle 22 sieht, gibt es nach 2 h und 4 h keinen signifikanten Unterschied ($p \geq 0.05$) in der Internalisierung mit ^{111}In und ^{90}Y . Auch dieses Resultat korreliert sehr gut mit den Werten der Bindungsaffinität zum sst2.

Tabelle 22: Vergleichende Werte der Internalisierung mit ^{90}Y und ^{111}In (10^6 AR4-2J-Tumorzellen/ 1.67 nM) in % i.D. \pm Standardabweichung.

	120 min	240 min
$[^{111}\text{In-DOTA}]\text{-TATE}$	15.4 ± 1.9	21.0 ± 2.3
$[^{90}\text{Y-DOTA}]\text{-TATE}$	14.0 ± 1.9	20.7 ± 0.6
$[^{111}\text{In-DOTA}]\text{-Lys}([^{111}\text{In-DOTA}])\text{-TATE}$	14.3 ± 1.1	22.1 ± 2.4
$[^{90}\text{Y-DOTA}]\text{-Lys}([^{90}\text{Y-DOTA}])\text{-TATE}$	13.5 ± 0.8	22.5 ± 0.6

4.3.6 Externalisierung

Die Externalisierung wurde nach 2 h Internalisierung gestartet. Nach dem Entfernen des Radiopeptids von den Rezeptoren der Zelloberfläche wurden die Zellen mit Medium überdeckt und bei $37^\circ\text{C}/ 5\% \text{CO}_2$ inkubiert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurde die Menge an Radioaktivität im Medium gemessen und so die Externalisierung aus der Zelle bestimmt.

Tabelle 23: Externalisierung (% in der Zelle verbliebene Radioaktivität), nachdem das Radiopeptid 2 h internalisiert wurde.

Zeit [min]	$[^{111}\text{In-DOTA}]\text{-TATE}$	$[^{111}\text{In-DOTA}]\text{-Lys}([^{111}\text{In-DOTA}])\text{-TATE}$	$[^{111}\text{In-DOTA}]\text{-Lys}([^{111}\text{In-DOTA}])\text{-Sar}_5\text{-TATE}$	$[^{111}\text{In-DOTA}]_2\text{-Apg-TATE}$	$[^{111}\text{In-DOTA}]_2\text{-Apg-Sar}_5\text{-TATE}$
0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
10	94.7 ± 0.5	96.5 ± 0.4	91.6 ± 0.7	93.1 ± 0.3	95.7 ± 1.2
20	92.3 ± 0.7	94.5 ± 0.6	86.7 ± 1.1	89.0 ± 1.2	92.3 ± 1.6
30	90.5 ± 0.8	92.4 ± 0.8	83.5 ± 0.6	86.0 ± 1.7	89.7 ± 2.0
60	86.9 ± 0.7	88.4 ± 0.5	79.5 ± 0.8	80.4 ± 1.8	86.2 ± 3.0
120	80.1 ± 0.7	82.6 ± 0.7	75.0 ± 1.2	69.8 ± 1.6	82.6 ± 3.1

Tabelle 23 zeigt die verbliebene Radioaktivität in der Zelle nach bestimmten Zeitpunkten. Nach 120 min gibt es keinen signifikanten Unterschied der Menge an externalisierter Substanz von $[^{111}\text{In-DOTA}]\text{-TATE}$ (19.9%), $[^{111}\text{In-DOTA}]\text{-Lys}([^{111}\text{In-DOTA}])\text{-TATE}$

(17.4%) und [$^{111}\text{In-DOTA}$] $_2$ -Apg-Sar $_5$ -TATE (17.4%); diese drei Substanzen besitzen auch die gleichen Internalisierungsraten. [$^{111}\text{In-DOTA}$] $_2$ -Apg-TATE (30.2%), mit der niedrigsten Internalisierungsrate, zeigt eine signifikant höhere Externalisierung ($p=0.01$). Das [$^{111}\text{In-DOTA}$] $_2$ -Apg-TATE bindet nach der Externalisierung aus der Zelle wieder an die Rezeptoren, doch die Re-Internalisierung ist entsprechend der Internalisierungsrate deutlich langsamer als bei den vergleichbaren Substanzen. Somit befindet sich weniger Radioaktivität in der Zelle, als bei Substanzen mit hoher Internalisierungsrate.

Die Bindungsaffinitäten und die Internalisierungsraten sind für die ersten drei Substanzen in etwa gleich, somit zeigt sich nach 2 Stunden Externalisierung kein signifikanter Unterschied. Einzig [$^{111}\text{In-DOTA}$]-Lys([$^{111}\text{In-DOTA}$])-Sar $_5$ -TATE (25.0%) zeigt eine schnellere Externalisierung, obwohl die Internalisierung signifikant besser ist als diejenige von [$^{111}\text{In-DOTA}$]-TATE.

4.3.7 Bioverteilungen

Aus den *in vitro*-Daten schliesst man, dass [In-DOTA]-Lys([In-DOTA])-TATE in etwa dieselben Eigenschaften aufweisen sollte wie die Referenzsubstanz [In-DOTA]-TATE. Um diese *in vivo* zu bestätigen, wurde eine Bioverteilung in OFA-Ratten durchgeführt.

Tabelle 24: Bioverteilung von [$^{111}\text{In-DOTA}$]-Lys([$^{111}\text{In-DOTA}$])-TATE in OFA-Ratten.

	4 h	4 h block	24 h
Blut	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Niere	7.44 ± 1.99	6.73 ± 0.59	7.96 ± 0.99
Nebenniere	2.72 ± 1.13	0.73 ± 0.71	2.66 ± 1.31
Pankreas	3.07 ± 0.82	0.21 ± 0.04	2.74 ± 0.26
Milz	0.14 ± 0.41	0.06 ± 0.01	0.11 ± 0.02
Magen	1.38 ± 0.41	0.05 ± 0.01	0.97 ± 0.17
Darm	0.16 ± 0.05	0.04 ± 0.03	0.13 ± 0.03
Leber	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00
Lunge	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.01
Herz	0.05 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01
Kalotte	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Hypophyse	2.35 ± 0.38	0.11 ± 0.07	2.26 ± 0.56

Tabelle 24 zeigt die Resultate der Bioverteilung von [^{111}In -DOTA]-Lys([^{111}In -DOTA])-TATE. Nach 4 h sieht man eine rezeptorspezifische Aufnahme der Aktivität in den Nebennieren (2.7%), dem Pankreas (3.1%), dem Magen (1.4%) und der Hypophyse (2.4%); alle anderen Organe zeigen keine Anreicherung. Nach 24 h sind die folgenden Mengen an Radioaktivität aus den rezeptorspezifischen Organen ausgewaschen worden: Nebenniere 2.1%, Pankreas 10.6%, Magen 29.5%, Hypophyse 4.0%.

Die Anreicherung in den Nieren nach 4 h beträgt 7.4%. Diese Anreicherung konnte durch Zugabe von 100 μg Tyr³-Octreotide nicht blockiert werden, was auf eine nicht rezeptorspezifische Anreicherung in den tubulären Zellen der Nieren hinweist.

Die Bioverteilung von [^{111}In -DOTA]-Lys([^{111}In -DOTA])-TATE in OFA Ratten zeigte eine hohe spezifische Anreicherung der Substanz in den rezeptorpositiven Organen, weshalb das Experiment in einem Tumormodell wiederholt wurde. Dazu wurden [^{111}In -DOTA]-TATE und [^{111}In -DOTA]-Lys([^{111}In -DOTA])-TATE in AR4-2J-tumortragenden Lewis-Ratten verglichen. In Tabelle 25 sind die Daten als Prozent injizierte Dosis pro Gramm Gewebe (% i.D./g Gewebe) dargestellt. Beide Substanzen zeigen eine schnelle Auswaschung aus dem Blut (0.03-0.1 % i.D./g) nach nur 4 h.

[^{111}In -DOTA]-Lys([^{111}In -DOTA])-TATE zeigt im Vergleich zu [^{111}In -DOTA]-TATE nach 4 h eine signifikant höhere Anreicherung in allen rezeptorpositiven Organen wie Nebennieren (7.1% vs. 6.5% i.D./g; $p=0.03$), Pankreas (11.4% vs. 9.3% i.D./g; $p=0.02$), Magen (1.8% vs. 1.1% i.D./g; $p=5 \cdot 10^{-4}$) und Hypophyse (7.1% vs. 3.7% i.D./g; $p=0.01$). Die Anreicherung im Tumor entspricht allerdings nicht diesem Trend und ist nach 4 h für [^{111}In -DOTA]-Lys([^{111}In -DOTA])-TATE mit 2.6% i.D./g. niedriger gegenüber [^{111}In -DOTA]-TATE mit 4.1% i.D./g. Dieser Effekt könnte vom Tumormodell herrühren: Alle sstr-positiven Organe zeigen einen erhöhten Uptake, einzig der implantierte Tumor zeigt niedrigere Werte. Es könnte sein, dass dieser Tumor nicht optimal durchblutet ist und daher weniger Substanz aufnehmen konnte.

Die Koinjektion von 100 µg Tyr³-Octreotide ergibt eine Reduktion der Anreicherung um 93% im Tumor, 98% im Pankreas, 97% in Magen und 92% in den Nebennieren.

Alle anderen Organe ausser den Nieren zeigen eine sehr schnelle Auswaschung der Radioaktivität, was in niedrigen 4 h-Werten resultiert. Die Anreicherung in den Nieren ist 4.9% i.D./g. nach 4 h für [¹¹¹In-DOTA]-Lys([¹¹¹In-DOTA])-TATE und signifikant höher als für [¹¹¹In-DOTA]-TATE (2.4% i.D./g.). Einige wichtige Verhältnisse von Tumor zu rezeptorspezifischen Organen und unspezifischen Organen sind zusätzlich in Tabelle 25 angegeben.

Wichtig für eine mögliche therapeutische Anwendung ist das Verhältnis zwischen Tumor und Niere, das für [¹¹¹In-DOTA]-TATE mit 1.7:1 nach 4 h besser ist als für [¹¹¹In-DOTA]-Lys([¹¹¹In-DOTA])-TATE mit 0.5:1.

Tabelle 25: Bioverteilung von [¹¹¹In-DOTA]-TATE und [¹¹¹In-DOTA]-Lys([¹¹¹In-DOTA])-TATE in AR4-2J-tumortragenden Lewis Ratten (% i.D./g. ± Standardabweichung)

	[¹¹¹ In-DOTA]-TATE			[¹¹¹ In-DOTA]-Lys([¹¹¹ In-DOTA])-TATE		
	4 h	4 h block	24 h	4 h	4 h block	24 h
Blut	0.08 ± 0.09	0.01 ± 0.00	0.03 ± 0.02	0.10 ± 0.02	0.01 ± 0.00	0.03 ± 0.01
Tumor	4.12 ± 0.74	0.17 ± 0.06	1.60 ± 0.25	2.56 ± 0.40	0.19 ± 0.04	2.06 ± 0.66
Niere	2.42 ± 0.78	1.77 ± 0.75	1.82 ± 0.13	4.93 ± 0.90	4.16 ± 0.39	4.16 ± 0.66
Nebenniere	6.46 ± 1.56	0.38 ± 0.29	3.74 ± 0.85	7.10 ± 1.02	0.56 ± 0.27	6.99 ± 1.38
Pankreas	9.31 ± 1.00	0.17 ± 0.06	3.05 ± 0.17	11.41 ± 1.50	0.18 ± 0.05	4.92 ± 0.45
Milz	0.11 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.08 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.05 ± 0.00	0.18 ± 0.01
Magen	1.08 ± 0.62	0.07 ± 0.04	0.59 ± 0.04	1.82 ± 0.11	0.06 ± 0.02	1.21 ± 0.22
Darm	0.24 ± 0.03	0.18 ± 0.27	0.10 ± 0.01	0.28 ± 0.04	0.03 ± 0.01	0.19 ± 0.13
Leber	0.09 ± 0.06	0.03 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.19 ± 0.03	0.04 ± 0.01	0.16 ± 0.01
Lunge	0.09 ± 0.05	0.02 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.16 ± 0.08	0.02 ± 0.00	0.08 ± 0.01
Herz	0.03 ± 0.02	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.07 ± 0.06	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00
Kalotte	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.02	0.02 ± 0.00	0.06 ± 0.04	0.01 ± 0.00	0.03 ± 0.00
Hypophyse	3.70 ± 1.24	0.27 ± 0.04	3.45 ± 0.66	7.09 ± 1.43	0.09 ± 0.05	7.32 ± 1.35
Verhältnisse						
Tumor-zu-Blut	51.5		53.3	25.6		68.7
Tumor-zu-Leber	45.8		32	13.5		12.9
Tumor-zu-Niere	1.7		0.9	0.5		0.5

4.4 Tetra-DOTA-TATE-Derivate

4.4.1 Synthese

Nach der erfolgreichen Synthese der bis-DOTA-TATE-Derivate (Kap. 4.3) wurden nun DOTA-TATE-Derivate mit mehr als 2 Chelatoren synthetisiert. In Abbildung 47 sind die zwei grundsätzlichen Strukturen aufgezeigt, einerseits ein baumartiger Aufbau und andererseits ein linearer, kammartiger Aufbau.

