

**Entwicklung neuer rezeptorgesteuerter  
Radiopharmazeutika für die Therapie von malignen  
Hirntumoren und medullären  
Schilddrüsenkarzinomen**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie  
vorgelegt der  
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Basel

von  
Stephan Good  
aus Aesch, BL  
Basel, 2006

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät auf Antrag von

Prof. Dr. Helmut R. Mäcke

Prof. Dr. Edwin C. Constable

Prof. Dr. Wolfgang P. Meier

Basel, den 24. Oktober 2006

Prof. Dr. Hans-Peter Hauri (Dekan)

---

*„Auch aus Steinen, die einem in den Weg gelegt werden  
kann man Schönes bauen.“*

Johann Wolfgang von Goethe

---

Für Corinne

---

---

## Danksagung

Für die Aufnahme in der Abteilung Radiologische Chemie des Universitätsspitals Basel und die Betreuung während der Dissertation möchte ich Prof. Dr. H. R. Mäcke herzlich danken. Ebenso möchte ich Prof. Dr. A. Merlo für die Möglichkeit danken, dass ich im Projekt zur Therapie von Hirntumoren einen Beitrag leisten durfte.

Prof. Dr. E. C. Constable danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Mein weiterer Dank gilt folgenden Personen:

Prof. Dr. J. Müller-Brand, Leiter der Nuklearmedizin des Universitätsspital Basel

Prof. Dr. J.-C. Reubi und B. Waser vom Institut für Pathologie, Universität Bern für die Bindungsaffinitätsmessungen

Aus der Firma Novartis (Basel) den Herren K. Akyel, I. Muckenschnabel, U. Ramseier und D. Staab für die Analysen

Dr. H. Rink für die fachliche Unterstützung im Bereich der Peptidsynthese

Aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. Merlo den Herren Dr. D. Cordier, Dr. A. Ghaffari und M. Ionescu

Dr. A. Morgenstern und Dr. F. Bruchertseifer vom Institut für Transuranium Elemente in Karlsruhe für Unterstützung mit dem Bismuth-Generator

Dem Laborteam der Radiologischen Chemie und dem Team der Nuklearmedizin am Universitätsspital Basel für die gute Atmosphäre

Den Forschern, welche in dieser Zeit in der Radiologischen Chemie tätig waren:

J. André, B. Ballard, F. Bürgler, J. Chen, P. Dos Santos-Antunes, K. Eichhorn, K.-P. Eisenwiener, M. Fani, S. Fraysse, M. Frischknecht, M. Ginj, V. Hinard, A. Keelara, R. Mansi, J. Schmitt, D. Storch, C. Waldherr, M. Walter, X. Wang, D. Wild, H. Zhang

Den Technikern der Radiologie

Schliesslich möchte ich meiner Frau und meiner Familie für die grosse Unterstützung über die ganze Zeit hinweg herzlich danken

---

---

Im Laufe dieser Arbeit wurden folgende Publikationen, Patente, Buchkapitel und Kongressbeiträge erstellt:

*Kongressabstracts*

1. Schumacher, T., Eichhorn, K., Hofer, S., Good, S., Eisenwiener, K., Mäcke, H., Nitzsche, E., Müller-Brand, J., Merlo, A. Diffusible Brachytherapy (DBT) with radiolabelled Substance P in high grade Gliomas: First observations, *European Journal of Nuclear Medicine*, **2001**, 28/8, 1040.
  2. Good, S., Mäcke, H.R. Kinetics of formation and dissociation of two DOTA-based chelator-conjugates with  $^{177}\text{Lu}$ , *European Journal of Nuclear Medicine*, **2003**, 30/2, S319. Poster presentation.
  3. Good, S., Mäcke, H.R., Merlo, A., Reubi, J.-C. Development of NK-1 receptor mediated radiopharmaceuticals, *Nuklearmedizin*, **2004**, 43, A7. Oral presentation.
  4. Good, S., Mäcke, H.R., Stability and kinetics of formation of two macrocyclic chelator-conjugates with  $^{177}\text{Lu}$ , *Nuklearmedizin*, **2004**, 43, A11. Poster presentation.
  5. Bensimon, C., Oelsner, S., Danks, P., Chan, A., Maecke, H. R., Good, S. A comparison of High and Low Specific Activity Lutetium-177 for Radiolabeling Peptides and Proteins, *European Journal of Nuclear Medicine*, **2004**, 31/2, S391.
  6. Kneifel S., Bernhardt P., Uusijärvi H., Good S., Plasswilm L., Buitrago-Téllez C., Mäcke H., Müller-Brand J., Merlo A. Voxelweise Dosimetrie bei intratumoraler Brachytherapie mit Y-90-Substanz P bei Patienten mit malignen Gliomen, *Nuklearmedizin*, **2005**, 44/2, A85.
  7. Cordier D., Kneifel S., Good S., Apostolidis C., Mäcke H. R., Müller-Brand J., Merlo A. Targeted alpha- and beta-radiopeptide brachytherapy using [Bi-213/Lu-177/Y-90]-DOTAGA-Arg-1-substance P for neurokinin type 1-receptor expressing malignant gliomas, *Nuklearmedizin*, **2005**, 44/2, A76.
  8. Good, S., Walter, M. A., Reubi, J. C., Müller-Brand, J., Mäcke, H. R. New Minigastrin Derivatives for Targeting of CCK2/gastrin Receptor Positive Tumors, *Nuklearmedizin*, **2006**, 45, A136. Oral presentation.
  9. Fröberg, A., Nock, B., Maina, T., Good, S., Erion, J., Verdijseldonck, M., de Herder, W., van der Lugt, A., van Gameren, A., de Jong, M., Béhé, M., Krenning, E. Comparison of three radiolabeled peptides for CCK 2-receptor Scintigraphy in medullary thyroid carcinoma, *European Journal of Nuclear Medicine*, **2006**, 33/14, S109.
  10. Bruchertseifer, F., Good, S., Apostolidis, C., Mäcke, H., Morgenstern, A. An improved method for Bi-213 labelling of DOTA-/DOTAGA-chelated peptides, *European Journal of Nuclear Medicine*, **2006**, 33/14, S161.
-

- 
11. Wild, D., Good, S., Frischknecht, M., Zhang, H., Morgenstern, A., Bruchertseifer, F., Kneifel, S., Boisclair, J., Provencher-Bolliger, A., Mäcke, H. R. Targeted radiotherapy of Gastrin-Releasing-Peptide (GRP) receptor expressing prostate cancer: therapeutic efficacy of  $^{213}\text{Bi}$  vs.  $^{177}\text{Lu}$  labeled DOTA-PEG<sub>4</sub>-Bombesin (7-14) (DOTA-PESIN), *European Journal of Nuclear Medicine*, **2006**, 33/14, S183.

### *Buchbeiträge*

1. Mäcke, H.R., Good, S. Recent Advances in the Use of Radiometals for Therapeutic Applications, *Technetium, Rhenium and Other Metals in Chemistry and Nuclear Medicine*, eds. Nicolini, M., Mazzi, U., **2002**, 6, 35-41. ISBN 88-86281-73-0
2. Mäcke, H.R., Good, S. Radiometals (non-Tc, non-Re) and Bifunctional Labeling Chemistry, *Handbook of Nuclear Chemistry*, eds. Vértes, A., Nagy, S., Klencsár, Z., Vol. 4, chapter 8, **2004**, 279-314. ISBN 1-4020-1316-7

### *Patent*

1. International Publication Number WO 2004/082722 A2, Title: Radiopharmaceuticals for Cancer Diagnosis and Treatment, Publication date 30.09.2004, Inventors/Applicants: A. Merlo, H. Mäcke, J.-C. Reubi, S. Good.

<http://v3.espacenet.com/textdoc?IDX=WO2004082722&CY=ep&LG=en&DB=EPODOC>

### *Publikationen*

1. Kneifel S., Bernhardt P., Uusijärvi H., Good S., Plasswilm L., Buitrago-Téllez C., Mäcke H., Müller-Brand J., Merlo A. Individual Voxelwise Dosimetry of Targeted  $^{90}\text{Y}$ -Substance P Radiotherapy for Malignant Gliomas, *European Journal of Nuclear Medicine*, **2007**, in press.  
<http://www.springerlink.com/content/w22j116638756735/fulltext.pdf>.
  2. Kneifel S., Cordier D., Good S., Ionescu M. C., Ghaffari A., Hofer S., Kretzschmar M., Tolnay M., Apostolidis C., Waser B., Arnold M., Mueller-Brand J., Maecke H. R., Reubi J. C., Merlo A. Local Targeting of Malignant Gliomas by the Diffusible Peptidic Vector 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1-Glutaric Acid-4,7,10-Triacetic Acid-Substance P, *Clin Cancer Res*, **2006**, 12, 3843 - 3850.  
<http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/reprint/12/12/3843?maxtoshow=&HITS=10&hits=10&RESULTFORMAT=&author1=Good&searchid=1&FIRSTINDEX=0&resourcetype=HWCIT>
  3. Good, S., Walter, M. A., Wang, X., Müller-Brand, J., Reubi, J. C., Mäcke, H. R. Macrocyclic Chelator-coupled Gastrin Analogues for Targeting of CCK2/Gastrin Receptor Expressing Tumors, in preparation.
  4. Good, S., Merlo, A., Reubi, J. C., Mäcke, H. R., Development of a new radiopharmaceutical for therapy of high grade brain tumors, in preparation.
-

---

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen .....	11
1. Einführung.....	13
1.1 Nuklearmedizin .....	13
1.2 Rezeptorgesteuerte Radiopharmazeutika .....	19
1.2.1 Aufbau rezeptorgesteuerter Radiopharmazeutika .....	20
1.2.2 Chelatoren für $^{99m}\text{Tc}$ .....	25
1.2.3 Chelatoren für Radiometalle.....	28
1.3 Substanz P-basierende Radiopharmazeutika.....	35
1.3.1 Maligne Hirntumore .....	35
1.3.2 NK-1-Rezeptor gesteuerte Radiopharmazeutika .....	37
1.4 Gastrin-basierende Radiopharmazeutika.....	41
1.4.1 Medulläre Schilddrüsenkarzinome .....	41
1.4.2 CCK-Rezeptor gesteuerte Radiopharmazeutika.....	44
1.5 Radioaktive Markierungen.....	47
1.5.1 Markierungen von makrozyklischen Chelatoren.....	47
1.5.2 Bi-Generator .....	50
1.5.3 Markierungen mit Mikrowellentechnik.....	54
2. Aufgabenstellung .....	56
3. Experimenteller Teil.....	58
3.1 Verwendete Chemikalien .....	58
3.2 Verwendete Geräte.....	59
3.3 Allgemeine Arbeitsvorschriften .....	62
AAV 1: Festphasen-Peptidsynthese .....	62
AAV 2: Kaisertest .....	63
AAV 3: Kopplung eines Prochelators mit SPPS.....	64

---



---

AAV 4: Abspaltung und Entschützung eines Peptids von der Festphase .....	64
AAV 5: Komplexierungen mit (nicht-radioaktiven) Metallen.....	65
AAV 6: Komplexierung mit Radiometallen für biologische Versuche .....	65
AAV 7: Konzentrationsbestimmung von nicht-UV-absorbierenden Chelator-Peptid- Konjugaten.....	66
AAV 8: Konzentrationsbestimmung von UV-absorbierenden Chelator-Peptid- Konjugaten.....	67
3.4 Synthesen .....	68
3.4.1 DOTAGA( <sup>t</sup> Bu) <sub>4</sub> -OH: 1-(1-carboxy-3-carbotertbutoxypropyl)-4,7,10- (carbotertbutoxymethyl)-1,4,7,10 -tetraazacyclododekan.....	68
3.4.2 DOTA-D-Phe-NH <sub>2</sub> .....	73
3.4.3 DOTAGA-D-Phe-NH <sub>2</sub> .....	74
3.5 Komplexe zwischen Lu <sup>3+</sup> und Y <sup>3+</sup> und makrozyklischen Chelatoren .....	75
3.5.1 Komplexierungskinetik .....	75
3.5.2 Komplexstabilität.....	76
3.5.3 Spezifische Aktivität eines <sup>177</sup> Lu-Komplexes .....	76
3.6 Biologische Experimente .....	77
3.6.1 Serumstabilitäten .....	77
3.6.2 Internalisierung.....	77
3.6.3 Bioverteilung .....	80
3.7 <sup>225</sup> Ac/ <sup>213</sup> Bi-Generator .....	81
3.8 Markierungsversuche mit Mikrowellentechnik .....	82
4. Resultate und Diskussion .....	84
4.1 Substanz P-basierende Radiopharmazeutika.....	84
4.1.1 Synthesen der Substanz P-Derivate.....	84
4.1.2 Untersuchung der Oxidation von DOTAGA-Substanz P.....	87