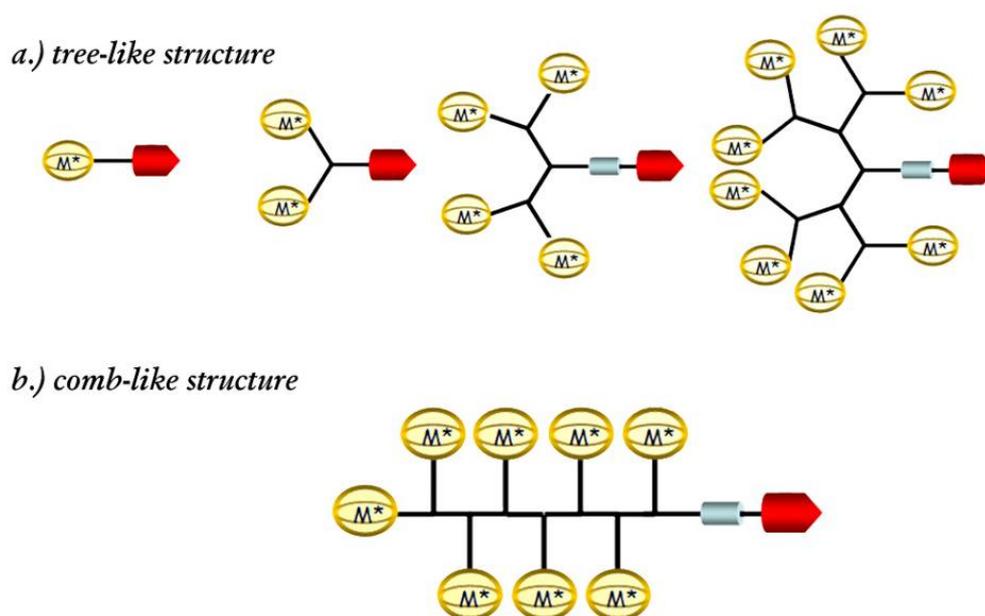


Abbildung 47: Mögliche Strukturen von Poly-DOTA-Derivaten. a.) baumartige (dendritische) Struktur, b.) kammartige (lineare) Struktur.

In einem ersten Ansatz wurden am N-Terminus Fmoc-Lys(Fmoc)-OH gekoppelt. Nach dem Entfernen der Fmoc-Schutzgruppen wurde 2 eq Fmoc-Lys(Fmoc)-OH gekoppelt gefolgt von 4 DOTA(t-Bu)₃ Prochelatoren. Das Chelator-Peptid-Konjugat wurde am Harz mit Tl(TFA)₃ zyklisiert, vom Harz abgespalten und die Seitenketten-Schutzgruppen entfernt. Die Analyse mittels MALDI MS und HPLC ergab kein passendes Molekülion-Signal von DOTA₄-Lys₃-TATE (Abbildung 48). Wahrscheinlich waren die Linker-Arme von Lysin zu kurz, darum war die sterische Hinderung der Chelatoren von DOTA₄-Lys₃-TATE zu gross. Hinzu kamen anfangs Probleme bei der Suche nach der optimalen Matrix zur MALDI-MS-Bestimmung.

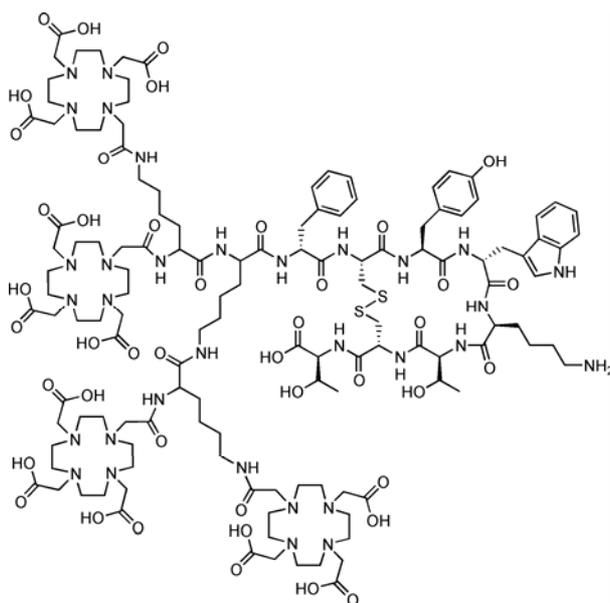


Abbildung 48: Struktur von DOTA₄-Lys₃-TATE (Synthese war nicht erfolgreich).

Darum wurde in einem weiteren Ansatz anstelle von Lysin das Aminopropylglycin (Apg) als Linker verwendet. Wiederum wurde eine baumartige Struktur synthetisiert; nachdem am N-Terminus von TATE Fmoc₂-Apg-OH gekoppelt wurde, wurden die Fmoc-Schutzgruppen abgespalten und nochmals Fmoc₂-Apg-OH gekoppelt. Nach erneutem Abspalten der Fmoc-Schutzgruppen wurden 4 DOTA(t-Bu)₃ Prochelatoren gekoppelt. Das Chelator-Peptid-Konjugat wurde vom Harz abgespalten, in Lösung mit Iod zyklisiert und anschliessend wurden die Seitenketten-Schutzgruppen abgespalten. Man erhielt so DOTA₄-Apg₃-TATE mit einer Ausbeute von 1.7%.

Aus Analogie zu den Resultaten der bis-DOTA-TATE-Derivate wird Pentasarcosine als zusätzliches Spacer-Molekül eingefügt, um die biologischen Eigenschaften zu verbessern oder zumindest zu erhalten. Nach der gleichen Synthesestrategie wie oben beschrieben, wurde DOTA₄-Apg₃-Sar₅-TATE mit einer Ausbeute von 5.9% synthetisiert.

Nachdem die Tetra-DOTA-TATE-Derivate hergestellt waren, wurde die Anzahl der Linkermoleküle erhöht, um ein Okta-DOTA-TATE (Abbildung 49) zu synthetisieren. Aber die Synthese ergab nach der Analyse mittels MALDI MS und HPLC kein passendes Molekülsignal von DOTA₈-Apg₇-Sar₅-TATE (5694.50).

MALDI-MS von [In-DOTA]₈-Apg₇-Sar₅-TATE: 3486.3 (30, [M-6DOTA+In]⁺); 3442.3 (100, [M-6DOTA+2K]⁺); 3408.3 (26, [M-6DOTA+Na]⁺); 3371.3 (83, [M-6DOTA]⁺).

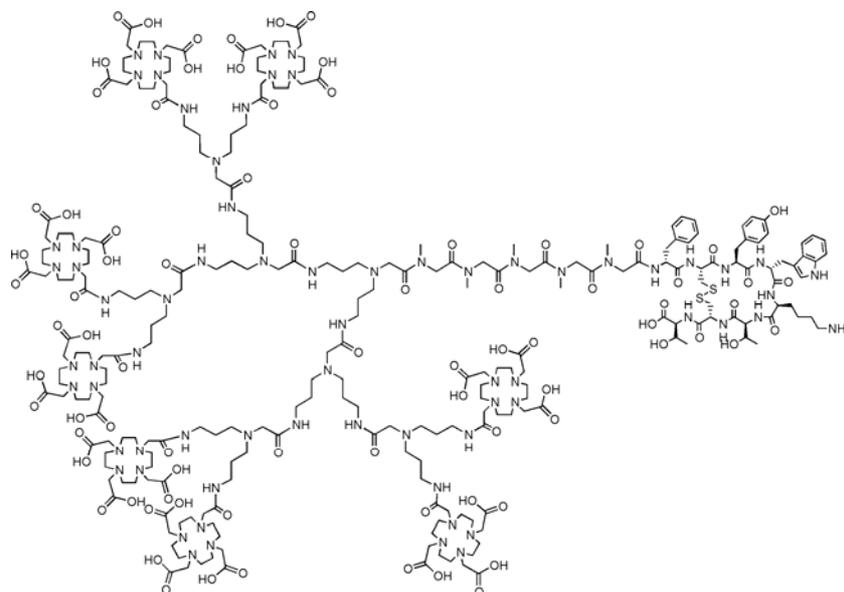


Abbildung 49: Struktur von DOTA₈-Apg₇-Sar₅-TATE (Synthese war nicht erfolgreich).

Da die sterische Hinderung der baumartigen Multi-DOTA-TATE Derivate immer weiter zunimmt und es wahrscheinlich nicht mehr möglich ist ein Okta-DOTA-TATE herzustellen, wurde die Strategie von baumartigen Poly-DOTA-Derivaten zu kammartigen Derivaten geändert.

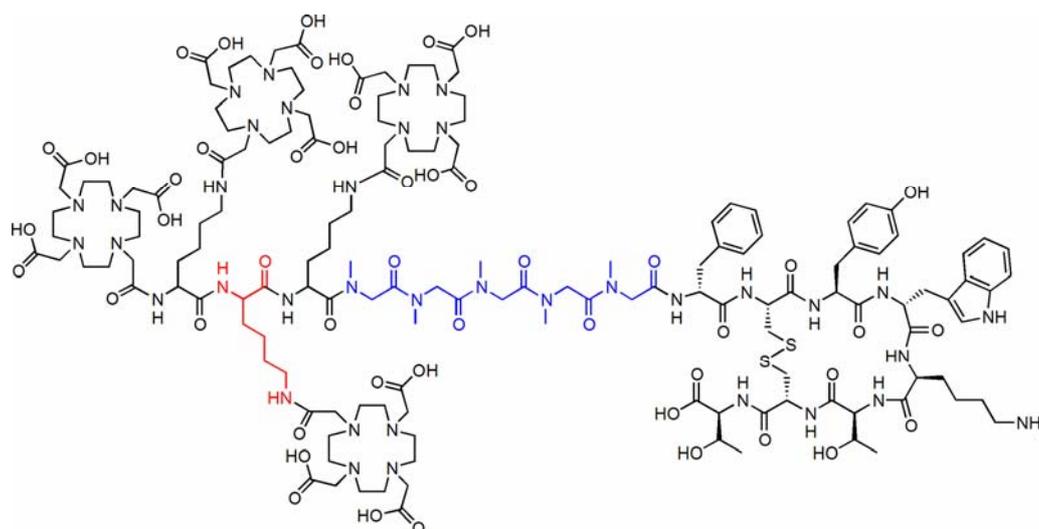


Abbildung 50: Struktur eines baumartigen Tetra-DOTA: DOTA_{4-Lin}Lys₃-Sar₅-TATE

Abbildung 50 zeigt die Strukturformel von DOTA_{4-Lin}Lys₃-Sar₅-TATE, einem kammartigen Multi-DOTA Derivat. Die Synthese verlief nach derselben Strategie wie schon vorher

beschrieben mit dem einzigen Unterschied, dass die Linkermoleküle (Lysin) orthogonal geschützt sein müssen. Zuerst wurde Pentasarcosine als Spacer an den N-Terminus von TATE gekoppelt, danach dreimal Fmoc-Lys(ivDde)-OH, und nach dem Entfernen der ivDde-Schutzgruppe mit 2% Hydrazin und der endständigen Fmoc-Schutzgruppe wurden die 4 DOTA-Chelatoren gekoppelt. Das Chelator-Peptid-Konjugat wurde vom Harz abgespalten, in Lösung mit Iod zyklisiert und die Seitenketten-Schutzgruppen entfernt. Nach der Aufreinigung mittels präparativer HPLC erhielt man DOTA₄-L_{IN}Lys₃-Sar₅-TATE mit einer Ausbeute von 1.7%.

4.4.2 Markierexperimente

Um die Kinetik der Markierung bei verschiedenen Temperaturen zu messen, wurde jeweils ein 1 mM Aliquot von DOTA₄-Apg₃-Sar₅-TATE in 150 µL Natriumacetat Puffer (0,4 M, pH 5.0) gelöst. Entsprechend der Peptidmenge wurde eine 0.1 mM Y(NO₃)₃-Lösung zugegeben, welche mit ⁹⁰YCl₃ versetzt wurde. Die Reaktionslösungen wurden bei 95°C, 60°C und 37°C inkubiert und nach definierten Zeitpunkten wurden die Markierausbeute mittels analytischer HPLC bestimmt (Tabelle 26).

Tabelle 26: Markierausbeuten in % von [⁹⁰Y-DOTA]₄-Apg₃-Sar₅-TATE bei verschiedenen Temperaturen. Verhältnis von Metall zu Peptid beträgt 1:1.

Zeit [min]	Temperaturen		
	95°C	60°C	37°C
0	0	0	0
2	54.8	5.2	
4	97.4	11.4	
6	100.0	18.2	
8	97.8	27.3	
10		35.7	5.3
20		66.2	2.5
30	100.0	83.3	
45			4.7
60	96.4	96.1	6.6

Bei 95°C wurde schon nach 5 min eine Markierausbeute von >95% erreicht, bei 60°C war die Markierung langsamer, erreichte aber dennoch nach 60 min eine Markierausbeute von >95%. Bei 37°C betrug die Markierausbeute nach 60 min nur gerade 6.6%.

Zusätzlich wurde DOTA₄-Apg₃-Sar₅-TATE mit 1 eq, 2 eq und 4 eq ⁹⁰Y bei 95°C inkubiert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurde die Reaktion gestoppt und die Markierausbeuten mittels analytischer HPLC bestimmt (Tabelle 27).

Tabelle 27: Markierausbeuten in % von [⁹⁰Y-DOTA]₄-Apg₃-Sar₅-TATE mit doppelter und vierfacher Metallmenge bei 95°C.