---

---

	10
4.1.3	Ausscheidung des applizierten Radiopharmazeutikums ..... 89
4.1.4	Stabilitätsuntersuchungen ..... 91
4.1.5	Bindungsaffinitäten ..... 96
4.1.6	Internalisierungen ..... 101
4.1.7	Externalisierungen ..... 104
4.1.8	Applikationen am Patienten ..... 106
4.2	Gastrin-basierende Radiopharmazeutika ..... 111
4.2.1	Synthesen der Minigastrin-Derivate ..... 111
4.2.2	Markierungen der Substanzen mit $^{111}\text{In}$ ..... 114
4.2.3	Bestimmung der Bindungsaffinitäten ..... 116
4.2.4	Serumstabilitäten ..... 119
4.2.5	Internalisierung ..... 123
4.2.6	Bioverteilung ..... 127
4.2.7	Szintigraphie von [ $^{111}\text{In}$ -DOTA]-Minigastrin 11 ..... 134
4.3	Komplexe von DOTA und DOTAGA mit $\text{Y}^{3+}$ und $\text{Lu}^{3+}$ ..... 137
4.3.1	Stabilitätsuntersuchung ..... 137
4.3.2	Mathematische Grundlagen der Komplexbildungskinetik ..... 139
4.3.3	Komplexbildungskinetik ..... 141
4.3.4	Unterschiedliche spezifische Aktivitäten mit $^{177}\text{Lu}$ ..... 152
4.4	$^{213}\text{Bi}$ ..... 155
4.4.1	$^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generator ..... 155
4.4.2	Markierungen mit Mikrowellentechnik ..... 158
5.	Zusammenfassung ..... 165
6.	Ausblick ..... 168
	<i>Literaturverzeichnis</i> ..... 171
	<i>Index</i> ..... 184

---

---

## Abkürzungen

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
ACN	Acetonitril
BOC	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
Bq	Becquerel (Zerfälle pro Sekunden)
CCK	Cholecystokinin
Ci	Curie (1 Ci = $3.7 \cdot 10^{10}$ Bq)
CT	Computed Tomography
DCM	Dichlormethan
DIC	N,N'-Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	N-Ethyldiisopropylamin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraessigsäure
DTPA	Diethylentriamid-pentaessigsäure
FCS	Fetal Calf Serum
FDG	[ <sup>18</sup> F]-desoxy-glucose
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
GBM	Glioblastoma multiforme
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphat
HOBt	1-Hydroxy-benzotriazol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSA	Humanes Serumalbumin
HWZ	Halbwertszeit
ITLC	Instant Thin Layer Chromatography
MRI	Magnetic Resonance Imaging

---

---

NK-1	Neurokinin-1
NMP	1-Methyl-2-pyrrolidon
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzo-5-sulfonyl-furan
PET	Positron Emission Tomography
RT	Raumtemperatur
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
SPPS	Solid Phase Peptide Synthesis
tBu	<i>tert</i> -Butyl
TFA	Trifluoressigsäure
TIS	Triisopropylsilan
TOC	Tyr <sup>3</sup> -Octreotide

---

# 1. Einführung

## 1.1 Nuklearmedizin

Die Nuklearmedizin ist eine Disziplin der Radiologie. Sie befasst sich mit der Verabreichung von Medikamenten, welche sich dadurch auszeichnen, dass sie ein radioaktives Atom beinhalten. Die dadurch emittierte radioaktive Strahlung kann entweder durch geeignete Apparaturen und Kameras detektiert und daraus diagnostische Schlüsse gezogen werden, oder aber die Strahlung entwickelt einen therapeutischen Effekt auf Grund der Wechselwirkung mit dem bestrahlten Gewebe. Im Gegensatz zu anderen radiologischen Methoden wie Röntgendiagnostik, Transmissions-Computertomographie oder externer Bestrahlungstherapie befindet sich hier also die Strahlenquelle im Innern des Patienten.

Bei diagnostischen Verfahren wird die aus dem Körper des Patienten austretende Strahlung auf Grund der Wechselwirkung mit Materie detektiert. In einem Szintillationskristall, welcher typischerweise aus Natriumjodid besteht, wird bei jeder Absorption eines Gammaquants im Kristall ein Elektron freigesetzt, welches entlang seiner Bahn wiederum Photonen erzeugt. Die entstehenden Photonen werden durch Photomultiplier vervielfacht und schliesslich in ein elektrisches Signal umgewandelt. Das Prinzip dieses Szintillationszählers wird mit einem Scanner oder mit einer Gammakamera genutzt. Von einem Scanner spricht man, wenn der entsprechende Detektor über den Patienten hinweg bewegt wird, und auf Grund der Position des Detektors die Verteilung der Radioaktivität im Körper rekonstruiert werden kann. Eine Gammakamera kann einen grösseren Bildbereich gleichzeitig erfassen. Sie besitzt einen Kollimator, welcher nur Gammaquanten aus einer definierten Richtung durchlässt, wodurch störende Streustrahlung abgeschirmt wird. Die richtungsparallele  $\gamma$ -Strahlung trifft dann auf

---

einen NaI-Kristall, welcher die Strahlung in Photonen umwandelt. Diese Photonen werden durch mehrere nebeneinander liegende Photomultiplier in elektrische Signale umgewandelt, welche schliesslich elektronisch zu einem Bild verarbeitet werden. Bei der SPECT (single-photon-emission-computed-tomography) rotiert ein oder mehrere solcher Detektoren um den Körper des Patienten, wodurch eine dreidimensionale Darstellung der Radioaktivitätsverteilung ermöglicht wird. Die Energie der von einer Gammakamera erfassten  $\gamma$ -Strahlung sollte in einem für das Messgerät optimalen Bereich, am Besten zwischen 100 und 200 keV liegen. Zu tiefe Energien sind nicht geeignet, da die Strahlung sonst nicht aus dem Körper des Patienten gelangen kann. Die Strahlungsenergie muss aber nur gerade so hoch sein, dass die Strahlung in der Kamera absorbiert wird.

**Abbildung 1:** Funktionsweise einer PET-Kamera

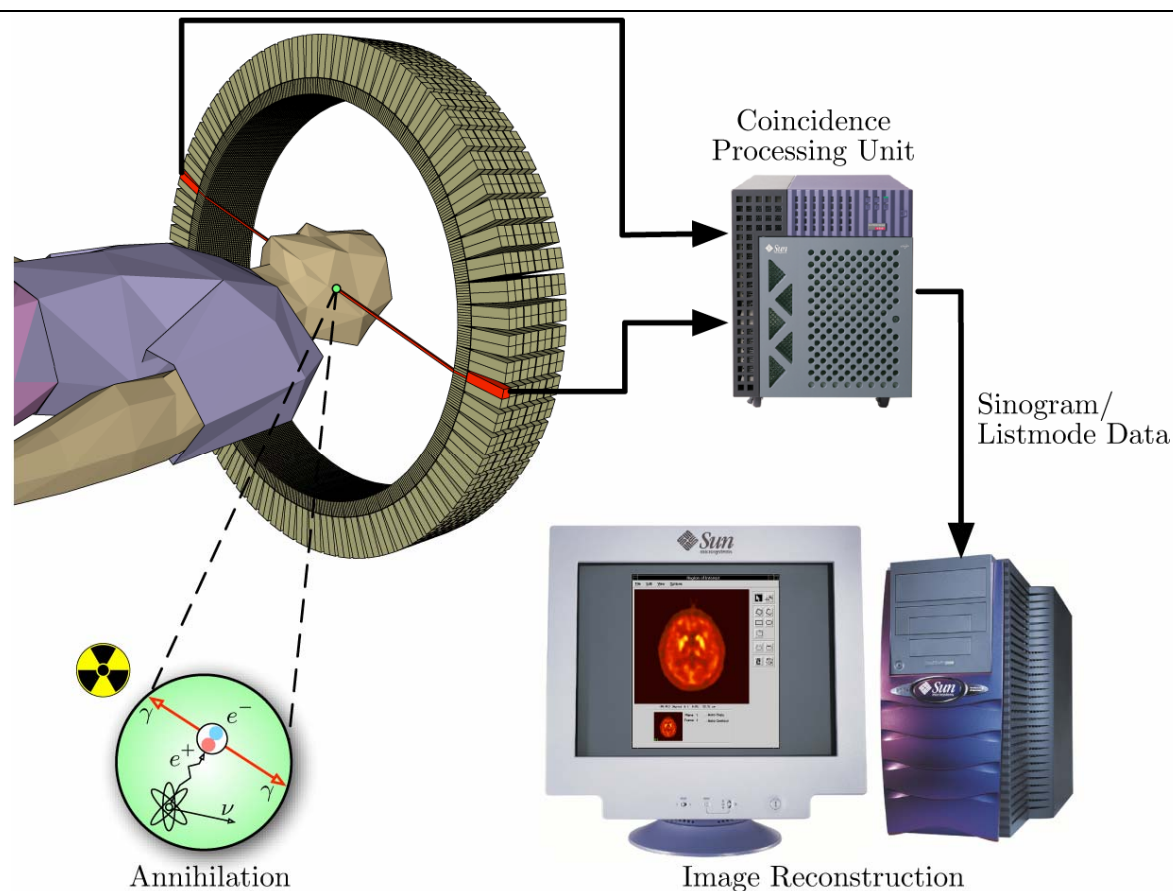


Abbildung aus <http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:PET-schema.png#filelinks>

Alternativ zur Detektion von  $\gamma$ -Strahlung kann auch  $\beta^+$ -strahlung (Positronenstrahlung) zur Szintigraphie genutzt werden. Positronen sind die Antimaterie-Gegenstücke der Elektronen. Trifft ein durch ein Radionuklid emittiertes Positron auf ein Elektron, welche im Körper ubiquitär sind, so werden beide Teilchen unter Aussendung von zwei Photonen vernichtet (Annihilation). Die beiden entstehenden Photonen werden unter einem Winkel von exakt 180 Grad emittiert und haben eine Energie von jeweils 511 keV. Bei der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) werden diese Photonen durch eine um den Patienten angebrachte Kamera detektiert; sie werden nur dann als Bildinformation verarbeitet, wenn gleichzeitig und an gegenüberliegenden Detektoren ein solches Photon eintrifft, sie also in Koinzidenz sind (**Abbildung 1**). Störende Streu- oder Hintergrundstrahlung kann dadurch ausgeblendet werden. Die durch Radionuklide emittierten Positronen haben allerdings eine hohe Energie, so dass sie nach ihrer Entstehung noch eine gewisse Wegstrecke zurücklegen, bevor sie auf ein Elektron treffen und annihilieren. Dadurch wird die Auflösung der PET auf 2 – 3 mm beschränkt.

Als szintigraphische Nuklide kommen also sowohl  $\gamma$ -Strahler wie auch  $\beta^+$ -Emitter in Frage (**Tabelle 1**). Das weitaus gebräuchlichste Radionuklid ist dabei  $^{99m}\text{Tc}$ , welches über einen  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ -Generator verfügbar ist. Dieser Generator kann in ein beliebiges nuklearmedizinisches Labor geliefert und dort betrieben werden. Bei Bedarf kann das benötigte  $^{99m}\text{Tc}$  durch einfaches Eluieren des Generators mit physiologischer Kochsalzlösung gewonnen werden. Über 65 % aller Anwendungen in der Nuklearmedizin basieren auf diesem Nuklid (1).

---

**Tabelle 1:** Eigenschaften ausgewählter diagnostischer Radionuklide

Isotop	HWZ (h)	Zerfallsart	$\bar{E}_\beta$ (keV) (%)	$E_\gamma$ (keV) (%)
$^{99m}\text{Tc}$	6.02	IC, $\gamma$		141 (99.2)
$^{67}\text{Ga}$	78.3	EC, Auger		93 (38), 185 (21)
$^{111}\text{In}$	67.2	Auger, $\gamma$		171 (90), 247 (94)
$^{55}\text{Co}$	17.5	$\beta^+$ , EC	650 (46), 437 (27)	931 (75)
$^{60}\text{Cu}$	0.39	$\beta^+$ , EC	1325 (15), 873 (48)	1792 (45), 1332 (88)
$^{61}\text{Cu}$	3.4	$\beta^+$ , EC	527 (50)	656 (10), 283 (13)
$^{62}\text{Cu}$	0.16	$\beta^+$ , EC	1315 (98)	1173 (0.3)
$^{64}\text{Cu}$	12.9	$\beta^-$ , $\beta^+$ , EC	190 (37) ( $\beta^-$ ), 278 (18) ( $\beta^+$ )	1346 (0.5)
$^{66}\text{Ga}$	9.4	$\beta^+$ , EC	1903 (50), 397 (4)	1039 (38)
$^{68}\text{Ga}$	1.1	$\beta^+$ , EC	836 (88)	1077 (3)
$^{86}\text{Y}$	14.7	$\beta^+$ , EC	550 (13)	1077 (83), 777 (22)
$^{89}\text{Zr}$	78.5	$\beta^+$ , EC	395 (23)	909 (99.9)
$^{90}\text{Nb}$	14.6	$\beta^+$ , EC	662 (54)	2319 (82), 1129 (92)

IC = internal conversion; EC = electron capture

*Daten aus (2)*

Bei therapeutischen nuklearmedizinischen Anwendungen werden dem Patienten Radiopharmazeutika verabreicht, welche eine Korpuskularstrahlung, also  $\alpha$ - oder  $\beta^-$ -Strahlung emittieren (3). Neuere Entwicklungen nutzen sogar Auger-Emitter, welche sich durch eine sehr kurze Strahlungsreichweite auszeichnen (4-7).

Diese Korpuskularstrahlung kann auf die umgebende Materie eine ionisierende Wirkung haben, wodurch chemische Bindungen gebrochen werden können. Durch geeignete Moleküle



kann nun eine therapeutisch wirksame Dosis dieser Strahlung an einen gewünschten Ort, z.B. einen Tumor, gebracht werden, um dort dieses Gebiet gezielt zu bestrahlen. Im Gegensatz zur Bestrahlung mittels externer Strahlenquellen wird so die Beeinträchtigung von umgebendem Gewebe auf ein Minimum reduziert.

**Tabelle 2:** Eigenschaften ausgewählter therapeutischer Radionuklide

Isotop	HWZ (d)	Zerfallsenergie		Reichweite	
		Max. $\beta^-$ (MeV)	$\gamma$ (keV)	Durchschnitt (mm)	In Zell-Durchmesser
$^{67}\text{Cu}$	2.58	0.577 (20 %)	91 (7 %) 93 (16 %) 185 (48 %)	0.27	20
$^{90}\text{Y}$	2.67	2.27 (100 %)		2.8	150
$^{149}\text{Pm}$	2.21	1.07	286 (3 %)	0.71	60
$^{153}\text{Sm}$	1.93	0.69	103 (28 %)	0.35	30
$^{166}\text{Dy}$	3.40	0.40	82.5	0.18	15
$^{166}\text{Ho}$	1.12	1.8 (51 %)	80.6 (6.3 %)	1.38	117
$^{177}\text{Lu}$	6.71	0.50 (79 %)	208 (11 %) 113 (6.4 %)	0.24	20
$^{212}\text{Bi}$	1 h	1.36 ( $\beta^-$ , 64 %) 6.1 ( $\alpha$ , 36 %)	727 (7 %)	0.09 0.06	2-3
$^{213}\text{Bi}$	46 min	5.8 ( $\alpha$ , 2.2 %) 8.4 ( $\alpha$ , 97.8 %)	440	0.06 0.08	2-3
$^{225}\text{Ac}$	10	5.83 ( $\alpha$ , 100 %)		0.06	2-3

*Tabelle aus (8)*

Als Vorteil gegenüber chemotherapeutischen Arzneimitteln ist zu erwähnen, dass es nicht unbedingt nötig ist, jede einzelne Tumorzelle mit einem radioaktiven Molekül zu erreichen.

Die radioaktive Strahlung hat selber eine Reichweite von einigen Zelldurchmessern, wodurch auch Tumorzellen zerstört werden können, an welche das Radiopharmazeutikum nicht direkt gebunden ist (so genannter Cross-Fire-Effekt). Je nach Grösse des zu bestrahlenden Volumens kann ein entsprechendes Radionuklid ausgewählt werden (3, 9-11) (**Tabelle 2**).

---

**Tabelle 3:** Einige ausgewählte nuklearmedizinische Routineuntersuchungen

---

<b>Substanzname</b>	<b>Markiertes Molekül</b>	<b>Anwendung</b>
$^{99m}\text{Tc}$ -MDP	Methyldiphosphonat	Knochenszintigraphie
$^{99m}\text{Tc}$ -DTPA	Diethylentetraamin-pentaessigsäure	Liquorraumszintigraphie
$^{99m}\text{Tc}$ -Sestamibi	Hexakis-2-methoxy-2-methylpropyl-isonitril	Myokardperfusionsszintigraphie
$^{99m}\text{Tc}$ -MAG3	Mercaptoacetyltriglycin	Nierenszintigraphie
$^{111}\text{In}$ -HSA	Humanes Serumalbumin	Infektdiagnostik
$^{19}\text{F}$ -FDG	Fluordesoxyglukose	Glukosestoffwechselszintigraphie

---

*Zusammengestellt aus (12)*

---

Sowohl bei diagnostischen als auch bei therapeutischen Anwendungen kommt der Auswahl des Moleküls, welches dann schliesslich das radioaktive Atom trägt, die entscheidende Rolle zu (**Tabelle 3**). Die pharmakologischen Eigenschaften dieses Moleküls bestimmen, wo im Körper sich das Radiopharmakon akkumuliert, wie rasch eine Anreicherung stattfindet, ob das Molekül rasch ausgeschieden wird, welche Funktion dargestellt werden kann etc.

So können zum Beispiel für die Liquorraumszintigraphie  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA (Diethylentriamin-pentaessigsäure) oder  $^{99m}\text{Tc}$ -HSA (humanes Serumalbumin) verwendet werden, der Nachweis

---

frischer Herzinfarkte gelingt mit  $^{99m}\text{Tc}$ -Pyrophosphat, und der Glucosstoffwechsel kann mit  $^{19}\text{F}$ -FDG dargestellt werden.

## 1.2 Rezeptorgesteuerte Radiopharmazeutika

Die Entwicklung von neuen, rezeptorgesteuerten Radiopharmazeutika wurde in den letzten Jahren stark vorangetrieben (13). Man nutzt dabei die Entdeckung, dass eine Vielzahl von Tumoren an der Oberfläche ihrer Zellen bestimmte Rezeptoren in einem stark erhöhten Masse exprimieren (14). Diese Rezeptoren können als molekulares Erkennungsmerkmal von entsprechenden Tumoren genutzt werden. Dazu werden bestimmte Moleküle als Vektoren verwendet, also als Substanzen, welche an diesen Rezeptoren binden. Weil die Anzahl der Rezeptoren auf der Oberfläche der Tumorzelle gegenüber gesundem Gewebe um ein Vielfaches erhöht ist, wird der Tumor spezifisch angegriffen.

An dem Vektormolekül können entsprechende Radioisotope angebracht werden, was auch als Markierung bezeichnet wird. Da die ausgebildeten Rezeptoren vom entsprechenden Typus des Tumors abhängig sind, muss man für die jeweilige Erkrankung einen passenden Rezeptorliganden auswählen (15) (**Tabelle 4**).

---

### 1.2.1 Aufbau rezeptorgesteuerter Radiopharmazeutika

Der prinzipielle Aufbau rezeptorgesteuerter Radiopharmazeutika besteht aus verschiedenen Teilen (**Abbildung 2**):

- einem Biomolekül, welches als rezeptorspezifischer Vektor agiert; z.B. ein Peptid oder ein Antikörper
- einem Linker
- einem bifunktionellen Chelator
- einem Radionuklid, häufig ein Radiometall

Die Auswahl des Vektormoleküls wird durch die Natur des zellulären Zieles, also des Rezeptors, bestimmt. Als Leitstruktur wird häufig der natürliche Ligand des entsprechenden Rezeptors gewählt, z.B. ein Hormonpeptid. Dieses Biomolekül kann modifiziert sein, um gewisse Eigenschaften zu verbessern wie zum Beispiel die Bindungseigenschaften des Moleküls, die Stabilität, die Verteilung in verschiedenen Organen etc.

Der „Linker“ dient hauptsächlich zur Verknüpfung des Vektorteiles des Radiopharmazeutikums mit dem signalgebenden bzw. therapeutisch wirksamen Abschnitt der Substanz. Der Linker kann dabei nebst einer stabilen Bindung auch einen gewissen Abstand zwischen dem Vektorteil und dem Chelator gewährleisten, so dass die Bindungseigenschaften des entsprechenden Biomoleküls zum angepeilten Rezeptor nicht negativ beeinflusst werden (sogenannte Spacer-funktion). Durch die Auswahl des Linkers können auch die Eigenschaft des gesamten Radiopharmazeutikums, wie z.B. die Lipophilie und damit die pharmakokinetischen Eigenschaften, beeinflusst werden. Schliesslich können über einen entsprechenden Linker auch zusätzliche Funktionalitäten in das Radiopharmakon eingebaut werden.

---

**Tabelle 4:** Überexprimierte Peptidrezeptoren bei unterschiedlichen Tumoren

<b>Rezeptor</b>	<b>Natürlicher Rezeptorligand</b>	<b>Tumortypus</b>
Somatostatinrezeptor Subtypen 1-5	Somatostatin	SCLC, neuroendokriner Tumor, non-Hodgkin Lymphom, Melanom, Mammakarzinom, Astrozytom
Cholecystokinin-Rezeptoren Subtypen 1 & 2	Cholecystokinin, Gastrin	MTC, SCLC, Insulinom, Astrozytom, Ovariales Karzinom
Bombesin-Rezeptoren	Bombesin, GRP	Prostatakarzinom, Mammakarzinom
Neurokinin-1	Substanz P	Glioblastom, Astrozytom, MTC, Mammakarzinom
Rezeptor für Melanozyten-Stimulierendes-Hormon	$\alpha$ -MSH	Melanom
Rezeptor für Luteinizing-hormone-releasing-hormone	LHRH	Prostatakarzinom, Mammakarzinom
Neurotensin-rezeptoren	Neurotensin	Pankreaskarzinom, Kolonkarzinom, SCLC, MTC, Ewing Sarkom
VIP-/ PACAP-Rezeptoren	Vasoaktives intestinales Peptid	SCLC, Kolonkarzinom, Pankreaskarzinom,
GLP-1-Rezeptor	Glucagon-like-Peptide	Insulinom

SCLC = small cell lung cancer; MTC = medullary thyroid cancer;  
GRP = gastrin releasing peptide

Solche durch Einbringung einer zusätzlichen Funktionalität modifizierten Peptide, so genannte trifunktionelle Peptide, können zytotoxische oder zytostatische Strukturen tragen, wie z.B. Cisplatin-Komplexe, Doxorubizin oder andere. Verschiedene Zytostatika wurden bereits an Peptide gekoppelt und die Wirkung dieser Konjugate getestet (16, 17).

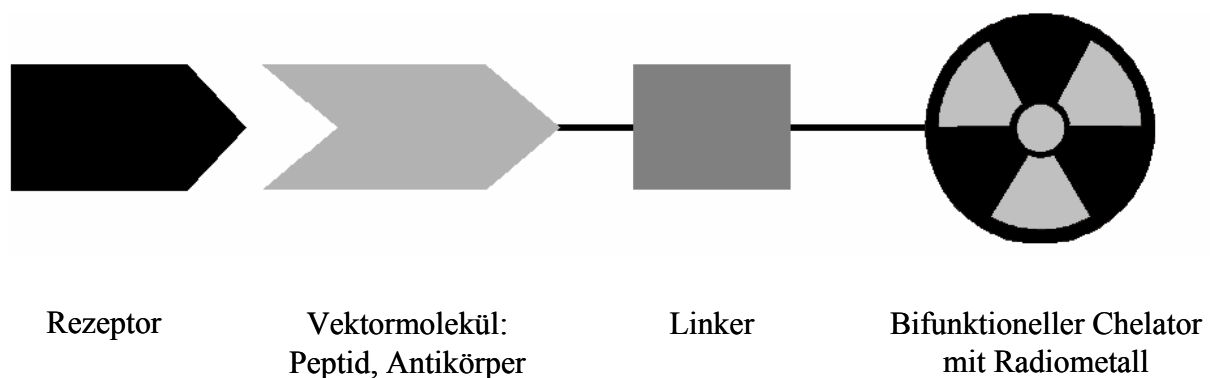
Es können aber auch Zucker-Derivate als zusätzliche Funktionalität in die Moleküle eingebaut werden, um dadurch die pharmakokinetischen Eigenschaften der Radiopharmaka zu beeinflussen. Eine solche Zucker-Funktion führt zu einer schnelleren Blut-Clearance, wobei die nicht vom Tumor aufgenommene Substanz rascher über die Nieren ausgewaschen und über den Urin ausgeschieden wird, ohne dass der insgesamt resultierende Nierenuptake erhöht wird (18, 19). Erwähnenswert ist ebenfalls die Verknüpfung eines Radiopeptides mit einem „nuclear localizing signal“, einer Peptidfunktion, welche dazu führt, dass das Radiopharmazeutikum in deutlich höherer Masse zum Nukleus der Tumorzellen gelangt (5). Gerade bei sehr kurzreichweitigen Strahlern wie Auger-Emittern ist es wichtig, dass die Radioaktivität möglichst nahe am Nukleus seine Wirkung entfalten kann. Ein Doppelstrangbruch der DNS, welche sich im Nukleus der Zelle befindet, führt zum Absterben dieser Tumorzelle.

Der Aufbau eines Radiopharmazeutikums kann schliesslich auch einen Linker beinhalten, mit welchem mehrere Chelatoren für die Bindung eines Radiometalls gleichzeitig an ein Peptid gekoppelt werden (20, 21). Dadurch kann die spezifische Aktivität (Radioaktivitätsmenge pro Mol Substanz) erhöht werden, was gerade bei Peptiden von Bedeutung ist, welche selber eine pharmakologische Wirkung aufweisen. So führt z.B. die Applikation eines VIP-Derivates bereits im Mikrogramm-Bereich zu kurzfristigen Nebenwirkungen wie einer raschen Absenkung des Blutdruckes (22). Auch bei einem Radiopharmazeutikum auf Basis von Substanz P konnten kurzfristige Nebenwirkungen beobachtet werden (23), bei Bombesin ist dies auch zu erwarten (24). Etwas weniger Nebenwirkungen scheinen Derivate von Somatostatin zu haben, wo solche unerwünschten Effekte doch erst im Bereich von einigen hundert Mikrogramm auftreten (25). Eine hohe spezifische Aktivität der Radiopharmazeutika ermöglicht nun eine Anwendung hoher Aktivitätsdosen auch bei geringen Mengen des verwendeten Peptids.

---

Die Erhöhung der spezifischen Aktivität ist aber nicht nur im Hinblick auf die Reduktion von Nebenwirkungen wichtig, sondern auch weil bei zu hohen verwendeten Peptidmengen Sättigungseffekte der vorhandenen Rezeptoren zu erwarten sind. Dass solche Sättigungen bereits in einem Mengenbereich auftreten können, welcher heutzutage in der therapeutischen Anwendung von rezeptorgesteuerten Radiopharmazeutika erreicht wird, wurde im Falle von  $^{90}\text{Y}$ -DOTATOC gezeigt (26).