	Verhältnis Peptid / Metallmenge		
	1:1	1:2	1:4
0	0	0	0
10		98.9	43.9
20		100.0	43.4
30	100.0	100.0	44.4
60	96.4		46.0
90		98.9	49.7

Bei 95°C und einem Verhältnis von 1 eq Metall zu 1 eq Peptid beträgt die Ausbeute nach 30 min schon 100%; dies entspricht einer spezifischen Aktivität von 1809.3 GBq/μmol (48.9 Ci/μmol). Bei doppelter Metallkonzentration beträgt die Ausbeute schon nach 10 min 98.9%; dies entspricht einer spezifischen Aktivität von 3618.6 GBq/μmol (97.8 Ci/μmol). Bei der vierfachen Metallkonzentration beträgt die Markierausbeute nach 90 min 49.7%, was einer spezifischen Aktivität von 3596.4 GBq/μmol (97.2 Ci/μmol) entspricht.

4.4.3 Bindungsaffinitäten

In Tabelle 28 sind die IC₅₀-Werte von In^{III}- und Y^{III}-komplexierten DOTA-TATE und Tetra-DOTA-Derivate zusammengefasst.

Tabelle 28: Bindungsaffinitäten (IC_{50}) in nM für die Somatostatinrezeptor-Subtypen 1-5 (sst1-5), in Klammern Anzahl Experimente

	sst1	sst2	sst3	sst4	sst5
SS28	2.9 ± 0.4 (6)	2.8 ± 0.3 (6)	3.9 ± 0.4 (6)	3.0 ± 0.5 (6)	3.0 ± 0.3 (6)
[In-DOTA]-TATE	>10'000 (3)	2.5 ± 0.3 (3)	147 ± 19 (3)	227 ± 73 (3)	30 ± 6.4 (3)
[In-DOTA] ₄ -Apg ₃ -TATE	>10'000 (3)	49 ± 10.4 (3)	>1'000 (3)	>1'000 (3)	>1'000 (3)
[In-DOTA] ₄ -Apg ₃ -Sar ₅ -TATE	>10'000 (3)	4.8 ± 1.3 (3)	>1'000 (1)	>1'000 (1)	360 (1)
[In-DOTA] ₄ -L ^{IN} Lys ₃ -Sar ₅ -TATE	>1'000 (1)	14 (1)	>1'000 (1)	774 (1)	289 (1)
[Y-DOTA]-TATE	>10'000 (3)	1.6 ± 0.4 (3)	>1'000 (3)	523 ± 239 (3)	187 ± 50 (3)
[Y-DOTA] ₄ -Apg ₃ -TATE	>10'000 (1)	35 (1)	>10'000 (1)	>10'000 (1)	>1'000 (1)

Die Referenzsubstanz DOTA-TATE, komplexiert mit In^{III} oder Y^{III} zeigt keine Affinität zu sst1, eine hohe Affinität zu sst2 und wenig Affinität zu sst3, 4 und 5. Die Tetra-DOTA-TATE-Derivate besitzen fast ausschliesslich eine Affinität zu sst2. Die Affinitäten von [In-DOTA]-TATE (2.5 nM) und [In-DOTA]₄-Apg₃-Sar₅-TATE (4.8 nM) zeigen keinen grossen Unterschied zu sst2, wohingegen [In-DOTA]₄-Apg₃-TATE (49 nM) einen signifikant niedrigeren Wert hat. Weiter sieht man keinen signifikanten Unterschied zwischen In^{III}- und Y^{III}-markierten Substanzen: [In-DOTA]₄-Apg₃-TATE (49 nM) vs. [Y-DOTA]₄-Apg₃-TATE (35 nM).

Der Wert der Bindungsaffinität von [In-DOTA]₄-L^{IN}Lys₃-Sar₅-TATE (14 nM) zu sst2 korreliert hervorragend mit der Internalisierungsgeschwindigkeit. Bei beiden Experimenten liegt [In-DOTA]₄-L^{IN}Lys₃-Sar₅-TATE unterhalb den Werten der Referenzsubstanz [In-DOTA]-TATE, ist aber deutlich besser als [In-DOTA]₄-Apg₃-TATE.

4.4.4 Internalisierung

Tabelle 29 zeigt die Werte der Internalisierung der ¹¹¹In-markierten Tetra-DOTA-Derivate im Vergleich zu DOTA-TATE in AR4-2J-Tumorzellen.

Tabelle 29: Internalisierung von ^{111}In -markierten Radioliganden (10^6 AR4-2J-Tumorzellen/ 1.67 nM) in % i.D. \pm Standardabweichung.

	30 min	60 min	120 min	240 min
$[^{111}\text{In-DOTA}]\text{-TATE}$	6.5 ± 0.6	9.9 ± 1.2	15.4 ± 1.9	21.0 ± 2.3
$[^{111}\text{In-DOTA}]_4\text{-Apg}_3\text{-TATE}$	0.2 ± 0.2	0.7 ± 0.1	1.1 ± 0.3	3.2 ± 0.5
$[^{111}\text{In-DOTA}]_4\text{-Apg}_3\text{-Sar}_5\text{-TATE}$	3.5 ± 0.6	4.7 ± 4.5	11.0 ± 0.9	21.5 ± 3.8
$[^{111}\text{In-DOTA}]_4\text{-Lys}_3\text{-Sar}_5\text{-TATE}$	1.8 ± 0.7	3.4 ± 0.7	6.5 ± 0.3	12.8 ± 0.6

Die Tetra-DOTA-TATE-Derivate internalisieren alle AR4-2J/sst2-rezeptorspezifisch und erreichen nach 4 h Inkubation bei 37°C noch kein Plateau. Nach 4 h Internalisierung zeigt sich die folgende Reihenfolge: $[^{111}\text{In-DOTA}]\text{-TATE}$ (21.0%) und $[^{111}\text{In-DOTA}]_4\text{-Apg}_3\text{-Sar}_5\text{-TATE}$ (21.5%) ohne signifikanten Unterschied ($p=0.79$), $[^{111}\text{In-DOTA}]_4\text{-Apg}_3\text{-TATE}$ (3.2%) mit einem signifikant niedrigeren Wert der Internalisierung und $[^{111}\text{In-DOTA}]_4\text{-Lys}_3\text{-Sar}_5\text{-TATE}$ mit einer Internalisierung von 12.8%, die dazwischen liegt.

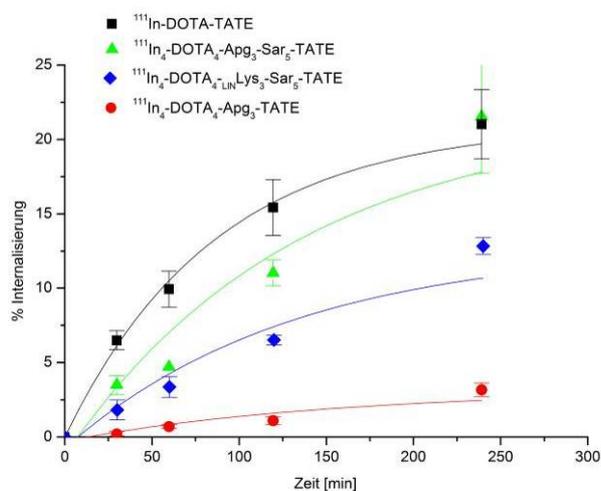


Abbildung 51: Internalisierungskinetik von ^{111}In -markierten DOTA-TATE und Tetra-DOTA-TATE Derivaten (in AR4-2J Zellen).

Die Internalisierung von $[^{111}\text{In-DOTA}]_4\text{-Apg}_3\text{-TATE}$ ist stark verlangsamt im Vergleich zu $[^{111}\text{In-DOTA}]\text{-TATE}$, was zusammen mit einem niedrigen IC_{50} -Wert (sst2: 49 ± 10) auf eine schlechte Bindung zum Rezeptor hinweist, dies wahrscheinlich wegen des Einflusses der sterisch anspruchsvollen DOTA-Chelatoren. Die Einführung des Pentasarcosine als Spacer zur Separierung der Chelatoren vom Peptidteil beeinflusst die

Internalisierungsgeschwindigkeit klar positiv und korreliert hervorragend mit den Resultaten der Bindungsaffinität zu sst2-Rezeptoren.

4.4.5 Externalisierung

Die Externalisierung wurde nach 2 h Internalisierung gestartet. Nach dem Entfernen des Radiopeptids von den Rezeptoren der Zelloberfläche wurden die Zellen mit Medium überdeckt und bei 37°C inkubiert.

Tabelle 30: Externalisierung (% in der Zelle verbliebene Radioaktivität), nachdem das Radiopeptid 2 h internalisiert wurde.

	$[^{111}\text{In-DOTA}]$ - TATE	$[^{111}\text{In-DOTA}]_4$ -Apg ₃ - TATE	$[^{111}\text{In-DOTA}]_4$ -Apg ₃ - Sar ₅ -TATE	$[^{111}\text{In-DOTA}]_4$ -L ^{IN} LyS ₃ - Sar ₅ -TATE
0	100.0	100.0	100.0	100.0
10	94.7 ± 0.5	86.6 ± 2.3	95.2 ± 0.1	82.3 ± 1.1
20	92.3 ± 0.7	82.4 ± 2.4	93.0 ± 0.4	79.5 ± 1.2
30	90.5 ± 0.8	79.6 ± 2.4	91.7 ± 0.7	77.2 ± 1.4
60	86.9 ± 0.7	73.3 ± 2.6	88.0 ± 1.1	73.3 ± 1.5
120	80.1 ± 0.7	63.6 ± 2.3	79.7 ± 1.3	69.1 ± 1.5

Tabelle 30 zeigt die verbliebene Radioaktivität in der Zelle nach verschiedenen Zeitpunkten. Nach 2 h zeigt sich kein signifikanter Unterschied ($p=0.52$) zwischen $[^{111}\text{In-DOTA}]$ -TATE (19.9%) und $[^{111}\text{In-DOTA}]_4$ -Apg₃-Sar₅-TATE (20.3%). $[^{111}\text{In-DOTA}]_4$ -Apg₃-TATE (36.4%) ohne Spacer-Molekül und $[^{111}\text{In-DOTA}]_4$ -L^{IN}LyS₃-Sar₅-TATE (30.9%) werden schneller externalisiert. Substanzen wie $[^{111}\text{In-DOTA}]_4$ -Apg₃-TATE und $[^{111}\text{In-DOTA}]_4$ -L^{IN}LyS₃-Sar₅-TATE, die eine langsame Internalisierung haben, werden schneller ausgeschieden.

4.4.6 Bioverteilungen

Aus den *in vitro*-Daten wurde ersichtlich, dass DOTA₄-Apg₃-Sar₅-TATE die interessanteste Substanz darstellt. Die Bindungsaffinität und auch die Internalisierungsgeschwindigkeit bleiben im Vergleich zur Referenzsubstanz DOTA-TATE gleich, obwohl der N-Terminus des Peptids mit 4 DOTA-Chelatoren modifiziert wurde. Zur Bestätigung dieser guten Resultate *in*

in vivo wurde eine Bioverteilung in AR4-2J-tumortragenden Lewis-Ratten durchgeführt. In einem ersten Versuch wurde DOTA₄-Apg₃-Sar₅-TATE mit niedriger spezifischer Aktivität markiert (50 GBq/μmol). In einem zweiten Versuch wurde DOTA₄-Apg₃-Sar₅-TATE mit ¹¹¹In und zusätzlich mit ^{nat}InCl₃ markiert, um eine homogen-komplexierte Substanz zu erhalten. Die Resultate der beiden Versuche zeigten dieselben Ergebnisse und wurden darum in Tabelle 31 zusammengefasst und diskutiert.

Tabelle 31: Bioverteilung von [¹¹¹In-DOTA]₄-Apg₃-Sar₅-TATE in AR4-2J-tumortragenden Lewis-Ratten (% i.D./g Gewebe / n=8 Tiere).