**Abbildung 2:** Prinzipieller Aufbau eines rezeptorgesteuerten Radiopharmazeutikums



*Abbildung aus (27)*

Der Chelator, welcher an den Linker geknüpft wird, ist ein so genannter bifunktionaler Chelator (BFC). Er besteht aus einer Einheit, welche ein entsprechendes Radiometall komplexieren kann, und aus einer funktionellen Gruppe, welche eine kovalente Bindung an den entsprechenden Linker oder das Vektormolekül ermöglicht (3, 8, 15, 27).

Die Anforderungen an einen BFC sind vielfältig (28). Es müssen thermodynamisch stabile und kinetisch inerte Komplexe gebildet werden, welche insbesondere in einem pH-Bereich von 5 bis ca. 7.5 stabil sind. Es muss dadurch eine Dekomplexierung des Radiometalls in vivo verhindert werden, weil freie Radiometalle toxisch wirken können. So sind zum Beispiel  $^{177}\text{Sm}^{3+}$ ,  $^{90}\text{Y}^{3+}$  oder  $^{153}\text{Sm}^{3+}$  so genannte „bone seekers“, welche sich im Knochenmark eines

Patienten anreichern und so dieses bestrahlen würden. Die BFC konkurrieren als Chelatoren häufig mit natürlichen Chelatoren des Blutes wie z.B. Transferrin.

Die Auswahl des Radionuklids ist abhängig von verschiedenen Faktoren (10, 11, 27, 29):

- Dem medizinischen Ziel (Diagnostik, Therapie)
- Der Verfügbarkeit
- Der benötigten Dosis
- Der physikalischen Halbwertszeit
- Den Kosten

Für diagnostische Zwecke ist das weit verbreitete  $^{99m}\text{Tc}$  äusserst vorteilhaft, da es sowohl gut szintigraphisch darstellbar ist, sowie die Verfügbarkeit über den  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ -Generator gut und erschwinglich ist. Die Halbwertszeit ist mit 6.02 h lange genug um vernünftige diagnostische Aussagen zu machen, aber auch kurz genug um den Patienten und seine Umgebung nicht unnötig lange einer radioaktiven Strahlung auszusetzen. Die biologische Halbwertszeit vieler Pharmaka, also die Verweildauer der Pharmaka im Patienten, liegt oft auch in diesem Bereich.

Generell muss ein verwendetes Radiometall für den Einbau in einem Chelator möglichst frei von anderen Metallionen sein, da diese häufig ebenfalls in einen Chelator eingebaut werden und so eine tiefere spezifische Aktivität des resultierenden Radiopharmakon verursachen (30).

---



### 1.2.2 Chelatoren für $^{99m}\text{Tc}$

Für die Anwendung von  $^{99m}\text{Tc}$  werden meist Amino-Stickstoff-, Schwefel- aber auch Sauerstoff-donoren zur Komplexierung verwendet. Häufig kommt auch eine Kombination verschiedenster Donoren in einem Chelator zur Anwendung (31).

In der Herstellung rezeptorgesteuerten Radiopharmaka kommen grundsätzlich drei verschiedenen Strategien für die Markierung zum Zuge:

- „direct-labeling“

Hier wird  $^{99m}\text{Tc}$  über Donoren gebunden, welche bereits in der natürlichen Struktur des Biomoleküls enthalten sind. So kann zum Beispiel eine Disulfidbrücke eines Proteins reduziert und in freie Thiole umgewandelt werden. Diese können dann  $^{99m}\text{Tc}$  binden. Dieser Ansatz hat den Nachteil, dass die wahre Struktur des Endproduktes oft unklar ist; so kann z.B.  $^{99m}\text{Tc}$  auch verbrückend zwischen zwei Thiolen unterschiedlicher Biomoleküle agieren.

- „prelabeling“

$^{99m}\text{Tc}$  wird bei dieser Strategie durch einen bifunktionellen Chelator komplexiert und danach erst an ein Biomolekül gekoppelt. Während dieser Ansatz für Forschungszwecke durchaus interessant ist, scheint er für den routinemässigen Gebrauch im klinischen Alltag wenig geeignet, da er zu komplex und zeitraubend ist.

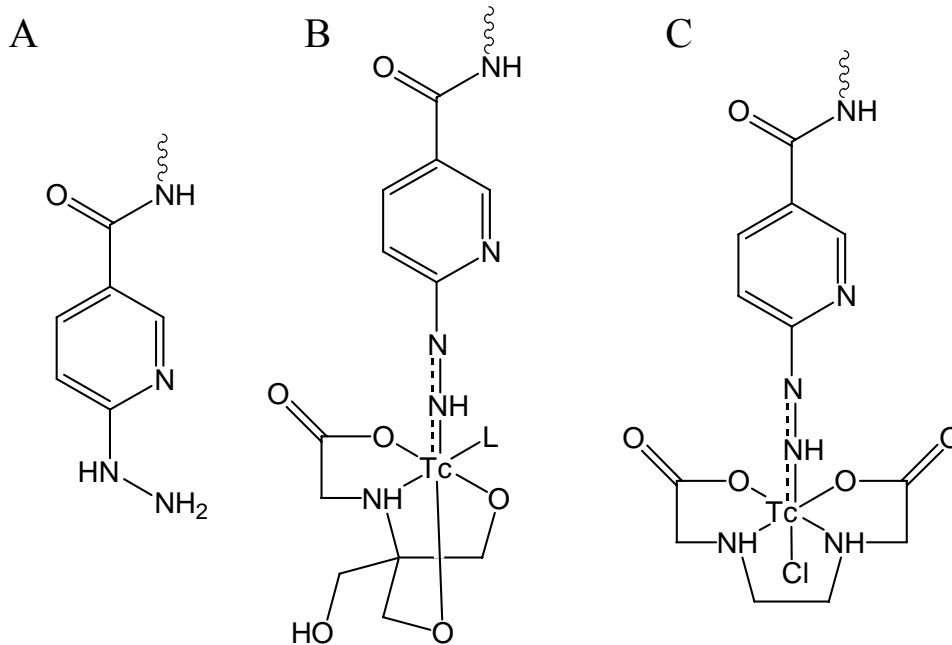
---

- „postlabeling“

Ein bifunktionseller Chelator wird an ein Biomolekül gekoppelt und erst im letzten Schritt  $^{99m}\text{Tc}$  eingebracht. Da die Durchführung der organischen Syntheseschritte zur Herstellung des Chelator-Biomoleküls vor der Einführung des radioaktiven Technetiums erfolgt, sind dort noch keine strahlungsbedingten Einschränkungen vorhanden (Strahlenschutz, physikalische Halbwertszeit). Für die Markierung selber kann eine Kitformulierung erfolgen, wo alle benötigten Inhaltsstoffe in einem Gefäß vorgelegt sind und lediglich noch die Pertechnetat-Lösung beigelegt werden muss; aufwändige Aufarbeitungsschritte entfallen dadurch. Als Nachteil des postlabeling approaches muss erwähnt werden, dass meist ein grösserer Überschuss an Chelator gegenüber  $^{99m}\text{Tc}$  angewendet werden muss, um eine vernünftige radiochemische Reinheit des Endproduktes erreicht wird. Dies schränkt die spezifische Aktivität des Radiopharmakon ein.

---

**Abbildung 3:** Struktur von HYNIC und  $^{99m}\text{Tc}$ -Komplexen davon für die Kopplung an Biomoleküle



**A** = HYNIC; **B** = [Tc(HYNIC)(tricine)(L)]; **C** = [Tc(HYNIC)(EDDA)Cl],  
EDDA = Ethylendiamin-diessigsäure

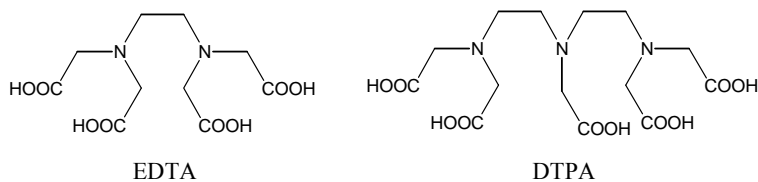
Erwähnenswert für die Markierung mit  $^{99m}\text{Tc}$  ist die Verwendung von 2-Hydrazinnikotinsäure (HYNIC) zur Markierung von Biomolekülen (32, 33). HYNIC agiert als einzähniger Ligand und lässt dadurch eine Vielzahl von möglichen Coliganden zu (34) (**Abbildung 3**). Die Bioverteilung der Radiopharmaka kann dadurch beeinflusst werden (35).

Die erwähnten drei Strategien für die Markierung eines Radiopharmakzeutikums sind natürlich auch für andere Radionuklide als für  $^{99m}\text{Tc}$  anwendbar.

### 1.2.3 Chelatoren für Radiometalle

Nebst  $^{99m}\text{Tc}$  steht eine Vielzahl anderer Radiometalle zur Verfügung (**Tabelle 1, Tabelle 2**). Die Natur des Radiometalls bestimmt dabei die Wahl des Chelators, welcher verwendet werden kann. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen zwei verschiedenen Typen von Chelatoren: den azyklischen und den makrozyklischen Chelatoren (**Abbildung 4, Abbildung 5, Abbildung 6**).

**Abbildung 4:** Azyklische Chelatoren, basierend auf Polyazaalkanen mit Carboxylat-funktionalisierung

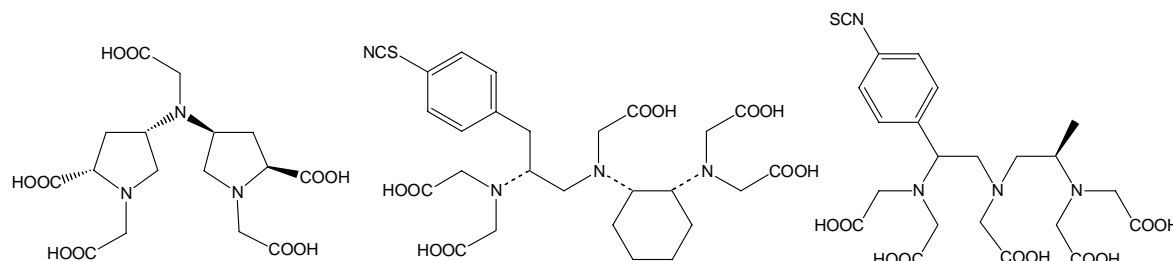


EDTA = Ethylendiamintetraacetat;  
 DTPA = Diethylen-triaminopentaacetat

Während die ersten bifunktionellen Chelatoren (BFC) auf der Basis von EDTA aufgebaut wurden (36, 37), beruhen heute die meisten der verwendeten, azyklischen BFC auf der Basis von DTPA (**Abbildung 4**). Das erste klinisch zugelassene Peptid-basierende Radiopharmakon für die Diagnostik von Tumoren war das DTPA-derivatisierte Somatostatin Analog Octreotid, welches für die szintigraphische Anwendung mit  $^{111}\text{In}$  markiert werden kann (Octreoscan®) (38). Dabei stellt DTPA einen sehr geeigneten Chelator für dieses Radiometall dar, indem mit einer schnellen Komplexierungskinetik ein ausreichend stabiler Komplex mit Koordinationszahl acht gebildet wird (39). Während die schnelle Komplexbildungskinetik ein generelles Phänomen bei offenkettigen Chelatoren ist, hat sich herausgestellt, dass oft die

limitierte Stabilität der DTPA-Komplexe mit anderen Radiometallen ein Problem darstellt. So ist der Chelator DTPA, welcher über eine der Carboxylgruppen an ein Biomolekül gebunden ist, auf Grund der geringen Komplexstabilität in vivo zwar für die Anwendung von  $^{111}\text{In}$ , nicht aber für die Verwendung von  $^{90}\text{Y}$  geeignet (40). Für die therapeutische Anwendung von  $^{90}\text{Y}$  ist ein Konjugat mit einem makrozyklischen Chelator einem Konjugat mit einem azyklischen Chelator deutlich überlegen (41).

**Abbildung 5:** Stabilisierte Derivate von DTPA



Um die Stabilität der offenkettigen Chelatoren zu erhöhen, wurden verschiedene zusätzliche Funktionalitäten an die Prototypen EDTA und DTPA gekoppelt (42, 43) (**Abbildung 5**). Ein solcher auf DTPA basierender BFC ist *Tiuxetan* (44). Dieser Chelator wurde gekoppelt an den anti-CD20-Antikörper *Ibritumomab* und führte so zum Medikament *Zevalin*®. Dieses ist vorgesehen für die Markierung mit  $^{111}\text{In}$  für diagnostische Zwecke aber auch mit  $^{90}\text{Y}$  für Therapien. Es ist der erste durch die US-amerikanische Food and Drug Administration (FDA) zugelassene, radioaktiv markierte Antikörper für therapeutische Anwendungen bei non-Hodgkin-Lymphomen (45).

Wie bereits erwähnt haben makrozyklische Chelatoren gegenüber den offenkettigen Analogen den Vorteil, dass die gebildeten Komplexe meist eine höhere kinetische Stabilität aufweisen (**Tabelle 5**).