	[¹¹¹ In-DOTA]-TATE	[¹¹¹ In-DOTA] ₄ -Apg ₃ -Sar ₅ -TATE		
	4h	4 h	4 h block	24 h
Blut	0.08 ± 0.09	0.05 ± 0.03	0.03 ± 0.02	0.02 ± 0.01
Tumor	4.12 ± 0.74	1.92 ± 0.53	0.27 ± 0.04	1.38 ± 0.19
Niere	2.42 ± 0.78	2.97 ± 0.25	4.41 ± 0.81	2.33 ± 0.16
Nebenniere	6.46 ± 1.56	5.26 ± 1.45	0.77 ± 0.37	4.59 ± 0.46
Pankreas	9.31 ± 1.00	9.34 ± 0.80	0.31 ± 0.09	4.22 ± 0.08
Milz	0.11 ± 0.02	0.10 ± 0.01	0.08 ± 0.02	0.09 ± 0.01
Magen	1.08 ± 0.62	1.64 ± 0.15	0.07 ± 0.02	0.92 ± 0.15
Darm	0.24 ± 0.03	0.28 ± 0.04	0.07 ± 0.02	0.20 ± 0.03
Leber	0.09 ± 0.06	0.06 ± 0.00	0.09 ± 0.03	0.05 ± 0.00
Lunge	0.09 ± 0.05	0.11 ± 0.07	0.04 ± 0.01	0.07 ± 0.04
Herz	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.00
Kalotte	0.03 ± 0.02	0.04 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.00
Hypophyse	1.78 ± 1.68	5.74 ± 0.96	0.09 ± 0.10	4.12 ± 1.48
Verhältnisse:				
Tumor-zu-Blut	51.5	38.4		69.0
Tumor-zu-Leber	45.8	32.0		27.6
Tumor-zu-Niere	1.7	0.6		0.6

Tabelle 31 zeigt die Resultate der Bioverteilung von [¹¹¹In-DOTA]₄-Apg₃-Sar₅-TATE. Nach 4 h sind noch 0.1% Aktivität im Blut; dieser Wert entspricht den Werten von [¹¹¹In-DOTA]-TATE (0.1%) und [¹¹¹In-DOTA]-Lys([¹¹¹In-DOTA])-TATE (0.1%). Nach 4 h zeigt [¹¹¹In-DOTA]₄-Apg₃-Sar₅-TATE im Vergleich zu [¹¹¹In-DOTA]-TATE den gleich hohen Uptake in Pankreas (9.3% vs. 9.3% i.D./g) und Nebenniere (5.3% vs. 6.5% i.D./g; p=0.14) und eine signifikant höhere Anreicherung in der Hypophyse (5.7% vs. 1.8% i.D./g; p=10⁻⁴) und im

Magen (1.6% vs. 1.1% i.D./g: $p=0.04$). Gleich wie für $[^{111}\text{In-DOTA}]\text{-Lys}([^{111}\text{In-DOTA}])\text{-TATE}$ (4 h: 2.6%) zeigt der Tumoruption von $[^{111}\text{In-DOTA}]_4\text{-Apg}_3\text{-Sar}_5\text{-TATE}$ (4 h: 1.9%) einen niedrigeren Wert im Vergleich zu $[^{111}\text{In-DOTA}]\text{-TATE}$ (4 h: 4.1%). Alle weiteren Organe zeigen keine rezeptorspezifische Anreicherung von Radioaktivität.

Die Blockierung der rezeptorpositiven Organe mit 100 $\mu\text{g Tyr}^3\text{-Octreotide}$ reduziert die Anreicherung um 86% im Tumor, 97% im Pankreas, 96% im Magen und 85% in den Nebennieren.

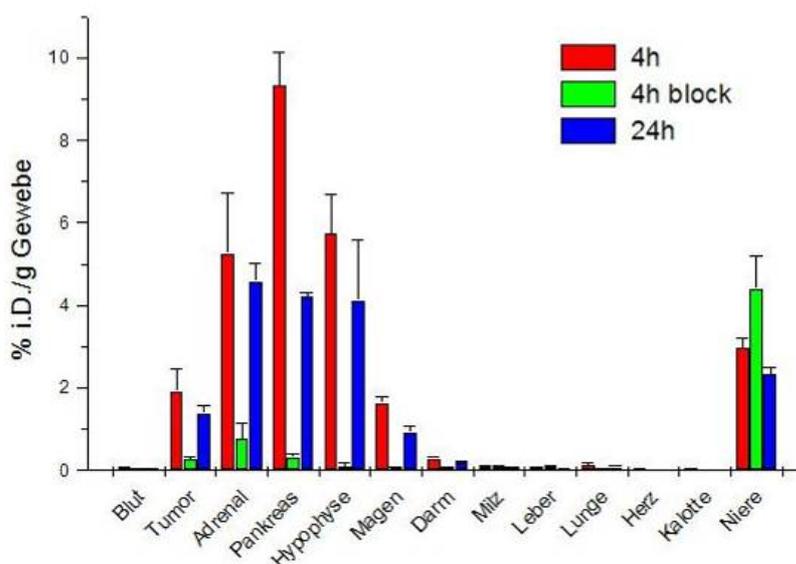


Abbildung 52: Bioverteilung von $[^{111}\text{In-DOTA}]_4\text{-Apg}_3\text{-Sar}_5\text{-TATE}$ in AR4-2J tumortragenden Lewis Ratten.

Die Ausscheidung der Radioaktivität aus den rezeptorpositiven Organen erfolgt langsam, sodass nach 24 h noch 72% der Radioaktivität im Tumor, noch 87% in den Nebennieren und 45% im Pankreas sind. Aus allen anderen Organen ausser den Nieren erfolgt die Auswaschung sehr schnell. Die Anreicherung in den Nieren nach 4 h ist 3.0% i.D./g. für $[^{111}\text{In-DOTA}]_4\text{-Apg}_3\text{-Sar}_5\text{-TATE}$ und signifikant ($p=0.02$) höher als für $[^{111}\text{In-DOTA}]\text{-TATE}$ (2.4% i.D./g.). Wie im Versuch mit $[^{111}\text{In-DOTA}]\text{-Lys}([^{111}\text{In-DOTA}])\text{-TATE}$ sind in Tabelle 31 verschiedene Tumor-zu-Organ-Verhältnisse angegeben, die durch den niedrigen Tumoruption für $[^{111}\text{In-DOTA}]_4\text{-Apg}_3\text{-Sar}_5\text{-TATE}$ ausnahmslos schlechter sind als für $[^{111}\text{In-DOTA}]\text{-TATE}$.

4.5 Targeted MRI Contrast Agents

4.5.1 Taktik/Synthese

Bei der Synthese der Poly-DOTA-Derivate ging es hauptsächlich um den Effekt der „Signal- und Dosiserhöhung“. Dieser Effekt ist wichtig für therapeutische Anwendungen, wo es darum geht, eine möglichst hohe spezifische Aktivität zu erreichen. Aber auch für diagnostische Anwendungen ist eine Signalerhöhung nützlich, so ist es z.B. für ein MRI-Kontrastmittel entscheidend eine möglichst hohe Konzentration von paramagnetischen Gd^{III} -Kernen zum untersuchenden Gewebe zu bringen. Wie mit verschiedenen Markierversuchen gezeigt werden konnte, kann man das Signal mit den Tetra-DOTA-TATE-Derivaten um den Faktor 4 erhöhen. DOTA₄-Apg₃-Sar₅-TATE erfüllt zudem den Anspruch das Signal erhöhen zu können, ohne zugleich die biologische Aktivität negativ zu beeinflussen.

Als Metallion der Wahl für den Einsatz in MRI-Kontrastmitteln eignet sich Gadolinium hervorragend. Die Relaxationszeiten von Protonen nehmen deutlich ab, wenn sich in der Nähe ein paramagnetischer Komplex mit Gd^{3+} (f^7) oder Mn^{2+} (d^5) befindet. Zur Bestimmung der Bindungsaffinitäten (IC_{50} -Werte) wurde natürliches Gd^{III} zur Komplexierung verwendet, für die Internalisierungsexperimente ^{153}Gd (γ -Emitter/ $T_{1/2}=242$ Tage).

4.5.2 Bindungsaffinitäten

In Tabelle 32 sind die IC_{50} -Werte von In^{III} - und Gd^{III} -komplexierten DOTA-TATE und DOTA₄-Apg₃-Sar₅-TATE zusammengestellt.

Tabelle 32: Bindungsaffinitäten (IC_{50}) in nM für die Somatostatinrezeptor-Subtypen 1-5 (sst1-sst5), in Klammern Anzahl Experimente.

	sst1	sst2	sst3	sst4	sst5
SS28	2.9 ± 0.4 (6)	2.8 ± 0.3 (6)	3.9 ± 0.4 (6)	3.0 ± 0.5 (6)	3.0 ± 0.3 (6)
[In-DOTA]-TATE	$>10'000$ (3)	2.5 ± 0.3 (3)	147 ± 19 (3)	227 ± 73 (3)	30 ± 6.4 (3)
[In-DOTA] ₄ -Apg ₃ -Sar ₅ -TATE	$>10'000$ (3)	4.8 ± 1.3 (3)	$>1'000$ (1)	$>1'000$ (1)	360 (1)
[Gd-DOTA]-TATE	$>1'000$ (1)	4.0 ± 0.6 (4)	$>1'000$ (1)	845 (1)	183 (1)
[Gd-DOTA] ₄ -Apg ₃ -Sar ₅ -TATE	$>1'000$ (2)	14.8 ± 4.6 (4)	$>1'000$ (2)	$>1'000$ (2)	$>1'000$ (2)

Alle untersuchten Substanzen zeigen keine Affinität zu sst1, [In-DOTA]-TATE besitzt eine hohe Affinität zu sst2 und mässige Affinität zu den sst3, 4 und 5. Beim Wechsel des Metalls von In^{III} zu Gd^{III} verliert [Gd-DOTA]-TATE allgemein an Affinität zu allen Rezeptorsubtypen, im speziellen verschlechtert sich die Bindungsaffinität zu sst2 um den Faktor 1.6 (von 2.5 nM auf 4.0 nM).

DOTA₄-Apg₃-Sar₅-TATE besitzt als In^{III} - und Gd^{III} -Komplex nur zu sst2 eine gute Affinität mit 4.8 nM resp. 14.8 nM; der Wechsel von In^{III} zu Gd^{III} verringerte die Affinität um den Faktor 3.1 ($p=0.09$).

4.5.3 Internalisierung

Die Internalisierungswerte wurden für [¹⁵³Gd-DOTA]-TATE und [¹⁵³Gd-DOTA]₄-Apg₃-Sar₅-TATE in zwei verschiedenen Zelllinien durchgeführt:

a.) *AR4-2J*: Interessanterweise gibt es keinen signifikanten Unterschied ($p<0.74$) in der Internalisierung nach 4 h von [¹¹¹In-DOTA]-TATE (21.0%), [¹¹¹In-DOTA]₄-Apg₃-Sar₅-TATE (21.5%) und [¹⁵³Gd-DOTA]₄-Apg₃-Sar₅-TATE (21.1%). Trotz grösserer Unterschiede in den Bindungsaffinitäten zum Rezeptorsubtyp 2 bleiben die Internalisierungsraten dieselben. [¹⁵³Gd-DOTA]-TATE besitzt zweifach schlechtere Bindungsaffinität (4.8 nM) zu sst2. Somit würde man eine signifikant schlechtere Internalisierung erwarten, doch nach 4 h sind 44.2% der eingesetzten Aktivität in den Tumorzellen. Eine mögliche Erklärung könnte das zusätzlich gebundene Wassermolekül am ¹⁵³Gd^{III} sein, das die Internalisierung deutlich positiv beeinflusst, dasselbe würde dann auch erklären, dass [¹⁵³Gd-DOTA]₄-Apg₃-Sar₅-TATE trotz einer Bindungsaffinität von 14.8 nM nach 4 h im Vergleich zur Referenzsubstanz [¹¹¹In-DOTA]-TATE keinen signifikanten Unterschied der Internalisierung zeigt.

Die Menge an internalisierter Substanz nach 4 h beträgt für [¹⁵³Gd-DOTA]₄-Apg₃-Sar₅-TATE 21.1%. Ausgehend von 2.5 pmol eingesetzter Peptidmenge ergibt das nach 4 h 400'000

Moleküle pro Tumorzelle und bezogen auf die Menge Gadolinium 1.6 Mio Gd^{III}-Ionen pro Zelle.

Tabelle 33: Internalisierung von ¹¹¹In- und ¹⁵³Gd-markierten Radioliganden (10⁶ AR4-2J-Tumorzellen/ 1.67 nM) in % i.D. ± Standardabweichung

	30 min	60 min	120 min	240 min	360 min
[¹¹¹ In-DOTA]-TATE	6.5 ± 0.6	9.9 ± 1.2	15.4 ± 1.9	21.0 ± 2.3	
[¹¹¹ In-DOTA] ₄ -Apg ₃ -Sar ₅ -TATE	3.5 ± 0.6	4.7 ± 4.5	11.0 ± 0.9	21.5 ± 3.8	
[¹⁵³ Gd-DOTA]-TATE	14.1 ± 2.3	20.5 ± 1.9	31.5 ± 1.7	44.2 ± 1.8	62.3 ± 6.2
[¹⁵³ Gd-DOTA] ₄ -Apg ₃ -Sar ₅ -TATE	3.6 ± 1.1	6.8 ± 1.1	13.5 ± 0.7	21.1 ± 2.3	34.6 ± 1.1

b.) *HEK rsst2*: In einem weiteren Internalisierungsexperiment wurden HEK-rsst2-Zellen verwendet. Diese humane Zelllinie wurde mit Ratten-Somatostatinrezeptoren des Subtyps 2 transfektiert (rsst2) und besitzt etwa 100'000 Rezeptoren an der Zelloberfläche, wodurch eine deutlich höhere und schnellere Internalisierung zu erwarten ist. In Tabelle 34 sind die Internalisierungswerte der HEK-rsst2-Zellen im Vergleich zu AR4-2J-Tumorzellen aufgelistet.

Tabelle 34: Vergleich der Internalisierung von [¹⁵³Gd-DOTA]₄-Apg₃-Sar₅-TATE in AR4-2J- und HEK-rsst2-Tumorzellen (totale Menge an internalisierter Substanz in % i.D. ± Standardabweichung, 10⁶ Zellen).

Zeit [min]	AR4-2J		HEK rsst2	
	1.67 nM	1.67 nM	6.67 nM	66.7 nM
30	4.1			
60	7.3			
120	14.3	23.4	30.9	4.1
240	22.5	25.9	39.7	5.2
360	37.0	27.5	45.4	6.6

Nach 6 h sind 37% der eingesetzten Menge [¹⁵³Gd-DOTA]₄-Apg₃-Sar₅-TATE in den AR4-2J-Tumorzellen. Pro Zelle entspricht dies ~560'000 Molekülen oder 2.2 Mio Gd^{III}-Ionen. Bei der HEK-rsst2-Tumorzelllinie wurden bei gleicher Konzentration nur 27.5% internalisiert, aber nach der Erhöhung der Konzentration waren 45.4% respektive 6.6% internalisiert, was im Maximum 4 Mio Molekülen oder 16 Mio Gd-Kernen pro Tumorzelle entsprach.

Ausgehend von dieser Menge an internalisierter Substanz von $16 \cdot 10^6$ Gd-Kernen pro Zelle und den Annahmen von Nunn et al. (130) mit etwa 10^{12} Zellen pro Liter Gewebe konnte eine mögliche Konzentration von rund $25 \mu\text{M}$ im Tumor *in vivo* berechnet werden. Man geht davon aus, dass eine $10 \mu\text{M}$ Lösung schon ein gutes Signal im MRI ergibt.

4.5.4 ^1H -NMRD-Messungen

Die Relaxivität der Gd^{III} -markierten Derivate DOTA-TATE und $\text{DOTA}_4\text{-Apg}_3\text{-Sar}_5\text{-TATE}$ wurden von Eva Toth an der EPFL (École Polytechnique Fédérale de Lausanne) gemessen. Aus der Literatur sind die Werte von $[\text{Gd-DTPA}(\text{H}_2\text{O})]^-$ ($r_1=4.69 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}/ 20 \text{ MHz}/ 25^\circ\text{C}$) und $[\text{Gd-DOTA}(\text{H}_2\text{O})]^-$ ($r_1=4.74 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}/ 20 \text{ MHz}/ 25^\circ\text{C}$ und $3.83 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ bei 37°C) bekannt und bilden für uns den eigentlichen Referenzwert bei den MRI-Kontrastmitteln.

Durch die Kopplung von $[\text{Gd-DOTA}]$ an ein Peptid verlangsamt sich die Rotationszeit der Substanz, und man erwartet eine Erhöhung der Relaxivität: $[\text{Gd-DOTA}]$ -TATE besitzt einen Wert von $r_1=4.17 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}/ 12 \text{ MHz}/ 25^\circ\text{C}$ und liegt somit tiefer als erwartet. Für $[\text{Gd-DOTA}]_4\text{-Apg}_3\text{-Sar}_5\text{-TATE}$ wurde eine Relaxivität von $r_1=8.9 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}/ 20 \text{ MHz}/ 37^\circ\text{C}$ pro Chelator gemessen. Abbildung 53 zeigt die Relaxivität von $[\text{Gd-DOTA}]_4\text{-Apg}_3\text{-Sar}_5\text{-TATE}$ bei verschiedenen Magnetfeldstärken und Temperaturen.

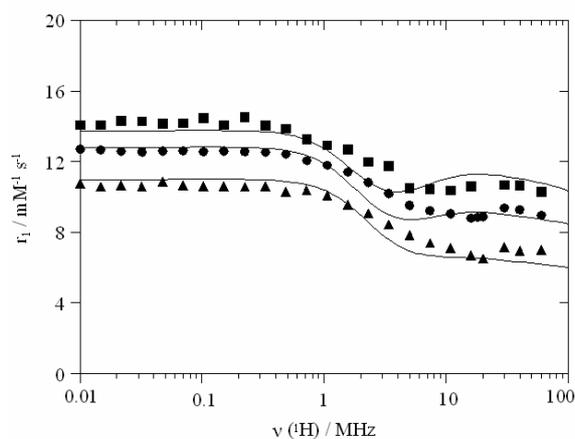


Abbildung 53: Relaxivitätsmessungen von $[\text{Gd-DOTA}]_4\text{-Apg}_3\text{-Sar}_5\text{-TATE}$; ■ = 25°C , ● = 37°C , ▲ = 49°C .

Tabelle 35 zeigt einige ausgewählte NMRD-Werte für [Gd-DOTA] im Vergleich zu [Gd-DOTA]₄-Apg₃-Sar₅-TATE.

Tabelle 35: ¹H-NMRD-Werte von [Gd-DOTA(H₂O)]⁻ und [Gd-DOTA]₄-Apg₃-Sar₅-TATE.

	[Gd-DOTA] ₄ -R	[Gd-DOTA(H ₂ O)] ⁻	
$K_{ex}^{298} / 10^6 \text{ s}^{-1}$	1.2	4.1	Water exchange rate
$\Delta H^\ddagger / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	30.0	49.8	Activation enthalpy
$\tau_{rH}^{298} / \text{ps}$	490	77	Rotational correlation time
$E_{RH} / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	31.8	16.1	Activation energy
τ_v^{298} / ps	36.4	11	Correlation time for zero field splitting modulation
$E_v / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	1	1	Activation energy
$\Delta^2 / 10^{20} \text{ s}^{-2}$	0.10	0.16	Zero field splitting energy
$D_{GdH}^{298} / 10^{-10} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1}$	26.0	22.0	Diffusion constant
$E_{DGdH} / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	31.1	20.2	Activation energy for diffusion

Entscheidend sind die Werte der Relaxivitäten, wo [Gd-DOTA]₄-Apg₃-Sar₅-TATE ($r_1=8.9 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1} / 20 \text{ MHz} / 37^\circ\text{C}$) im Vergleich zu [Gd-DOTA-H₂O]⁻ eine Verbesserung um den Faktor 2.3 pro Gd^{III} aufweist. Diese Verbesserung kommt hauptsächlich durch die stark verlangsamten Rotationskorrelationszeiten von 77 ps auf 490 ps zustande.

4.5.5 Relaxivitätsmessungen am klinischen MRI Gerät

Prof. Klaus Scheffler (MRI-Physik/ Universität Basel) bestimmte die Relaxivitäten der Substanzen [Gd-DOTA]-TATE und [Gd-DOTA]₄-Apg₃-Sar₅-TATE auf einem klinischen MRI-Gerät (1.5 T).

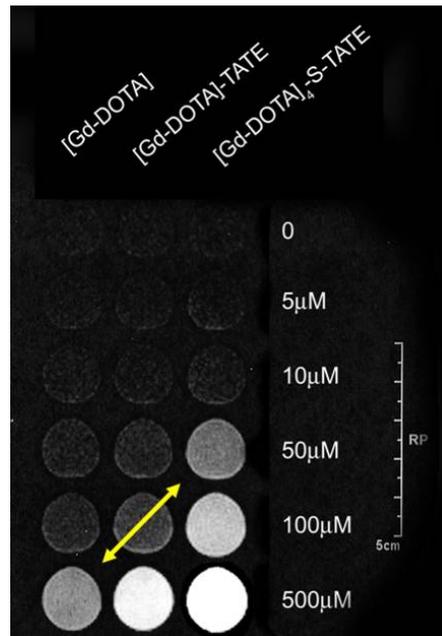


Abbildung 54: MR-Imaging von [Gd-DOTA(H₂O)]⁺, [Gd-DOTA]-TATE und [Gd-DOTA]₄-Apg₃-Sar₅-TATE in unterschiedlichen Konzentrationen.

In einer 24-well-Platte wurden unterschiedliche Konzentrationen der MRI-Kontrastmittel [Gd-DOTA(H₂O)]⁺ (DOTAREM[®]), [Gd-DOTA]-TATE und [Gd-DOTA]₄-Apg₃-Sar₅-TATE vorgelegt und gemessen. Abbildung 54 zeigt die MRI-Signale dieser Substanzen. Allgemein nimmt das Signal bei steigender Konzentration zu. Weiter lässt sich qualitativ abschätzen, dass man für eine 50 μM Lösung an [Gd-DOTA]₄-Apg₃-Sar₅-TATE dasselbe Signal erhält wie für eine 10-fach höher konzentrierte Lösung der Referenzsubstanz [Gd-DOTA(H₂O)]⁺ (500 μM).

Allerdings sind wir noch mindestens um den Faktor 2 von der postulierten Konzentration von 25 μM (Kapitel 4.5.3) entfernt, die es zur Tumordarstellung braucht.

Aus den gemessenen MRI-Signalen wurden die Relaxivitäten der einzelnen Substanzen berechnet und in Tabelle 36 dargestellt. Die Werte korrelieren sehr gut mit den ¹H-NMRD-Werten, die von Eva Toth bestimmt worden sind.

Tabelle 36: Relaxivitätswerte, berechnet aus den MR-Signalen eines klinischen MR Geräts.

	Relaxivität R_1 [$\text{mM}^{-1}/\text{s}^{-1}$] (25°C; 63.5 MHz)
$[\text{Gd-DOTA}(\text{H}_2\text{O})]^-$ (DOTAREM [®])	4.0
$[\text{Gd-DOTA}]\text{-TATE}$	8.0
$[\text{Gd-DOTA}]_4\text{-Apg}_3\text{-Sar}_5\text{-TATE}$	40.0

Die Referenzsubstanz $[\text{Gd-DOTA}(\text{H}_2\text{O})]^-$ entspricht mit einer Relaxivität von $4.0 \text{ mM}^{-1}/\text{s}^{-1}$ den bekannten Werten aus der Literatur. Durch die Kopplung von $[\text{Gd-DOTA}]$ an ein Peptid wird die Relaxivität um den Faktor 2 verbessert ($[\text{Gd-DOTA}]\text{-TATE}$; $8.0 \text{ mM}^{-1}/\text{s}^{-1}$); dies kommt hauptsächlich durch die verlangsamte Rotation des gesamten Moleküls zustande. Durch die weitere Modifikation mittels Kopplung von vier $[\text{Gd-DOTA}]$ -Einheiten erhöht sich die Relaxivität weiter um den Faktor 10 im Vergleich zur Referenz $[\text{Gd-DOTA}(\text{H}_2\text{O})]^-$.

5. Zusammenfassung / Ausblick

Zusammenfassung:

In dieser Arbeit wurde das Somatostatin-Analogon Tyr³-Thr⁸-Octreotide (TATE) synthetisiert, modifiziert und mit biologischen Experimenten auf seine pharmakologischen Eigenschaften untersucht. Die Synthese des Peptids erfolgte an der Festphase mittels einer Standard-Fmoc-Strategie in relativ guten Ausbeuten und Reinheiten.

Die verschiedenen Modifikationen können in drei verschiedene Gruppen unterteilt werden:

a.) Verwendung von verschiedenen Chelatoren, **b.)** Verwendung von Linker-Molekülen als Spacer zwischen Peptid und Chelator und **c.)** Kopplung von mehreren Chelatoren.

a.) Für klinische (diagnostische) Zwecke wird das registrierte Radiopharmakon DTPA-Octreotide (Octreoscan[®]) verwendet. Dieses SRIF-Analogon zeigt eine hohe Sensitivität in der Darstellung von neuroendokrinen Primärtumoren, metastasierenden endokrinen Pankreastumoren und Karzinoiden (81,82). Der Chelator DTPA eignet sich hervorragend zur Komplexierung von ¹¹¹In, ist aber nicht geeignet zur Komplexierung von therapeutischen Radioisotopen wie ⁹⁰Y und ¹⁷⁷Lu. Als möglicher geeigneter Chelator wird darum das makrozyklische DOTA verwendet.

Alternativ zum diagnostischen Radioisotop ¹¹¹In wird in der Nuklearmedizin häufig ^{99m}Tc verwendet. Dessen radiochemischen und physikalischen Eigenschaften sowie seine Verfügbarkeit und der Preis sind erheblich besser für das Generator-produzierte ^{99m}Tc. Als einzähniger Chelator zur Komplexierung von ^{99m}Tc wird HYNIC verwendet und an die Somatostatinanaloga gekoppelt. Eine Reihe von HYNIC-Derivaten, nämlich HYNIC-OC, HYNIC-TOC und HYNIC-TATE wurden miteinander und gegen alternative DOTA-Analoga in ihren pharmakologischen Eigenschaften verglichen. [^{99m}Tc/EDDA/Tricine/HYNIC]-TATE zeigte dabei die gleichen biologischen Eigenschaften wie das entsprechende DOTA-Derivat, aber mit den Vorzügen des Radioisotopes ^{99m}Tc. Inzwischen wurden auch schon erste

Patientenstudien in verschiedenen Zentren durchgeführt (T. Schumacher, Freiburg, und L. Kabasakal, Türkei). Abbildung 32 zeigt einen Vergleich zweier ^{99m}Tc -markierter Analoga ($[\text{}^{99m}\text{Tc}/\text{EDDA}/\text{Tricine}/\text{HYNIC}]\text{-TOC}$ und $[\text{}^{99m}\text{Tc}/\text{EDDA}/\text{Tricine}/\text{HYNIC}]\text{-TATE}$), der eindrücklich belegt, dass bei gleichem Tumortake die Aufnahme in die Leber signifikant reduziert werden konnte. Unter der Annahme, dass neuroendokrine Tumoren hauptsächlich in die Leber metastasieren, bietet das Radiopeptid $[\text{}^{99m}\text{Tc}/\text{EDDA}/\text{Tricine}/\text{HYNIC}]\text{-TATE}$ zudem eine interessante diagnostische Option. Interessanterweise zeigten Forrer et al. (131) in ihrer vergleichenden Studie mit $[\text{}^{111}\text{In}/\text{}^{90}\text{Y}\text{-DOTA}]\text{-TOC}$ vs. $[\text{}^{111}\text{In}/\text{}^{90}\text{Y}\text{-DOTA}]\text{-TATE}$, dass die Pharmakokinetik der beiden Substanzen vergleichbar ist, $[\text{}^{111}\text{In}\text{-DOTA}]\text{-TATE}$ aber keine Vorteile in der Darstellung von neuroendokrinen Tumoren zeigt.

b.) In einem zweiten Teilprojekt ging es um die Verbesserung der biologischen Eigenschaften, namentlich der Verbesserung des Tumor-zu-Nieren-Verhältnisses. Wester et al. (79,80) zeigten mit ihren modifizierten Derivaten *in vivo*, dass Zuckermodifikationen die Substanzen hydrophiler machten und somit den Leberuptake reduzieren. In meiner Arbeit wurden verschiedene Aminosäuren (Asp, Thr) und Zuckeraminosäuren-Derivate als Linker zwischen Peptid und Chelator eingefügt. Anschliessende biologische und pharmakologische Versuche ergaben verbesserte Internalisierungsraten für die Derivate DOTA-Asp-TATE, DOTA-Thr-TATE und DOTA-Lys(Glucuronsäure)-TATE, für letzteres sogar eine der besten Bindungsaffinitäten zum sst2. Allerdings ergaben sich in der Bioverteilung keine signifikanten Verbesserungen des Tumor-zu-Nieren-Verhältnisses.

c.) Im dritten Projektteil ging es um die Erhöhung der spezifischen Aktivität. Durch die Kopplung mehrerer Chelatoren an dasselbe Peptid kann bei gleicher Menge Radioaktivität die Peptidmenge reduziert werden. Dies ist ein wichtiger Aspekt bei pharmakologisch aktiven Peptiden wie VIP, Bombesin und Substanz P. Weiter ist in der therapeutischen Applikation mit $[\text{}^{90}\text{Y}/\text{}^{111}\text{In}\text{-DOTA}]\text{-TOC}$ (53,89) eine Grenze erreicht worden, wo der Überschuss an

nicht-markierter Substanz möglicherweise eine partielle Sättigung der Tumorrezeptoren hervorruft und damit die Anreicherung negativ beeinflusst.