**Tabelle 5:** Stabilitätskonstanten ( $\log K_{ML}$ ) einiger makrozyklischer Komplexe (46)

Metall	DOTA	PEPA	HEHA	DTPA
Lu <sup>3+</sup>	29.2	16.71	24.26	22.4
Y <sup>3+</sup>	24.9	16.07	24.04	22.1
Sm <sup>3+</sup>		15.35	21.24	22.3
Ho <sup>3+</sup>		16.48	23.88	22.8

$$K_{ML} = \frac{[ML]}{[M][L]} (M^{-1})$$

Leider erfordert der Komplexbildungsschritt von makrozyklischen Chelatoren mit Radiometallen auf Grund der langsamen Komplexbildungskinetik (**Tabelle 6**) häufig drastischere Bedingungen als azyklische Chelatoren, um eine vernünftige radiochemische Reinheit innerhalb nützlicher Frist zu erreichen (30).

**Tabelle 6:** Komplexbildungskonstanten pseudo-erster Ordnung für die Komplexbildung bei pH 7.8 und 25°C (47)

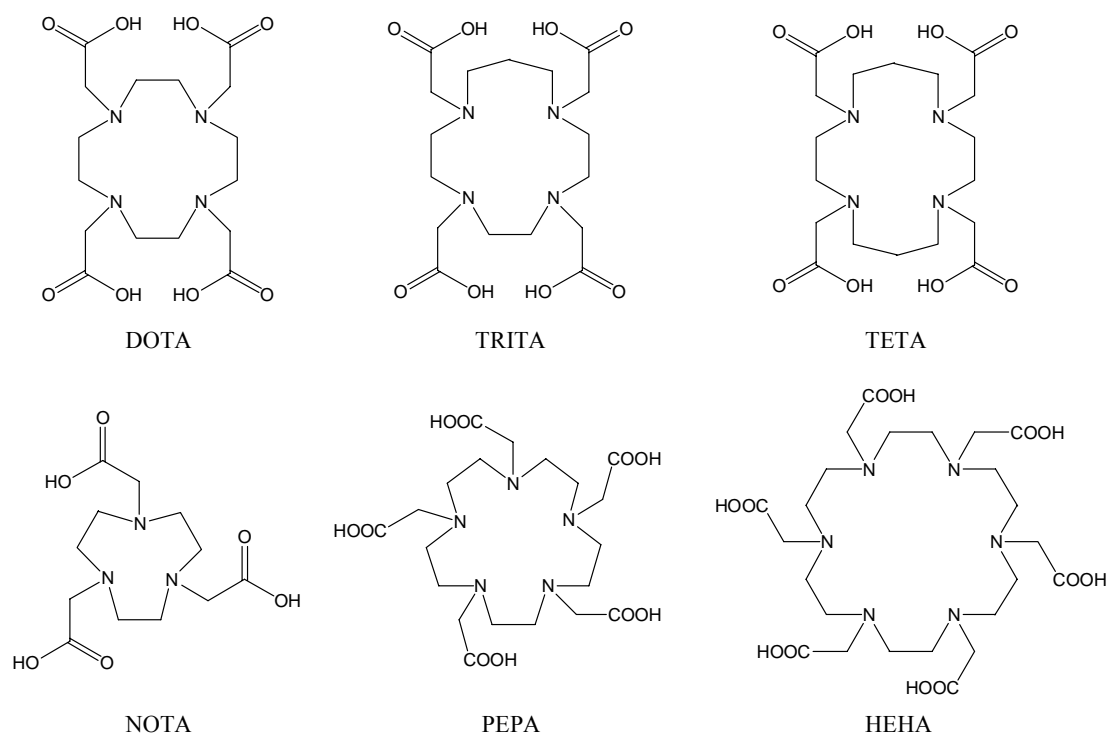
	$k_{obs}$ (min <sup>-1</sup> )			
Metall	DOTA	PEPA	HEHA	DTPA
Lu <sup>3+</sup>	$6.3 \cdot 10^{-3}$	$9.6 \cdot 10^{-2}$	$5.8 \cdot 10^{-1}$	4.6
Y <sup>3+</sup>	$4.6 \cdot 10^{-3}$	$2.0 \cdot 10^{-1}$	$6.8 \cdot 10^{-1}$	7.3

Als Beispiel für die Bedingungen, welche für die Komplexbildung mit einem makrozyklischen Chelator nötig sind, kann man das in unserer Abteilung verwendete Protokoll für die Markierung von DOTATOC mit <sup>90</sup>Y aufführen. Es sieht eine Inkubation der Reaktionslösung während 30 min in einem Heizblock mit einer Temperatur von 95°C vor. Solche Bedingungen

werden zwar von Peptid-basierenden Verbindungen gut ertragen, jedoch sind sie für die Anwendung mit Antikörpern ungeeignet, da diese bei so hohen Temperaturen ihre Tertiärstruktur (räumliche Faltung) und somit ihre Bindungseigenschaften verlieren.

Die Ringgröße von makrozyklischen Chelatoren kann variabel gewählt (**Abbildung 6**) und dabei auf das zu verwendende Radiometall abgestimmt werden. DOTA ist ein Cyclen-basierender makrozyklischer Chelator, welcher stabile Komplexe mit einer Vielzahl von in der Nuklearmedizin interessanten Metallen bildet wie z.B.  $Y^{3+}$ ,  $In^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$  oder  $Lu^{3+}$  (48).

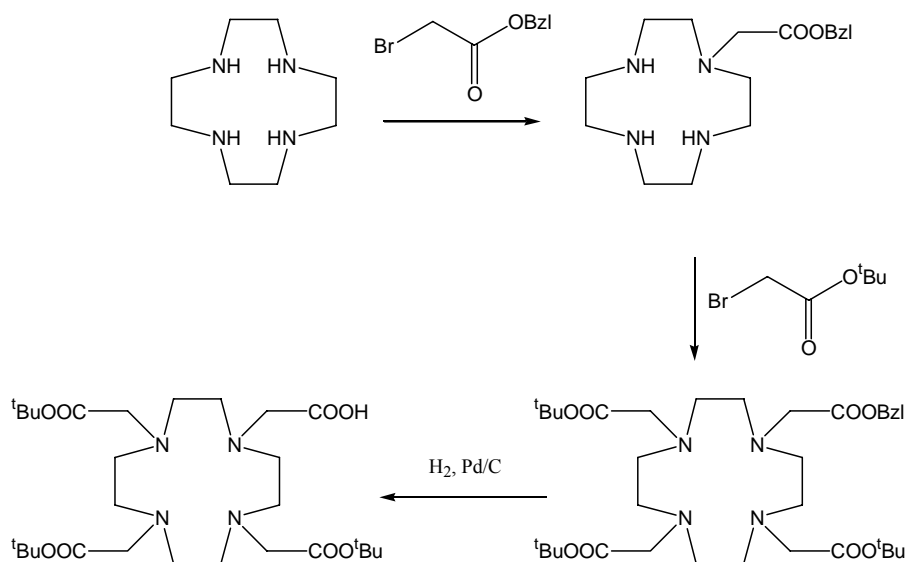
**Abbildung 6:** Makrozyklische Chelatoren, basierend auf Polyazamacrozyklen mit Carboxylat-funktionalisierung



DOTA = Dodeca-1,4,7,10-tetraamin-tetraessigsäure; TRITA = Trideca-1,4,7,10-tetraamin-tetraessigsäure; TETA = Tetradeca-1,4,8,11-tetraamin-tetraessigsäure; NOTA = Nona-1,4,7-triamin-triessigsäure; PEPA = Pentadeca-1,4,7,10,13-pentaamin-pentaessigsäure; HEHA = Hexadeca-1,4,7,10,13,16-hexaamin-hexaessigsäure

DOTA kann über einen der vorhandenen Carbonsäure-Seitenarme an ein Biomolekül gekoppelt werden. Um DOTA als BFC in der Festphasensynthese von Peptiden (SPPS) einzusetzen, wurde durch Anwendung von orthogonaler Schutzgruppentechnik ein Synthon entwickelt (49), welches noch an der Festphase an das Seitenketten-geschützte Peptid geknüpft werden kann (**Abbildung 7**).

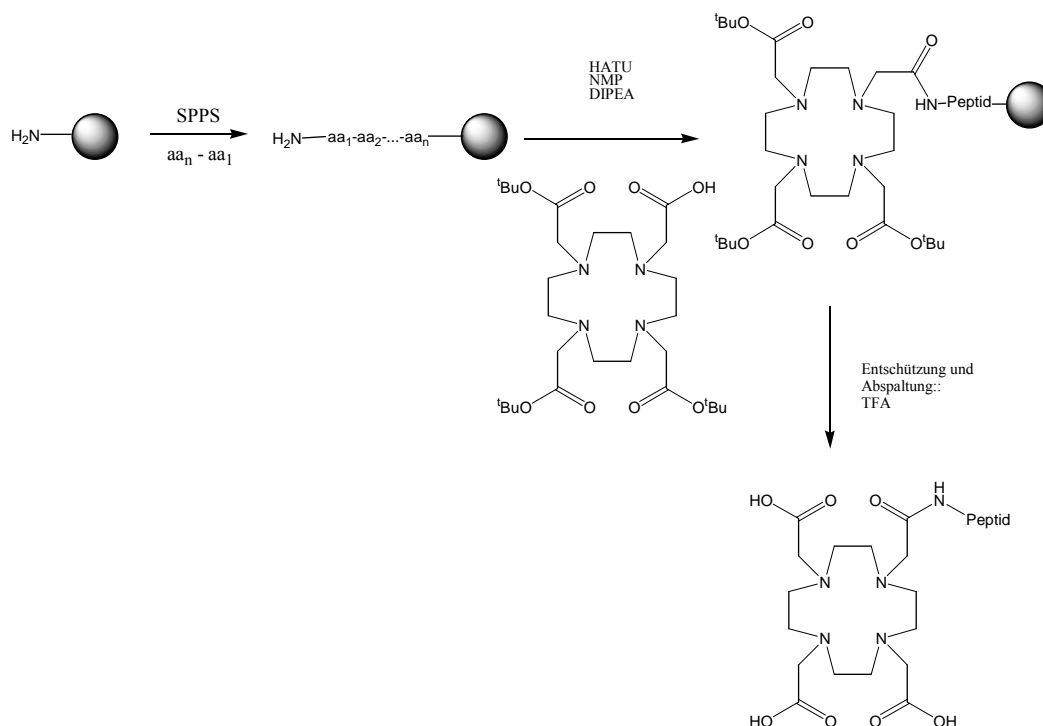
**Abbildung 7:** Synthese von DOTA(<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub>-OH zur Verwendung in der Festphasensynthese von Peptiden.



Durch Abspaltung von der Festphase und Entschützung der Seitenkettenschutzgruppen des Peptids und der Schutzgruppen des Chelators erhält man das gewünschte Chelator-Peptid-Konjugat (**Abbildung 8**). Die Anwendung dieser Technik erlaubt es, alle Vorteile der Festphasenpeptidsynthese (Solid Phase Peptide Synthesis, SPPS) zu nutzen, wie die Automatisierbarkeit der Syntheseschritte, die einfache Entfernung der einzelnen Reaktanden durch Spülen des an der Festphase gebundenen Produktes, hohe Reinheit und Uniformität des Rohproduktes auf Grund von kontrollierbaren und nach Bedarf wiederholbaren Einzelschritten. All diese Vorteile führen zu einer stetig wachsenden Beliebtheit dieser Technik.

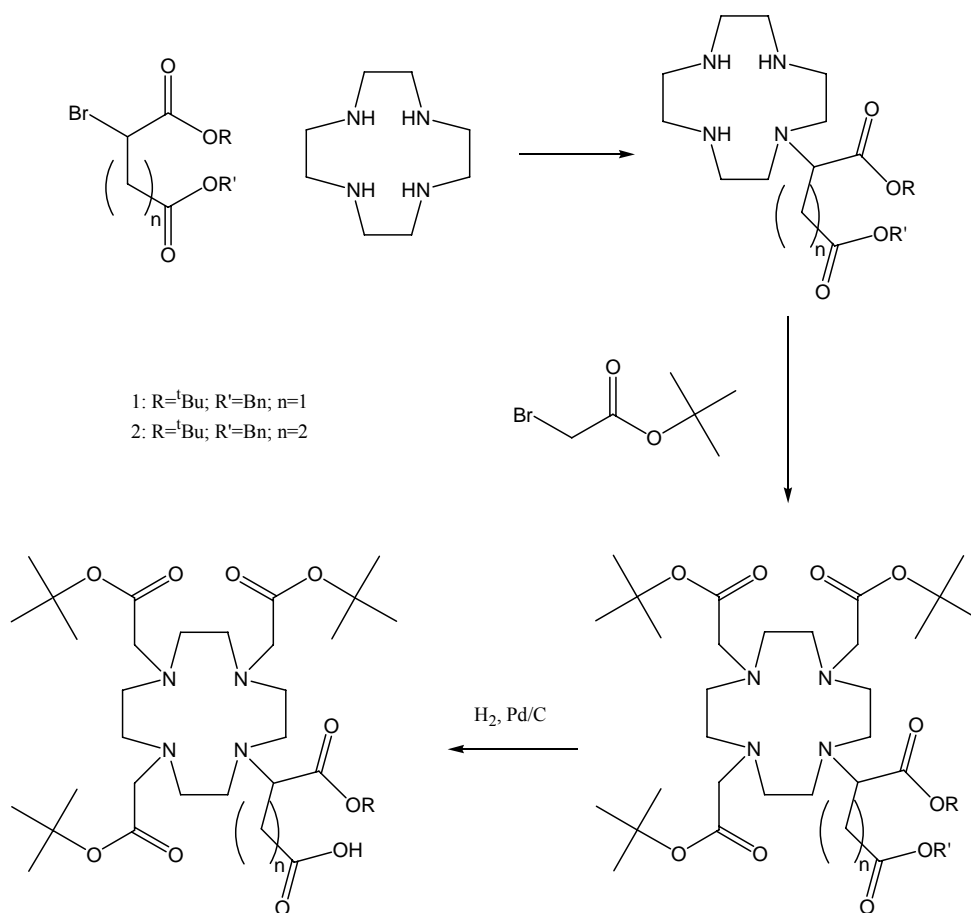


**Abbildung 8:** Festphasensynthese von Chelator-Peptid-Konjugaten unter Verwendung eines Synthons



Die direkte Verknüpfung einer Carboxylgruppe von DOTA an ein Biomolekül hat den Nachteil, dass dadurch diese Carboxylgruppe nicht mehr für die Komplexierung des Metalls zur Verfügung steht. Die entstehende „freie“ Koordinationsstelle des Metalls wird durch das Carbonyl-Sauerstoffatom aufgefüllt, welches an der peptidischen Bindung zum Biomolekül beteiligt ist (15). Dieser Nachteil in der Verwendung von DOTA als BFC wurde deshalb durch die Einführung einer zusätzlichen funktionellen Gruppe ausgeglichen, welche nun die Bindung zum Peptid ausbilden kann (50). Auch für diesen Chelator wurde durch Anwendung orthogonaler Schutzgruppentechnik ein geschütztes Synthon entwickelt, welches dann in der Festphasensynthese angewandt werden kann (51) (Abbildung 9).