Als Linker für die Kopplung der Chelatoren an das Peptid wurden L-Lysin und das achirale Aminopropylglycin (Apg) verwendet. Weiter wurde ein Spacer (Sar₅) eingeführt, um den Chelator vom Peptidteil zu separieren. Dieser Spacer zeigte sich in Kombination mit dem Apg Linker als sehr wirksam, da trotz grösserer Modifikationen die biologischen und pharmakologischen Funktionen nicht beeinträchtigt wurden.

In einem weiteren Schritt wurde die Anzahl Chelatoren erhöht; dabei wurden verschiedene Strukturen untersucht (Abbildung 50). Grundsätzlich zeigte sich, dass die baumartigen (dendritischen) Poly-DOTA-Derivate eine höhere Affinität zum Rezeptor und eine höhere Internalisierungsgeschwindigkeit als die kammartig linearen Derivate aufweisen. Im Vergleich zur Referenzsubstanz [In-DOTA]-TATE zeigte [In-DOTA]₄-Apg₃-Sar₅-TATE eine vergleichbare Affinität zu sst2 und keinen signifikanten Unterschied bei der Internalisierungsgeschwindigkeit.

Diese Poly-DOTA-Derivate, im besonderen [In-DOTA]₄-Apg₃-Sar₅-TATE, finden möglicherweise einen neuen „Anwendungsbereich“: den target-spezifischen MRI-Kontrastmitteln. Anstelle von Radiometallen wurde das paramagnetische Gd^{III} verwendet; biologische und pharmakologische Untersuchungen ergaben keine signifikanten Unterschiede zu bisherigen Resultaten mit In^{III} und Y^{III}. Damit hat man nun ein potentielles MRI-Kontrastmittel, das die Möglichkeit besitzt, mit hoher Affinität an Somatostatinrezeptoren zu binden und auch zu internalisieren. Erste Vorversuche in Lösung mit einem klinischen MRI-Scanner zeigten eine Signalverstärkung um den Faktor 10 im Vergleich zu herkömmlichen Kontrastmitteln wie [Gd-DOTA(H₂O)]⁻ (DOTAREM[®]). Allerdings haben Schätzungen ergeben, dass man mindestens eine Konzentration von 25 µM am Target erreichen muss, um ein gutes MRI-Signal zu erhalten (130). Davon ist die beste Substanz im Moment [Gd-DOTA]₄-Apg₃-Sar₅-TATE aber noch mindestens um den Faktor 2 entfernt.

Ausblick:

Das Somatostatinanalogon Tyr³-Thr⁸-Octreotide (TATE) eignet sich hervorragend als Modellpeptid. Ausgehend von dem bekannten Derivat DOTA-TATE wurden verschiedene Modifikationen synthetisiert. Die Einführung von Linker-Molekülen und Zuckeraminosäuren brachten noch nicht den erwünschten Effekt einer Verbesserung des Tumor-zu-Nieren-Verhältnisses. Diese Modifikationen müssen deshalb weiter studiert werden und der Einfluss von verschiedenen Linkern untersucht und verglichen werden. Das Hauptaugenmerk sollte dabei auf die Bioverteilung gelegt werden, da Bindungsaffinitäten und Internalisierungsraten nur ungenügend die Potenz solcher Substanzen aufzeigen können. Auch sollte der Uptake-Mechanismus der Somatostatinanaloga in die Nieren genauer untersucht werden. Man geht davon aus, dass die beiden Rezeptoren Megalin und Cubilin in den tubulären Zellen der Niere dabei eine entscheidende Rolle spielen (132). Eine solche Kenntnis würde helfen, den Tumorumtake zu reduzieren, und dadurch die Effizienz der Therapie deutlich erhöhen.

Bei der Entwicklung von Poly-DOTA-Derivaten wäre der nächste Schritt die Synthese an bioaktiven Peptiden wie z.B. Bombesin, Substanz P oder VIP. Bei diesen Peptiden ist eine „Signal- und Dosis-Erhöpfung“ noch bedeutend wichtiger als bei Somatostatinanalogen. Weiter wäre zu prüfen, wie viele Chelatoren an ein Peptid gekoppelt werden können, ohne die biologische und pharmakologische Aktivität zu vermindern. Mier et al. (133) haben mit linearen Polylysinen 3, 6 und 9 DOTA-Chelatoren koppeln können. Über deren Bindungsaffinitäten und Internalisierungswerte ist allerdings noch nichts Genaueres bekannt. Vergleiche mit dem kammartig aufgebauten Derivat [In-DOTA]_{4-Lin}Lys₃-Sar₅-TATE zeigen allerdings signifikant niedrigere Werte in der Affinität zum Rezeptor (sst2) und in der Internalisierungsgeschwindigkeit.

Ein weiteres interessantes Gebiet sind die target-spezifischen MRI-Kontrastmittel; nachdem die Relaxivitäten am klinischen MRI-Scanner vielversprechend aussehen, müssen nun in geeigneten *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten die weiteren Möglichkeiten dieser

Kontrastmittel evaluiert werden. Eine Kopplung der Substanz [Gd-DOTA]₄-Apg₃-Sar₅-TATE an die Rezeptoren würde eine weiter verlangsamte Rotation und damit eine Erhöhung des Signals zur Folge haben, gleichzeitig müsste allerdings die Zahl der Chelatoren weiter erhöht werden, damit man eine bessere Relaxivität erreicht wird und man an ein „Tumor Targeting“ *in vivo* denken kann. Aime et al. (134,135) stellten schon einige Derivate mit multiplen Chelatoren vor. Diese Substanzen internalisieren auch in die entsprechenden Zellen, aber das MRI-Signal ist nicht der Konzentration in der Zelle entsprechend angestiegen, was mit einem langsameren Wasseraustausch in der Zelle zu tun hatte.

6. Literatur

1. Anderson C J, Welch M J. Radiometal-labeled agents (non-technetium) for diagnostic imaging. *Chem Rev* 1999;99(9):2219-34.
2. Volkert W A, Hoffman T J. Therapeutic radiopharmaceuticals. *Chem Rev* 1999;99(9):2269-92.
3. Abrams M J, Murrer B A. Metal compounds in therapy and diagnosis. *Science* 1993;261(5122):725-30.
4. Magill J, Galy J. Radioactivity, Radionuclides, Radiation. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag; 2005.
5. Staros J V, Wright R W, Swingle D M. Enhancement by N-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. *Anal Biochem* 1986;156(1):220-2.
6. Carpino L A. 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An Efficient Peptide Coupling Additive. *J Am Chem Soc* 1993;115:4397-4398.
7. Pearson R G. Hard and Soft Acids and Bases. *J Am Chem Soc* 1963;85(22):3533-3539.
8. Pearson R G. The HSAB Principle-more quantitative aspects. *Inorg Chim Acta* 1995;240:93-98.
9. Maecke H R, Riesen A, Ritter W. The molecular structure of indium-DTPA. *J Nucl Med* 1989;30(7):1235-9.
10. Bakker W H, Krenning E P, Breeman W A et al. Receptor scintigraphy with a radioiodinated somatostatin analogue: radiolabeling, purification, biologic activity, and in vivo application in animals. *J Nucl Med* 1990;31(9):1501-9.
11. Bakker W H, Krenning E P, Reubi J C et al. In vivo application of [^{111}In -DTPA-D-Phe¹]-octreotide for detection of somatostatin receptor-positive tumors in rats. *Life Sci* 1991;49(22):1593-601.
12. Hnatowich D J, Chinol M, Siebecker D A et al. Patient biodistribution of intraperitoneally administered yttrium-90-labeled antibody. *J Nucl Med* 1988;29(8):1428-35.
13. Quadri S M, Shao Y, Blum J E, Leichner P K, Williams J R, Vriesendorp H M. Preclinical evaluation of intravenously administered ^{111}In - and ^{90}Y -labeled B72.3 immunoconjugate (GYK-DTPA) in beagle dogs. *Nucl Med Biol* 1993;20(5):559-70.

14. Camera L, Kinuya S, Garmestani K et al. Evaluation of the serum stability and in vivo biodistribution of CHX-DTPA and other ligands for yttrium labeling of monoclonal antibodies. *J Nucl Med* 1994;35(5):882-9.
15. Ruser G, Ritter W, Maecke H R. Synthesis and evaluation of two new bifunctional carboxymethylated tetraazamacrocyclic chelating agents for protein labeling with indium-111. *Bioconjugate Chem* 1990;1(5):345-9.
16. Lewis M R, Raubitschek A, Shively J E. A facile, water-soluble method for modification of proteins with DOTA. Use of elevated temperature and optimized pH to achieve high specific activity and high chelate stability in radiolabeled immunoconjugates. *Bioconjugate Chem* 1994;5(6):565-76.
17. McMurry T J, Brechbiel M, Kumar K, Gansow O A. Convenient synthesis of bifunctional tetraaza macrocycles. *Bioconjugate Chem* 1992;3(2):108-17.
18. McMurry T J, Brechbiel M, Wu C, Gansow O A. Synthesis of 2-(p-thiocyanatobenzyl)-1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid: application of the 4-methoxy-2,3,6-trimethylbenzenesulfonamide protecting group in the synthesis of macrocyclic polyamines. *Bioconjugate Chem* 1993;4(3):236-45.
19. Sherry A D, Brown R D, Gerald C F G C, Koenig S H, Kuan K-T, Spiller M. Synthesis and Characterisation of the Gadolinium³⁺ Complex of DOTA-Propylamide: A Model DOTA-Protein Conjugate. *J Inorg Chem* 1989;28:620-622.
20. Kodama M, Koike T, Mahatma A B, Kimura E. Thermodynamik and Kinetic Studies of Lanthanide Complexes of 1,4,7,10,13-Pentaazacyclopentadecane-N,N',N'',N''',N''''-pentaacetic Acid and 1,4,7,10,13, 16-Hexaazacyclooctadecane-N,N',N'',N''',N''''-hexaacetic Acid. *Inorg Chem* 1991;30:1270-1273.
21. Desreux J F. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Lanthanide Complexes with Tetraacetic Tetraaza Macrocycle. Unusual Conformation Properties. *Inorg Chem* 1980;19:1319-1324.
22. Burai L, Fabian I, Kiraly R, Szilagy E, Brücher E J. Equilibrium and kinetic studies on the formation of the lanthanide(III) complexes, [Ce(dota)]⁻ and [Yb(dota)]⁻ (H₄dota = 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid). *J Chem Soc Dalton Trans* 1998;2:243-248.
23. Thöm V J, Hosken G D, Hancock R D. Anomalous Metal Ion Size Selectivity of Tetraaza Macrocycles. *J Inorg Chem* 1985;24:3378-3381.
24. Moi M K, Meares C F. The Peptide Way to Macrocyclic Bifunctional Chelating Agents: Synthesis of 2-(p-Nitrobenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-