**Abbildung 9:** Synthese des Prochelators eines erweiterten Analogons von DOTA



n = 1: DOTAGA(<sup>t</sup>Bu)<sub>4</sub>-OH; n = 2: DOTASA(<sup>t</sup>Bu)<sub>4</sub>; *aus* (50)

Analog zu DOTA wurden auch für andere Ringgrößen Chelatoren und Synthons entwickelt, welche in der SPPS verwendet werden können und sich durch eine zusätzliche Bindungsstelle für die Knüpfung an ein Biomolekül auszeichnen (27, 51, 52).

## **1.3 Substanz P-basierende Radiopharmazeutika**

### **1.3.1 Maligne Hirntumore**

Die Weltgesundheitsorganisation WHO teilt die primären Hirntumore des Typus Glioma in 4 verschiedene Klassen ein (53). Dabei wird die histologische Differenzierung, der Grad der Tumordinfiltration in umliegendes, gesundes Gewebe sowie verschiedene Wachstumsfaktoren berücksichtigt. All diese Faktoren haben schliesslich einen Einfluss auf die durchschnittliche Überlebenszeit der betroffenen Patienten. Die American Cancer Society schätzt, dass alleine in den USA ungefähr 13'000 Patienten pro Jahr an einem primären Hirntumor sterben. Die Überlebenszeit kann dabei zwischen gegen 10 Jahren für die niedriggradigen Oligodendroglioma (WHO Grad II) und 10 – 14 Monaten für die hochgradigen Glioblastoma multiforme (GBM, WHO Grad IV) liegen (54). Selbst durch Anwendung einer ausgedehnten therapeutischen Behandlung mit Chemotherapie, Radiotherapie und operativem Eingriff erreichen GBM Patienten nur eine durchschnittliche Überlebenszeit von unter 16 Monaten (55, 56). Die Zweijahresüberlebensrate wird mit unter 10 % aller GBM Patienten angegeben (57).

Vor ein paar Jahren wurde entdeckt, dass gerade Zellen von hochgradigen Hirntumoren Rezeptoren des Typs Neurokinin-1 (NK-1) überexprimieren (58). Niedriggradige Hirntumoren (WHO Grad II und Grad III) hingegen weisen oft eine hohe Anzahl an Somatostatinrezeptoren auf. Bei niedriggradigen Hirntumoren wie zum Beispiel den Astrozytomen zeigte deshalb ein therapeutischer Ansatz mit radioaktiv markiertem DOTATOC, welches die Somatostatinrezeptoren angreift, viel versprechende Resultate (59, 60).

---

Bei hochgradigen Hirntumoren (GBM) sind Somatostatinrezeptoren aber ein weniger geeignetes Ziel als die NK-1 Rezeptoren, da die NK-1 Rezeptoren dort mit einer grösseren Häufigkeit überexprimiert sind (**Tabelle 7**).

Nebst den hochgradigen Glioblastoma wurden NK-1 Rezeptoren auch auf anderen Tumoren des zentralen Nervensystems nachgewiesen, so zum Beispiel auf so genannten primitiven neuroektodermalen Tumoren (PNET) und auch auf Ewing Knochensarkoma, einem Tumor, welcher häufig im Bereich der Tibia und des Femurs auftritt (61).

---

**Tabelle 7:** Rezeptor-exprimierung auf Hirntumoren

---

<b>Tumor</b>	<b>Anzahl Proben</b>	<b>NK-1 positive Tumorzellen</b>	<b>NK-1 positive Gefässe</b>	<b>SSTR positive Tumorzellen</b>
Glioblastoma	10	10 / 10 (100 %)	6 / 10 (60 %)	0 / 9 (0 %)
Astrozytoma	12	9 / 12 (75 %)	9 / 12 (75 %)	11 / 12 (92 %)

---

*Aus (58);* NK-1 = Neurokinin-1, SSTR = Somatostatin Rezeptoren

---

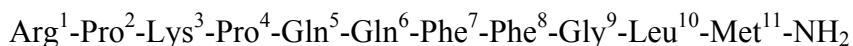
Das Peptid Substanz P ist der natürliche Ligand zum NK-1-Rezeptor. Es gehört zur Familie der Tachykinine, einer Familie von Gewebshormonen und Neuropeptiden, welche sich durch eine gemeinsame carboxyterminale Aminosäuresequenz Phe-X-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub> auszeichnet. Tachykinine haben eine rasche so genannte Kinin-Wirkung, das heisst sie stimulieren die glatte Muskulatur, senken den Blutdruck, fördern Speichel- und Tränenfluss etc.

---

---

**Abbildung 10:** Peptidsequenz von Substanz P

---



Das 11 Aminosäuren umfassende Peptid Substanz P (**Abbildung 10**) war das erste entdeckte Mitglied der Familie der Tachykinine (62) und wurde 1971 erstmals synthetisiert (63-65). Es spielt eine Rolle im zentralen Nervensystem als Neurotransmitter, im vaskulären System als vasodilative Substanz und erhöht überdies auch die vaskuläre Permeabilität (66, 67). Substanz P hat einen Effekt auf die Funktionen der Lunge, der Eingeweide und anderer Organe sowie auf die Regulation des Immunsystems (68, 69). Schliesslich wurde auch über einen stimulativen Effekt auf die Neovaskularisierung (Ausbildung von Blutgefässen) berichtet (70).

Die Überexprimierung des Substanz P-Rezeptors NK-1 auf GBM Zellen bietet nun ein Ziel für rezeptorgesteuerte Radiopharmazeutika.

### 1.3.2 NK-1-Rezeptor gesteuerte Radiopharmazeutika

Ein erstes NK-1-Rezeptor-bindendes Radiopharmazeutikum wurde durch Kopplung des azyklischen Chelators DTPA an die native Sequenz des Peptides Substanz P, und die anschliessende Markierung mit dem  $\gamma$ -Emitter  $^{111}\text{In}$  synthetisiert (71). Diese Substanz wurde zur szintigraphischen Visualisierung von NK-1 positivem Gewebe im Menschen eingesetzt (23). Dadurch wurde die Darstellung des Thymus (hinter dem Brustbein gelagerte Drüse des lymphatischen Systems) erreicht; aber auch Leber, Nieren, Milz und die Harnblase zeigten eine Anreicherung der applizierten Radioaktivität. Innerhalb 24 h wurden mehr als 95 % der applizierten Dosis über die Nieren ausgeschieden, über den Darm dagegen nur etwa 0.05 %

---

über einen Zeitraum von 60 h. Die verwendete Substanz selber wurde sehr rasch enzymatisch abgebaut, die Halbwertszeit des intakten Peptids im Blut lag bei nur etwa 4 min. Die Radioaktivität im Blutplasma wies eine kurze Halbwertszeit von nur 10 min auf, was sowohl auf rasche Ausscheidung wie auch auf rasche Bindung an den NK-1-Rezeptor zurückzuführen ist.

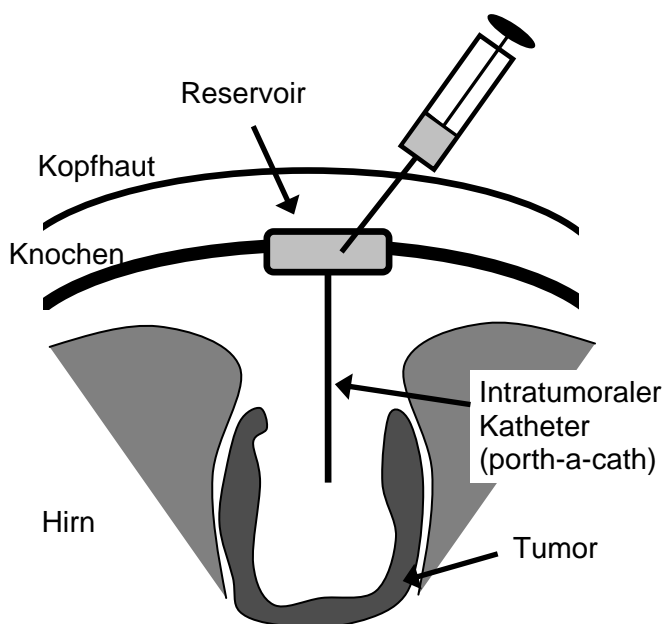
Während die schnelle und hohe Ausscheidung für eine szintigraphische Applikation noch tolerierbar ist, stellt sie für eine Applikation mit einem therapeutischen Radionuklid eine grosse Hürde dar, da dadurch eine zu grosse Strahlenbelastung von nicht-Ziel-Organen befürchtet werden muss, bzw. eine zu hohe Strahlendosis appliziert werden muss, um am Tumor noch eine wirksame Dosis anzubringen. Ausserdem ist die systemische Applikation des Radiopharmazeutikums für die Darstellung und Therapie von Hirntumoren auch deshalb nicht möglich, weil die Blut-Hirn-Schranke ein Vordringen des Radiopeptids bis ins Hirn nicht zulässt. Der verwendete azyklische Chelator schliesslich ist für eine Komplexierung mit therapeutischen Radiometallen wie  $^{90}\text{Y}$  ungeeignet, da der resultierende Komplex keine ausreichende Stabilität aufweist; makrozyklische Chelatoren sind hier zu bevorzugen (40).

In einem ersten therapeutischen Ansatz wurde deshalb in unserer Abteilung der makrozyklische Chelator DOTAGA (50) an die native Sequenz von Substanz P gebunden (72). Nach Markierung mit  $^{90}\text{Y}$  wurde dieses Radiopharmazeutikum dann lokal über einen sogenannten Porth-a-cath direkt in den Tumor bzw. in die nach operativer Entfernung des Tumors verbleibende Resektionshöhle appliziert (73-76). Die Therapie ist auch nach operativer Entfernung des Tumors nötig, weil bei der Operation nie die gesamte Tumormasse reseziert werden kann. Im Gegensatz zu anderen Tumoren, kann bei einem Hirntumor nicht ein zusätzlicher Saum an gesundem Gewebe rund um den Tumor mit entfernt werden. Somit verbleibt nach der Operation jeweils ein Randsaum an Tumorzellen im Patienten.

---

Durch die lokale Applikation des Radiopharmazeutikums konnte die Blut-Hirn-Schranke umgangen werden (**Abbildung 11**).