- N,N',N'',N'''-tetraacetic Acid and Study of Its Yttrium (III) Complex. *J Am Chem Soc* 1988;110:6266-6267.
25. Kolan H, Li J, Thakur M L. Sandostatin labeled with ^{99m}Tc : in vitro stability, in vivo validity and comparison with ^{111}In -DTPA-octreotide. *Pept Res* 1996;9(3):144-50.
 26. Zamora P O, Gulhke S, Bender H et al. Experimental radiotherapy of receptor-positive human prostate adenocarcinoma with ^{188}Re -RC-160, a directly-radiolabeled somatostatin analogue. *Int J Cancer* 1996;65(2):214-20.
 27. Liu S, Edwards D S, Looby R J et al. Labeling cyclic glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonists with ^{99m}Tc by the preformed chelate approach: effects of chelators on properties of [^{99m}Tc]chelator-peptide conjugates. *Bioconjugate Chem* 1996;7(2):196-202.
 28. Guggenberg E V, Mikolajczak R, Janota B, Riccabona G, Decristoforo C. Radiopharmaceutical development of a freeze-dried kit formulation for the preparation of [^{99m}Tc -EDDA-HYNIC-D-Phe¹, Tyr³]-octreotide, a somatostatin analog for tumor diagnosis. *J Pharm Sci* 2004;93(10):2497-506.
 29. Maina T, Stolz B, Albert R, Bruns C, Koch P, Macke H. Synthesis, radiochemistry and biological evaluation of a new somatostatin analogue (SDZ 219-387) labelled with technetium-99m. *Eur J Nucl Med* 1994;21(5):437-44.
 30. Maina T, Nock B, Nikolopoulou A et al. [^{99m}Tc]Demotate, a new ^{99m}Tc -based [Tyr³]octreotate analogue for the detection of somatostatin receptor-positive tumours: synthesis and preclinical results. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2002;29(6):742-53.
 31. Thakur M L, Kolan H, Li J et al. Radiolabeled somatostatin analogs in prostate cancer. *Nucl Med Biol* 1997;24(1):105-13.
 32. Liu S, Edwards D S, Barrett J A. ^{99m}Tc labeling of highly potent small peptides. *Bioconjugate Chem* 1997;8(5):621-36.
 33. Abrams M J, Juweid M, tenKate C I et al. Technetium-99m-human polyclonal IgG radiolabeled via the hydrazino nicotinamide derivative for imaging focal sites of infection in rats. *J Nucl Med* 1990;31(12):2022-8.
 34. Bangard M, Béhé M, Guhlke S et al. Detection of somatostatin receptor-positive tumours using the new ^{99m}Tc -tricine-HYNIC-D-Phe¹-Tyr³-octreotide: first results in patients and comparison with ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide. *Eur J Nucl Med* 2000;27(6):628-37.
 35. Béhé M, Maecke H R. New somatostatin analogues labelled with technetium-99m. *Eur J Nucl Med* 1995;22(8):791.

36. Béhé M, Heppeler A, Maecke H R. New somatostatin analogs for SPECT and PET. *Eur J Nucl Med* 1996;23(9):1144.
37. Decristoforo C, Mather S J. Preparation, ^{99m}Tc -labeling, and in vitro characterization of HYNIC and N_3S modified RC-160 and $[\text{Tyr}^3]\text{octreotide}$. *Bioconjugate Chem* 1999;10(4):701-2.
38. Decristoforo C, Mather S J, Cholewinski W, Donnemiller E, Riccabona G, Moncayo R. ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-TOC: a new ^{99m}Tc -labelled radiopharmaceutical for imaging somatostatin receptor-positive tumours; first clinical results and intra-patient comparison with ^{111}In -labelled octreotide derivatives. *Eur J Nucl Med* 2000;27(9):1318-25.
39. Decristoforo C, Melendez-Alafort L, Sosabowski J K, Mather S J. ^{99m}Tc -HYNIC- $[\text{Tyr}^3]\text{octreotide}$ for imaging somatostatin-receptor-positive tumors: preclinical evaluation and comparison with ^{111}In -octreotide. *J Nucl Med* 2000;41(6):1114-9.
40. Babich J W, Fischman A J. Effect of "co-ligand" on the biodistribution of ^{99m}Tc -labeled hydrazino nicotinic acid derivatized chemotactic peptides. *Nucl Med Biol* 1995;22(1):25-30.
41. Alberto R, Ortner K, Wheatley N, Schibli R, Schubiger A P. Synthesis and properties of boranocarbonate: a convenient in situ CO source for the aqueous preparation of $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$. *J Am Chem Soc* 2001;123(13):3135-6.
42. Alberto R, Schibli R, Egli A, Schubiger P A, Abram U, Kaden T A. A Novel Organometallic Aqua Complex of Technetium for the Labeling of Biomolecules: Synthesis of $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ from $[\text{}^{99m}\text{TcO}_4]^-$ in Aqueous Solution and Its Reaction with a Bifunctional Ligand. *J Am Chem Soc* 1998;120:7987-7988.
43. Krenning E P, Bakker W H, Breeman W A et al. Localisation of endocrine-related tumours with radioiodinated analogue of somatostatin. *Lancet* 1989;1(8632):242-4.
44. Krenning E P, Kwekkeboom D J, Bakker W H et al. Somatostatin receptor scintigraphy with $[\text{}^{111}\text{In}\text{-DTPA-D-Phe}^1]\text{-}$ and $[\text{}^{123}\text{I-Tyr}^3]\text{-octreotide}$: the Rotterdam experience with more than 1000 patients. *Eur J Nucl Med* 1993;20(8):716-31.
45. Virgolini I, Raderer M, Kurtaran A et al. Vasoactive intestinal peptide-receptor imaging for the localization of intestinal adenocarcinomas and endocrine tumors. *N Engl J Med* 1994;331(17):1116-21.
46. Barret A J, Damphousse D J, Heminway S et al. Biological Evaluation of ^{99m}Tc -Labeled Cyclic Glycoprotein IIb/IIIa Receptor Antagonists in the Canine Arteriovenous Shunt and Deep Vein Thrombosis Models: Effects of Chelators on

- Biological Properties of [^{99m}Tc]Chelator-Peptide Conjugates. *Bioconjugate Chem* 1996;7:203-208.
47. Babich J W, Solomon H, Pike M C et al. Technetium-99m-labeled hydrazino nicotinamide derivatized chemotactic peptide analogs for imaging focal sites of bacterial infection. *J Nucl Med* 1993;34(11):1964-74.
 48. Fischman A J, Babich J W, Strauss H W. A ticket to ride: peptide radiopharmaceuticals. *J Nucl Med* 1993;34(12):2253-63.
 49. Fischman A J, Babich J W, Rubin R H. Infection imaging with technetium-99m-labeled chemotactic peptide analogs. *Semin Nucl Med* 1994;24(2):154-68.
 50. Reubi J C. Neuropeptide receptors in health and disease: the molecular basis for in vivo imaging. *J Nucl Med* 1995;36(10):1825-35.
 51. Palacios J M, Cortes R, Dietl M, Probst A. Receptors in human brain diseases: a use for receptor autoradiography in neuropathology. *J Recept Res* 1988;8(1-4):509-20.
 52. Palacios J M, Mengod G, Sarasa M, Vilaro M T, Pompeiano M, Martinez-Mir M I. The use of in situ hybridization histochemistry for the analysis of neurotransmitter receptor expression at the microscopic level. *J Recept Res* 1991;11(1-4):459-72.
 53. Waldherr C, Pless M, Maecke H R, Haldemann A, Mueller-Brand J. The clinical value of [⁹⁰Y-DOTA]-D-Phe¹-Tyr³-octreotide (⁹⁰Y-DOTATOC) in the treatment of neuroendocrine tumours: a clinical phase II study. *Ann Oncol* 2001;12(7):941-5.
 54. Marks N, Stern F. Inactivation of somatostatin (GH-RIH) and its analogs by crude and partially purified rat brain extracts. *FEBS Lett* 1975;55(1):220-4.
 55. Pless J, Bauer W, Briner U et al. Chemistry and pharmacology of SMS 201-995, a long-acting octapeptide analogue of somatostatin. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1986;119:54-64.
 56. Yamada Y, Post S R, Wang K, Tager H S, Bell G I, Seino S. Cloning and functional characterization of a family of human and mouse somatostatin receptors expressed in brain, gastrointestinal tract, and kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(1):251-5.
 57. Epelbaum J. Somatostatin in the central nervous system: physiology and pathological modifications. *Prog Neurobiol* 1986;27(1):63-100.
 58. Reubi J C, Landolt A M. High density of somatostatin receptors in pituitary tumors from acromegalic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1984;59(6):1148-51.
 59. Reubi J C, Krenning E, Lamberts S W, Kvols L. In vitro detection of somatostatin receptors in human tumors. *Metabolism* 1992;41(9 Suppl 2):104-10.

60. Vekemans M C, Urbain J L, Charkes D. Advances in radio-imaging of neuroendocrine tumors. *Curr Opin Oncol* 1995;7(1):63-7.
61. Schwartz A L, Fridovich S E, Lodish H F. Kinetics of internalization and recycling of the asialoglycoprotein receptor in a hepatoma cell line. *J Biol Chem* 1982;257(8):4230-7.
62. Duncan J R, Stephenson M T, Wu H P, Anderson C J. Indium-111-diethylenetriaminepentaacetic acid-octreotide is delivered in vivo to pancreatic, tumor cell, renal, and hepatocyte lysosomes. *Cancer Res* 1997;57(4):659-71.
63. de Jong M, Bakker W H, Krenning E P et al. Yttrium-90 and indium-111 labelling, receptor binding and biodistribution of [DOTA⁰,d-Phe¹,Tyr³]octreotide, a promising somatostatin analogue for radionuclide therapy. *Eur J Nucl Med* 1997;24(4):368-71.
64. De Jong M, Bernard B F, De Bruin E et al. Internalization of radiolabelled [DTPA⁰]octreotide and [DOTA⁰,Tyr³]octreotide: peptides for somatostatin receptor-targeted scintigraphy and radionuclide therapy. *Nucl Med Commun* 1998;19(3):283-8.
65. Jurisson S, Berning D, Jia W, Ma D. Coordination Compounds in Nuclear Medicine. *Chem Rev* 1993;93:1137-1158.
66. Vallabhajosula S, Moyer B R, Lister-James J et al. Preclinical evaluation of technetium-99m-labeled somatostatin receptor-binding peptides. *J Nucl Med* 1996;37(6):1016-22.
67. Virgolini I, Leimer M, Handmaker H et al. Somatostatin receptor subtype specificity and in vivo binding of a novel tumor tracer, ^{99m}Tc-P829. *Cancer Res* 1998;58(9):1850-9.
68. Lebtahi R, Le Cloirec J, Houzard C et al. Detection of neuroendocrine tumors: ^{99m}Tc-P829 scintigraphy compared with ¹¹¹In-pentetreotide scintigraphy. *J Nucl Med* 2002;43(7):889-95.
69. Decristoforo C, Mather S J. 99m-Technetium-labelled peptide-HYNIC conjugates: effects of lipophilicity and stability on biodistribution. *Nucl Med Biol* 1999;26(4):389-96.
70. Decristoforo C, Mather S J. Technetium-99m somatostatin analogues: effect of labelling methods and peptide sequence. *Eur J Nucl Med* 1999;26(8):869-76.
71. Gabriel M, Decristoforo C, Donnemiller E et al. An inpatient comparison of ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-TOC with ¹¹¹In-DTPA-octreotide for diagnosis of somatostatin receptor-expressing tumors. *J Nucl Med* 2003;44(5):708-16.
72. Magrath I T. Targeted approaches to cancer therapy. *Int J Cancer* 1994;56(2):163-6.

73. Schally A V, Nagy A. Cancer chemotherapy based on targeting of cytotoxic peptide conjugates to their receptors on tumors. *Eur J Endocrinol* 1999;141(1):1-14.
74. Radulovic S, Nagy A, Szoke B, Schally A V. Cytotoxic analog of somatostatin containing methotrexate inhibits growth of MIA PaCa-2 human pancreatic cancer xenografts in nude mice. *Cancer Lett* 1992;62(3):263-71.
75. Nagy A, Schally A V, Halmos G et al. Synthesis and biological evaluation of cytotoxic analogs of somatostatin containing doxorubicin or its intensely potent derivative, 2-pyrrolinodoxorubicin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(4):1794-9.
76. Jamieson E R, Lippard S J. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chem Rev* 1999;99(9):2467-98.
77. Wong E, Giandomenico C M. Current status of platinum-based antitumor drugs. *Chem Rev* 1999;99(9):2451-66.
78. Gruner S A, Locardi E, Lohof E, Kessler H. Carbohydrate-based mimetics in drug design: sugar amino acids and carbohydrate scaffolds. *Chem Rev* 2002;102(2):491-514.
79. Schottelius M, Wester H J, Reubi J C, Senekowitsch-Schmidtke R, Schwaiger M. Improvement of pharmacokinetics of radioiodinated Tyr³-octreotide by conjugation with carbohydrates. *Bioconjugate Chem* 2002;13(5):1021-30.
80. Wester H J, Schottelius M, Scheidhauer K, Reubi J C, Wolf I, Schwaiger M. Comparison of radioiodinated TOC, TOCA and Mtr-TOCA: the effect of carbonylation on the pharmacokinetics. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2002;29(1):28-38.
81. Gibril F, Reynolds J C, Doppman J L et al. Somatostatin receptor scintigraphy: its sensitivity compared with that of other imaging methods in detecting primary and metastatic gastrinomas. A prospective study. *Ann Intern Med* 1996;125(1):26-34.
82. Ricke J, Klose K J, Mignon M, Oberg K, Wiedenmann B. Standardisation of imaging in neuroendocrine tumours: results of a European delphi process. *Eur J Radiol* 2001;37(1):8-17.
83. Krenning E P, Valkema R, Kooij P P et al. Scintigraphy and radionuclide therapy with [indium-111-labelled-diethylenetriaminepentaacetic acid-D-Phe¹]-octreotide. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1999;31 Suppl 2:S219-23.
84. De Jong M, Breeman W A, Bernard H F et al. Therapy of neuroendocrine tumors with radiolabeled somatostatin- analogues. *Q J Nucl Med* 1999;43(4):356-66.