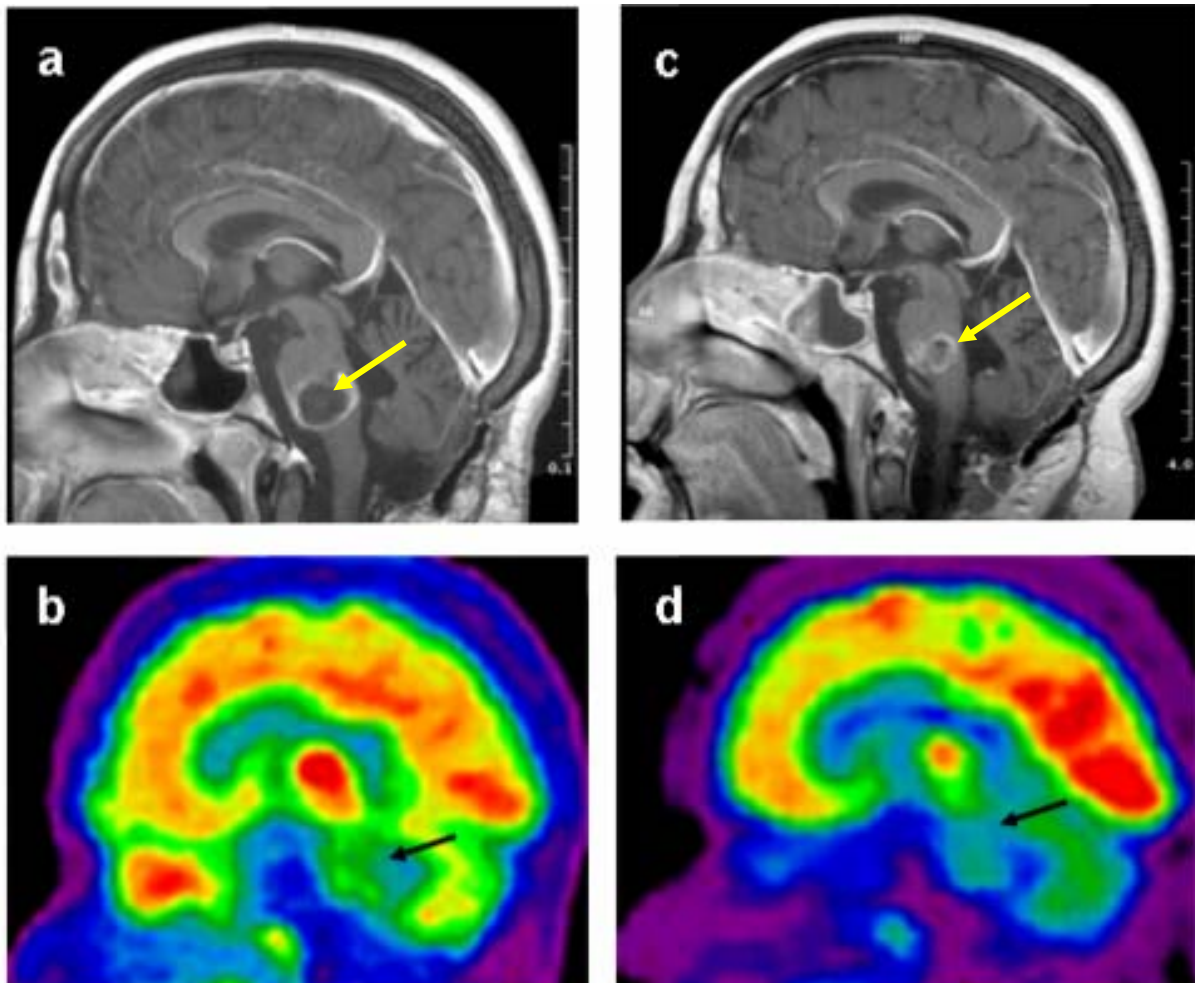
**Abbildung 11:** Schematische Darstellung der Applikation über einen intratumoralen Katheter



Die lokale Anwendung von DOTAGA-Substanz P führte im Patienten teilweise zu einer deutlichen Schrumpfung des Tumors. Als Beispiel sei hier eine Patientin aufgeführt, welche ein am Hirnstamm lokalisiertes GBM aufwies, welches mit 30 mCi (1110 MBq) [ $^{177}\text{Lu}$ -DOTAGA]-Substanz P behandelt wurde (77).

Auf Grund der heiklen Lokalisation musste auf eine operative Entfernung des Tumors verzichtet werden. Ebenfalls wurde nicht wie in den meisten anderen Fällen  $^{90}\text{Y}$  sondern  $^{177}\text{Lu}$  als Radiometall angewendet, da eine zu grosse Reichweite der Strahlung zu Schädigung von umgebendem, gesundem Gewebe hätte führen können. Trotz der im Vergleich zu anderen Fällen recht geringen applizierten Dosis konnte mit MRI und PET ( $^{19}\text{F}$ -FDG) drei Monate nach der Behandlung ein deutliches Schrumpfen des Tumors im Vergleich zur Situation vor der Behandlung nachgewiesen werden (**Abbildung 12**).

**Abbildung 12:** Therapie eines am Hirnstamm lokalisierten Glioblastoma multiforme mit [ $^{177}\text{Lu}$ -DOTAGA]-Substanz P



Aufnahme vor (**a** = MRI; **b** = PET (FDG)) und 3 Monate nach Applikation (**c** = MRI; **d** = PET (FDG)) des Radiopeptids



## 1.4 Gastrin-basierende Radiopharmazeutika

### 1.4.1 Medulläre Schilddrüsenkarzinome

Bei ungefähr 5 – 10 % aller auftretenden Schilddrüsenkrebsfälle handelt es sich um sogenannte medulläre Schilddrüsenkarzinome (medullary thyroid carcinoma, MTC) (78). Dies sind Karzinome, welche von den C-Zellen der Schilddrüse ausgehen (79). Patienten, welche an dieser Erkrankung leiden, haben eine statistische 10-Jahres-Überlebensrate von 71 %; meist tritt eine frühzeitige lymphogene aber auch hämatogene Metastasierung des Primärtumors als Komplikation auf (80).

Die medullären Schilddrüsenkarzinome sezernieren Calcitonin, insbesondere bei einer bereits vorliegenden Metastasierung. Calcitonin ist ein 32 Aminosäuren umfassendes Hormon, welches eine Senkung des Calcium- und Phosphatspiegels hervorruft und zusammen mit dem so genannten Parathormon den Calciumhaushalt im Menschen reguliert. Calcitonin wird als Tumormarker bei Verdacht auf ein medulläres Schilddrüsenkarzinom verwendet; ein erhöhter Calcitonin-Basalwert deutet auf das Vorhandensein dieser Erkrankung hin (81). Daneben wird auch durch Gabe von Pentagastrin, einem synthetischen Analogon des Peptids Gastrin, eine maximale Sekretion von Calcitonin stimuliert, wobei die dann bestimmte Calcitonin-Konzentration wiederum einen Hinweis auf eine pathologische Veränderung der Schilddrüse geben kann. Nuklearmedizinische diagnostische Verfahren wie die Octreotidszintigraphie werden teilweise zum Nachweis von Metastasen eines medullären Schilddrüsenkarzinoms eingesetzt, sind aber nicht sehr spezifisch und insbesondere zum Nachweis von Lebermetastasen wenig geeignet (82). Auch andere szintigraphische Methoden wie die  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA- oder MIBG-Szintigraphie liefern nur wenig befriedigende Resultate (83).

---

Medulläre Schilddrüsenkarzinome haben im Gegensatz zu anderen Schilddrüsentumoren die Eigenschaft, dass sie kein Jod aufnehmen, da sie nicht von den entsprechenden jodspeichernden Thyreozyten ausgehen. Dadurch ist aber auch keine erfolgsversprechende Anwendung der bei den anderen Schilddrüsenkarzinomen durchführbaren Radiojod-Therapie möglich. Der therapeutisch erfolgreichste Ansatz besteht in der operativen Entfernung des betroffenen Gewebes. Bei inoperablen Lokalrezidiven bleibt eine externe Bestrahlung als therapeutische Alternative (78).

Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass medulläre Schilddrüsenkarzinome eine erhöhte Anzahl an Gastrin-Rezeptoren (CCK<sub>2</sub>) exprimieren (84, 85). Diese Entdeckung hat den Weg für eine erfolgreiche Anwendung der rezeptorgesteuerten Radiopeptidtherapie geöffnet.

Cholecystokinin- (CCK) Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein gekoppelten, „seven-transmembrane-“ Rezeptoren und treten in zwei Subtypen (CCK<sub>1</sub> sowie CCK<sub>2</sub>) auf (86). Diese Subtypen werden auch als CCK-A- (CCK<sub>1</sub>) beziehungsweise CCK-B- (CCK<sub>2</sub>) Rezeptoren bezeichnet. Das Peptidhormon Gastrin (**Abbildung 13A**) weist eine geringe Affinität zum Rezeptorsubtyp CCK<sub>1</sub> auf, welcher in der Gallenblase, in der Pankreas, im peripheren Nervensystem und im Gastrointestinaltrakt auftritt. Dagegen ist die Affinität von Gastrin zum Rezeptorsubtyp CCK<sub>2</sub> hoch, wobei dieser Rezeptorsubtyp wiederum hauptsächlich im Gehirn und Magen exprimiert wird (14, 87, 88).

Bei einem pH-Anstieg im Magen auf einen Wert über 2.5 wird das Hormon Gastrin ausgeschüttet und regt die Salzsäureproduktion im Magen an. Auch die Sekretion der Galle und des Pankreas wird durch Gastrin angeregt. Somit hat dieses Hormon einen Einfluss auf das Hunger- und Sättigungsgefühl. Das Polypeptid Cholecystokinin (**Abbildung 13B**), welches die Sekretion von Pankreasenzymen hervorruft und die Kontraktion der Gallenblase

---

fördert, hat im Gegensatz zu Gastrin zum CCK<sub>1</sub>-Rezeptor eine deutlich ausgeprägtere Bindungsaffinität als zum CCK<sub>2</sub>-Rezeptor.

---

**Abbildung 13:** Peptidsequenzen der beiden Enzympeptide Gastrin (**A**) und Cholecystokinin (**B**)

---

- A**    Glu<sup>1</sup>-Gly<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Trp<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Glu<sup>6</sup>-Glu<sup>7</sup>-Glu<sup>8</sup>-Glu<sup>9</sup>-Glu<sup>10</sup>-Ala<sup>11</sup>-Tyr<sup>12</sup>-Gly<sup>13</sup>-Trp<sup>14</sup>-  
Met<sup>15</sup>-Asp<sup>16</sup>-Phe<sup>17</sup>-NH<sub>2</sub>
- B**    Lys<sup>1</sup>-Ala<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-Gly<sup>5</sup>-Arg<sup>6</sup>-Val<sup>7</sup>-Ser<sup>8</sup>-Met<sup>9</sup>-Ile<sup>10</sup>-Lys<sup>11</sup>-Asn<sup>12</sup>-Leu<sup>13</sup>-Gln<sup>14</sup>-  
Ser<sup>15</sup>-Leu<sup>16</sup>-Asp<sup>17</sup>-Pro<sup>18</sup>-Ser<sup>19</sup>-His<sup>20</sup>-Arg<sup>21</sup>-Ile<sup>22</sup>-Ser<sup>23</sup>-Asp<sup>24</sup>-Arg<sup>25</sup>-Asp<sup>26</sup>-  
Tyr<sup>27</sup>-Met<sup>28</sup>-Gly<sup>29</sup>-Trp<sup>30</sup>-Met<sup>31</sup>-Asp<sup>32</sup>-Phe<sup>33</sup>-NH<sub>2</sub>
- 

CCK<sub>2</sub>-Rezeptoren werden, wie bereits erwähnt, bei medullären Schilddrüsenkarzinomen überexprimiert, aber auch bei anderen Krebsarten wie kleinzelligem Lungenkrebs (small cell lung cancer, SCLC), gastrointestinalem Adenokarzinom und stromalen Ovarienkarzinom (85) (**Tabelle 4**). Des weiteren bestehen Anzeichen, dass CCK<sub>2</sub>-Rezeptoren bei entdifferenzierten neuroendokrinen Tumoren überexprimiert werden, wenn die Somatostatinrezeptoren des Subtypes 2 (sst2) herunterreguliert werden (89). Dies ist insbesondere interessant, weil gerade auf Grund des reduzierten Auftretens von sst2 die sonst im Falle der neuroendokrinen Tumore anwendbare Radiopeptidtherapie mit DOTATOC oder anderen Somatostatinanaloga nicht mehr möglich ist (41, 90). Der CCK<sub>2</sub>-Rezeptor stellt somit ein viel versprechendes Ziel für diagnostische und therapeutische Applikation von Gastrin-analoga dar (91-94).

---

### 1.4.2 CCK-Rezeptor gesteuerte Radiopharmazeutika

CCK-basierende Chelator-Peptid-Konjugate wurden sowohl mit den Chelatoren DTPA als auch mit DOTA entwickelt und haben viel versprechende in-vitro und in-vivo Resultate gezeigt (92, 95, 96). Leider zeigte aber die Anwendung der Substanz [ $^{111}\text{In}$ -DTPA]-[D-Asp<sup>26</sup>, Nle<sup>28,31</sup>]-CCK(26-33) in Patienten mit medullären Schilddrüsenkarzinomen nicht die gleichen Erfolge, wahrscheinlich auf Grund ungenügender in-vivo Stabilität der Substanz (97). Andere Entwicklungen für die Anwendung von  $^{111}\text{In}$  basieren auf einer anderen Variation von CCK (96). Das dort entwickelte [ $^{111}\text{In}$ -DTPAGlu]-Gly-CCK(26-33) soll vor allem den Vorteil haben, dass durch die zusätzliche funktionelle Gruppe des Glu im Vergleich zu dem nicht modifizierten DTPA nun fünf Carboxylgruppen sowie drei Aminofunktionen für die koordinative Bindung von Radiometallen zur Verfügung stehen. Dies sollte zu einer erhöhten Komplexstabilität führen, was gerade bei der Komplexbildung des therapeutisch verwendbaren  $\beta^-$ -Emitter  $^{90}\text{Y}$  entscheidend ist.

Für die Anwendung von  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  wurden CCK-basierende Substanzen entwickelt, welche eine diagnostische Anwendung finden könnten (98). Die Kombination des verwendeten Chelators Hydrazinonicotinamid (HYNIC) mit dem in der Nuklearmedizin sehr weit verbreiteten  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  könnte, sofern sich die ermutigenden in-vitro Versuche auch im Patienten bestätigen lassen, zu einer grösseren Verbreitung einer entsprechenden Szintigraphie führen.