85. Krenning E P, Kooij P P, Bakker W H et al. Radiotherapy with a radiolabeled somatostatin analogue, [¹¹¹In-DTPA-D-Phe¹]-octreotide. A case history. *Ann N Y Acad Sci* 1994;733:496-506.
86. McCarthy K E, Woltering E A, Anthony L B. In situ radiotherapy with ¹¹¹In-pentetreotide. State of the art and perspectives. *Q J Nucl Med* 2000;44(1):88-95.
87. Zalutsky M R. Radionuclide Therapy. In: Rösch F, editor. Handbook of Nuclear Chemistry, Radiochemistry and Radiopharmaceutical chemistry in Life Science. Volume Vol. 4; 2003.
88. Stolz B, Weckbecker G, Smith-Jones P M, Albert R, Raulf F, Bruns C. The somatostatin receptor-targeted radiotherapeutic [⁹⁰Y-DOTA-DPhe¹, Tyr³]octreotide (⁹⁰Y-SMT 487) eradicates experimental rat pancreatic CA 20948 tumours. *Eur J Nucl Med* 1998;25(7):668-74.
89. Waldherr C, Pless M, Maecke H R et al. Tumor response and clinical benefit in neuroendocrine tumors after 7.4 GBq ⁹⁰Y-DOTATOC. *J Nucl Med* 2002;43(5):610-6.
90. Paganelli G, Zoboli S, Cremonesi M et al. Receptor-mediated radiotherapy with ⁹⁰Y-DOTA-D-Phe¹-Tyr³-octreotide. *Eur J Nucl Med* 2001;28(4):426-34.
91. Waldherr C, Schumacher T, Pless M et al. Radiopeptide transmitted internal irradiation of non-iodophil thyroid cancer and conventionally untreatable medullary thyroid cancer using. *Nucl Med Commun* 2001;22(6):673-8.
92. Waldherr C, Maecke H R, Schumacher T et al. How does Tumor Response Depend On the Number of Treatment Sessions at Constant Injected Dose Using ⁹⁰Y-DOTATOC in Neuroendocrine Tumors? *J Nucl Med* 2002;43(5):315P.
93. Schumacher T, Eichhorn K, Hofer S et al. Diffusible Brachytherapy (DBT) with radiolabelled substance P in high grade gliomas: first observations. *Eur J Nucl Med* 2001;28(8):1040.
94. Schaffalitzky De Muckadell O B, Aggestrup S, Stentoft P. Flushing and plasma substance P concentration during infusion of synthetic substance P in normal man. *Scand J Gastroenterol* 1986;21(4):498-502.
95. van Hagen P M, Breeman W A, Reubi J C et al. Visualization of the thymus by substance P receptor scintigraphy in man. *Eur J Nucl Med* 1996;23(11):1508-13.
96. Jansen J B, Jebbink M C, Douglas B R, Lamers C B. Effect of loxiglumide (CR-1505) on bombesin- and meal-stimulated plasma cholecystokinin in man. *Eur J Clin Pharmacol* 1990;38(4):367-70.

-
97. Van de Wiele C, Dumont F, Dierckx R A et al. Biodistribution and dosimetry of ^{99m}Tc -RP527, a gastrin-releasing peptide (GRP) agonist for the visualization of GRP receptor-expressing malignancies. *J Nucl Med* 2001;42(11):1722-7.
 98. Scarpignato C, Camboni M G. Safety profile of octreotide: From Basic Science to Clinical Medicine. Basel: Karger; 1996. p 296-309.
 99. Gillis J C, Noble S, Goa K L. Octreotide long-acting release (LAR). A review of its pharmacological properties and therapeutic use in the management of acromegaly. *Drugs* 1997;53(4):681-99.
 100. Hassenius C, Bader M, Meinhold H et al. Vasoactive intestinal peptide receptor scintigraphy in patients with pancreatic adenocarcinomas or neuroendocrine tumours. *Eur J Nucl Med* 2000;27(11):1684-93.
 101. Valkema R, De Jong M, Bakker W H et al. Phase I study of peptide receptor radionuclide therapy with [^{111}In -DTPA]octreotide: the Rotterdam experience. *Semin Nucl Med* 2002;32(2):110-22.
 102. de Jong M, Breeman W A, Bernard B F et al. Tumour uptake of the radiolabelled somatostatin analogue [DOTA⁰, Tyr³]octreotide is dependent on the peptide amount. *Eur J Nucl Med* 1999;26(7):693-8.
 103. Merbach A E, Toth E, editors. The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging. West Sussex: John Wiley & Sons, Ltd; 2001.
 104. Solomon I. *Phys Rev* 1955;99:559.
 105. Bloembergen N, Purcell E M, Pound R V. *Phys. Rev.* 1948;73:678.
 106. Toth E, Helm L, Merbach A E. Relaxivity of Gadolinium(III) Complexes: Theory and Mechanism (Chapter 2). In: Merbach AE, Toth E, editors. The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging. West Sussex: John Wiley & Sons, Ltd; 2001.
 107. Swift T J, Connick R E. NMR-Relaxation Mechanisms of O-17 in Aqueous Solutions of Paramagnetic Cations and the Lifetime of Water Molecules in the First Coordination Sphere. *J. Chem. Phys.* 1962;37:307.
 108. Tweedle M F. Relaxation agents in NMR imaging. In: Bünzli J-CG, Choppin GR, editors. Lanthanide Probes in Life, Chemical and Earth Sciences: Theory and Practice. Amsterdam: Elsevier; 1989. p 127-79.
 109. Andre J P, Maecke H R, Toth E, Merbach A A. Synthesis and physicochemical characterization of a novel precursor for covalently bound macromolecular MRI contrast agents. *J Biol Inorg Chem* 1999;4(3):341-7.

110. Szilagyı E, Toth E, Brücher E J, Merbach A E. Lanthanide(III)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid complexes in acidic medium: significant decrease in water exchange rate. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 1999;15:2481-2486.
111. De Leon-Rodriguez L M, Ortiz A, Weiner A L et al. Magnetic resonance imaging detects a specific peptide-protein binding event. *J Am Chem Soc* 2002;124(14):3514-5.
112. Béhé M. Radioaktiv markierte Peptide. Technetium Markierungen von Somatostatinanaloga zur Lokalisation von neuroendokrinen Tumoren. Basel: Universität Basel; 1999.
113. White P, Dörner B, Steinauer R, editors. 2002/3 Nova Biochem Catalog - including Synthesis Notes; 2002/2003.
114. Atherton E, Sheppard R. Fluorenylmethoxycarbonyl-polyamide solid phase peptide synthesis. General principles and development: Oxford: Information Press; 1989.
115. Carpino L A, Han G Y. The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Function, a New Base-Sensitive Amino-Protecting Group. *J Am Chem Soc* 1970;92:5748-5749.
116. Kaiser E, Colescott R L, Bossinger C D, Cook P I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal Biochem* 1970;34(2):595-8.
117. Albericio F, Hammer R P, Garcia-Echeverria C et al. Cyclization of disulfide-containing peptides in solid-phase synthesis. *Int. J. Peptide Protein Res.* 1991;37:402 - 413.
118. Kamber B, Hartmann A, Eisler K et al. The Synthesis of Cysteine Peptides by Iodine Oxidation of S-Trityl-cysteine and S-Acetamidomethyl-cysteine Peptides. *Helv Chim Acta* 1980;63(Fasc. 4):899.
119. Reubi J C, Schar J C, Waser B et al. Affinity profiles for human somatostatin receptor subtypes SST1-SST5 of somatostatin radiotracers selected for scintigraphic and radiotherapeutic use. *Eur J Nucl Med* 2000;27(3):273-82.
120. Schibli R, La Bella R, Alberto R et al. Influence of the denticity of ligand systems on the in vitro and in vivo behavior of ^{99m}Tc(I)-tricarbonyl complexes: a hint for the future functionalization of biomolecules. *Bioconjugate Chem* 2000;11(3):345-51.
121. Hofland L J, van Koetsveld P M, Waaijers M, Zuyderwijk J, Breeman W A, Lamberts S W. Internalization of the radioiodinated somatostatin analog [¹²⁵I-Tyr³]octreotide by mouse and human pituitary tumor cells: increase by unlabeled octreotide. *Endocrinology* 1995;136(9):3698-706.

122. Fields G B, Noble R L. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int. J. Peptide Protein Res.* 1990;35:161-214.
123. Heppeler A. Dissertation: Auswirkungen von Metallkomplexgeometrien verschiedener makrozyklischer Polyaminopolycarboxylat Chelatoren auf Biologie und Pharmakologie von Metall-Peptid Konjugaten. Basel: Universität Basel; 2000.
124. Koenig J A, Kaur R, Dodgeon I, Edwardson J M, Humphrey P P. Fates of endocytosed somatostatin sst2 receptors and associated agonists. *Biochem J* 1998;336 (Pt 2):291-8.
125. Froidevaux S, Hintermann E, Torok M, Macke H R, Beglinger C, Eberle A N. Differential regulation of somatostatin receptor type 2 (sst 2) expression in AR4-2J tumor cells implanted into mice during octreotide treatment. *Cancer Res* 1999;59(15):3652-7.
126. Gisin B F, Merrifield R B. Carboxyl-catalyzed intramolecular aminolysis. A side reaction in solid- phase peptide synthesis. *J Am Chem Soc* 1972;94(9):3102-6.
127. Kellam B, Drouillat B, Dekany G, Starr M S, Toth I. Synthesis and in vitro evaluation of lip amino acid and carbohydrate modified enkephalins as potential antinociceptive agents. *Int. J. Pharm.* 1998;161:55-64.
128. Bürgler F. Dissertation: Synthesis, Characterization and Preclinical Evaluation of the Somatostatin Analogue DOTA₂-D-Lys-[Tyr³,Thr⁸]Octreotide (DOTA-D-TATE). Basel: Universität Basel; 2004.
129. Froidevaux S, Heppeler A, Eberle A N et al. Preclinical Comparison in AR4-2J Tumor Bearing-Mice of Four Radiolabeled 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-Tetraacetic Acid-Somatostatin Analogs for Tumor Diagnosis and Internal Radiotherapy. *Endocrinology* 2000;141:3304-3312.
130. Nunn A D, Linder K E, Tweedle M F. Can receptors be imaged with MRI agents? *Q J Nucl Med* 1997;41(2):155-62.
131. Forrer F, Uusijarvi H, Waldherr C et al. A comparison of (111)In-DOTATOC and (111)In-DOTATATE: biodistribution and dosimetry in the same patients with metastatic neuroendocrine tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2004;31(9):1257-62.
132. Verroust P J, Christensen E I. Megalin and cubilin--the story of two multipurpose receptors unfolds. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17(11):1867-71.

133. Mier W, Graham K A N, Wang Q et al. Synthesis of peptide conjugated chelator oligomers for endoradiotherapy and MRT imaging. *Tetrahedron Letters* 2004;45(28):5453-5455.
134. Aime S, Cabella C, Colombatto S, Geninatti Crich S, Gianolio E, Maggioni F. Insights into the use of paramagnetic Gd(III) complexes in MR-molecular imaging investigations. *J Magn Reson Imaging* 2002;16(4):394-406.
135. Aime S, Barge A, Cabella C, Crich S G, Gianolio E. Targeting cells with MR imaging probes based on paramagnetic Gd(III) chelates. *Curr Pharm Biotechnol* 2004;5(6):509-18.

CURRICULUM VITEA**Persönliche Daten:**

Name: Daniel M. Storch
Geburtstag: 6. Oktober 1973
Bürgerort: Riehen BS
Nationalität: CH
Adresse: Oberdorfstrasse 53
CH-4125 Riehen
Email: daniel.storch@unibas.ch

Ausbildungen:**Schulen:**

1980 – 83 Primarschule Erlensträsschen, Riehen
1984 – 86 Realschule Burgstrasse, Riehen
1987 – 93 Gymnasium Bäumlhof, Basel
Juni 1993 Abschluss Maturität Typus C,
Gymnasium Bäumlhof, Basel-Stadt

Studium:

April 1999 Diplomarbeit in anorganischer Chemie: „Clusterchemie an multimetallischen Sternmolekülen“,
Universität Basel, Arbeitsgruppe Prof. E. Constable.
Oktober 1999 Diplomprüfungen in organischer-, anorganischer,
physikalischer und analytischer Chemie, Universität
Basel.
Nebenfach: Betriebswirtschaft, Finanzbuchhaltung und
Kostenrechnung.

Dezember 1999 Dissertation: „Neue, radioaktiv-markierte und Magnet Resonanz-aktive Somatostatinanaloge zur besseren Diagnose und zielgerichteten Radionuklid Therapie von neuroendokrinen Tumoren“,
Radiologische Chemie, Universitätsspital Basel,
Arbeitsgruppe Prof. H. R. Mäcke.

Im Laufe des Studiums wurden Lehrveranstaltungen folgender Dozenten besucht:

M. Bruhn, E.C. Constable, H. Gampp, B. Giese, P. Hauser, C. Housecroft, H. Huber, T. Kaden, J.P. Maier, W. Meier, R. Müller, M. Neuburger-Zehnder, M. Oehme, A. Pfaltz, H. Schierenbeck, P. Schiess, U. Sequin, H. Sigel, A. Vedani, J. Wirz, W. Woggon, A. Zuberbühler.