Auch auf der Basis des Peptides Gastrin wurden verschiedene Radiopharmazeutika entwickelt und getestet. Eine direkte Jodierung des in der Sequenz des Gastrins vorhandenen Tyrosins mit dem  $\beta^-$ -emittierenden  $^{131}\text{I}$  führte zu einer Substanz, welche im Tierversuch einen hemmenden Effekt auf das Tumorwachstum aufweist (91). Szintigraphisch wurde allerdings eine rasche Abnahme der Radioaktivität im Tumor festgestellt, wobei es sich dabei um ein bekanntes Phänomen handeln dürfte, bei dem ein durch die Zelle aufgenommenes

---

(internalisiertes) Peptid einem raschen lysosomalem Abbau unterliegt, gefolgt von rascher Auswaschung des in der Zelle akkumulierten radioaktiven Jods (99).

Minigastrin ist eine auf die Aminosäuren 5 bis 17 verkürzte Version von Gastrin. Für die Anwendung von  $^{99m}\text{Tc}$  wurden Tetraamin-Chelatoren an D-Glu<sup>1</sup>-Minigastrin gekoppelt (100). Diese Verbindungen haben nicht nur gute präklinische Resultate gezeigt, sondern es konnten in einem ersten Patienten mit metastasiertem medullären Schilddrüsenkarzinom auch alle bekannten Läsionen szintigraphisch dargestellt werden (**Abbildung 14**).

Eine zukünftige Entwicklung dieser Substanz könnte auf eine Komplexierung mit  $^{186}\text{Re}$  oder  $^{188}\text{Re}$  zielen; beides sind  $\beta^-$ -emittierende Radiometalle, wobei  $^{188}\text{Re}$  auch über einen  $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ -Generator verfügbar ist (101). Für weitere Anwendungen von  $^{99m}\text{Tc}$  mit Minigastrinen wurden entsprechende Derivate des Chelators HYNIC entwickelt (102, 103).

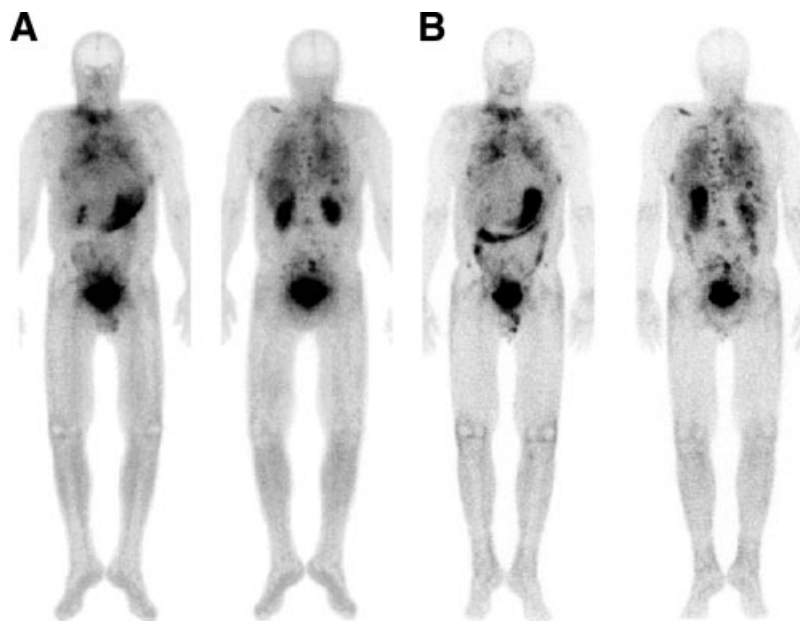
Auch DTPA- und DOTA-gekoppelte Minigastrine wurden sowohl für szintigraphische als auch für therapeutische Zwecke entwickelt (104-107). Dabei ist wiederum zu beachten, dass DTPA mono-amid zwar mit  $^{111}\text{In}$  stabile Komplexe bildet, welche für Szintigraphien durchaus geeignet sind. Andererseits ist aber der Komplex mit dem häufig verwendeten und hochenergetischen  $\beta^-$ -Emitter  $^{90}\text{Y}$  nicht genug stabil für eine sichere therapeutische Anwendung (40).

---

---

**Abbildung 14:** Ganzkörperszintigraphien eines Patienten mit metastasierendem MTC 90 min (A) und 240 min (B) nach Applikation von [ $^{99m}\text{Tc}$ -N,N',N'',N'''-tetra-(tert-butoxycarbonyl)-6-carboxy-1,4,8,11-tetraazaundecan]-D-Glu<sup>1</sup>-minigastrin (= [ $^{99m}\text{Tc}$ ]-Demogastrin 2).

---



---

*Abbildung aus (100)*

---

Die D-Glu<sup>0</sup>-modifizierte Variante des Chelators DTPA schliesslich weist zwar eine erhöhte Komplexstabilität auf, worauf eine geringere Transchelierung auf Serumproteine und ein verbessertes Tumor-zu-Hintergrund-Verhältnis resultieren. Der dort postulierte Mechanismus der Retention von dekomplexiertem  $^{111}\text{In}$  durch die negative Ladung des Glu, gefolgt von augenblicklicher Rekompexierung, ist aber noch nicht restlos geklärt. Die bei dieser Substanz auftretende hohe Aufnahme der applizierten Radioaktivität in den Nieren limitiert auch eine therapeutische Anwendung, da dadurch nierentoxische Effekte auftreten könnten (105).

---

## 1.5 Radioaktive Markierungen

### 1.5.1 Markierungen von makrozyklischen Chelatoren

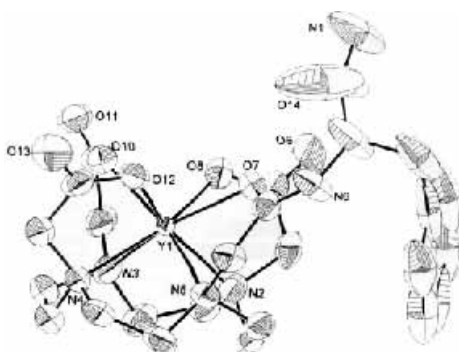
Die meisten interessanten Radiometalle wie zum Beispiel Lanthaniden,  $^{90}\text{Y}^{3+}$  oder  $^{111}\text{In}^{3+}$  sind harte Lewisäuren und bevorzugen dem HSAB (hard and soft acids and bases) Konzept entsprechend auch harte Lewisbasen als Liganden (108). Amine und  $\text{COO}^-$  stellen also ideale Lewisbasen für diese Metalle dar. Die hauptsächliche Oxidationsstufe der Metalle ist +III. Um stabile in-vivo Komplexe zu erhalten, werden makrozyklische Chelatoren verwendet; vor allem DOTA und Modifikationen davon werden sehr häufig in Radiopharmazeutika eingesetzt.

Sowohl Komplexe mit  $\text{In}^{3+}$  als auch mit  $\text{Y}^{3+}$ , zum Beispiel in dem Chelator DOTA-DPhe-NH<sub>2</sub> (**Abbildung 15**) oder auch im Komplex  $\text{Na}[\text{Y}(\text{DOTA})(\text{H}_2\text{O})]$ , weisen eine Koordinationszahl von 8 auf (15, 39, 109, 110). DOTA bildet stabile Komplexe mit einer grossen Zahl unterschiedlicher Metallionen (111-113).

---

**Abbildung 15:** Röntgenstruktur von Y-DOTA-DPhe-NH<sub>2</sub>

---



---

Aus (15)

---

Die Komplexierung von Radiometallen mit den makrozyklischen Chelatoren muss möglichst rasch und einfach ablaufen; einerseits weil die Radiometalle selber eine begrenzte Halbwertszeit besitzen, andererseits muss auch aus strahlenschutztechnischen Gründen die Komplexierung rasch sein, um eine möglichst kurze Expositionszeit des Laborpersonals zu gewährleisten (114). Aus diesem Grunde wurden schon verschiedene Arbeiten publiziert, welche sich mit dem Mechanismus und der Bildungskinetik von Komplexen zwischen makrozyklischen Chelatoren und relevanten Metallionen beschäftigen (47, 113, 115-119).

Der Mechanismus der Komplexbildung zwischen einem Metall und DOTA scheint ein zweistufiger Prozess zu sein. In einem ersten Schritt bildet sich ein Zwischenprodukt, welches relativ langsam zum endgültigen, vollständig koordinierten Komplex umgesetzt wird (120).

Es werden zwei verschiedene Mechanismen vorgeschlagen, wobei noch nicht bekannt ist, welcher dieser beiden Mechanismen tatsächlich stattfindet.

Bei dem ersten vorgeschlagenen Mechanismus bildet sich aus dem zweifach protonierten Chelator  $\text{H}_2(\text{DOTA})^{2-}$  und dem Metall rasch das Zwischenprodukt  $\text{MH}_2(\text{DOTA})^+$ . Bei diesem Komplex steht das Metall ausserhalb des Käfigs, welcher durch den makrozyklischen Ring und die 4 Carboxylat-Arme von DOTA gebildet wird, und ist schliesslich über Carboxylat-Sauerstoffe koordinativ gebunden (114, 118). Dieses Zwischenprodukt soll im Gleichgewicht zu  $\text{MH}(\text{DOTA})$  stehen, welches, in einem reaktionsgeschwindigkeitsbestimmenden Schritt, wiederum deprotoniert wird, und bei welchem dann gleichzeitig das Metall in das Innere des durch den Chelator gebildeten Käfigs gelangt. So wird schliesslich die maximale Koordinationszahl erreicht.

---



---

Bei dem zweiten vorgeschlagenen Mechanismus wird von der einfach protonierten Form von DOTA, also  $\text{H(DOTA)}^{3-}$ , ausgegangen, welche die reaktivere Form als das zweifach protonierte Analogon zu sein scheint (*120, 121*). Diese reaktive Form von DOTA geht rasch in den Komplex  $\text{MH(DOTA)}$  über. Dieses Zwischenprodukt  $\text{MH(DOTA)}$  verfügt nebst den Bindungen des Metalls zu den Carboxylat-Sauerstoffen auch über eine koordinative Bindung zwischen dem Metall und einem Stickstoff des Makrozyklus. Nach einer Deprotonierung und Umformung entsteht schliesslich der Komplex, in welchem sich das Metall im Innern des Käfigs befindet, nun durch die makrozyklischen Amine sowie die Carboxylat-Sauerstoffe komplexiert. Diese Umwandlung scheint der geschwindigkeitsbestimmende Schritt zu sein, wobei der Mechanismus der Umwandlung des Zwischenproduktes  $\text{MH(DOTA)}$  in den finalen Komplex  $\text{M(DOTA)}^-$  wiederum noch nicht restlos geklärt ist.

Die stabilste Konformation von  $\text{MH(DOTA)}$  ist jene, bei welchem das Stickstoff-gebundene Proton auf der Innenseite des DOTA-Käfigs steht. Somit ist es aber nicht für im Lösungsmittel vorhandene Basen zugänglich. Eine Inversion des quaternären (protonierten) Amins wäre eine Möglichkeit, um das Proton auf die Aussenseite des Käfigs zu bringen, allerdings ist die Inversionsbarriere dazu sehr gross (*122*). Ein alternativer Weg schlägt vor, dass das Proton zuerst auf eine Carboxylat-Funktion des Chelators übergeht und erst so das Zwischenprodukt deprotoniert werden kann (*114*). Gleichzeitig zu dieser Deprotonierung wird das Metallion in das Innere des Chelators vordringen.

Die gesamte Komplexbildung ist stark pH-abhängig, wobei ein höherer pH zu einer rascheren Komplexbildung führt (*113*). Dies wird so interpretiert, dass die Deprotonierung des Zwischenproduktes durch  $\text{OH}^-$  beschleunigt wird. Der Kontrolle des pH-Wertes beim Einbau eines Radiometalls in einem makrozyklischen Chelator kommt entscheidende Bedeutung zu wenn es darum geht, möglichst rasch ein Produkt mit einer hohen radiochemischen Reinheit

---

---

zu erhalten (30). Für die Komplexierung von DOTATOC mit  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{90}\text{Y}$  und  $^{111}\text{In}$  wurde der ideale pH Bereich mit 4 - 5 beschrieben. Eine weitere Erhöhung des pH Werts bis über einen Wert von pH 6 erbringt nur noch geringe Erhöhungen der Reaktionsgeschwindigkeit, allerdings wird die Gefahr der Bildung von Hydrolyseprodukten des Metallions erhöht (123).

### 1.5.2 Bi-Generator

$^{213}\text{Bi}$  ist ein Radiometall, welches in einer Kaskade von  $\alpha$ - und  $\beta^-$ -Zerfällen zu  $^{209}\text{Bi}$  übergeht (**Abbildung 16**).  $^{209}\text{Bi}$  kann auf Grund seiner extrem langen Halbwertszeit von  $1.9 \cdot 10^{19}$  Jahren praktisch als stabil angesehen werden (124). Der energiereichste Zerfall in der Kaskade von  $^{213}\text{Bi}$  ist der  $\alpha$ -Zerfall des Tochternuklids  $^{213}\text{Po}$ , mit einer Energie von 8.38 MeV. Da dieser Zerfall eine sehr kurze Halbwertszeit von  $4.2 \mu\text{s}$  aufweist, folgt dieser dem vorgelagerten  $\beta^-$ -Zerfall von  $^{213}\text{Bi}$  praktisch augenblicklich.

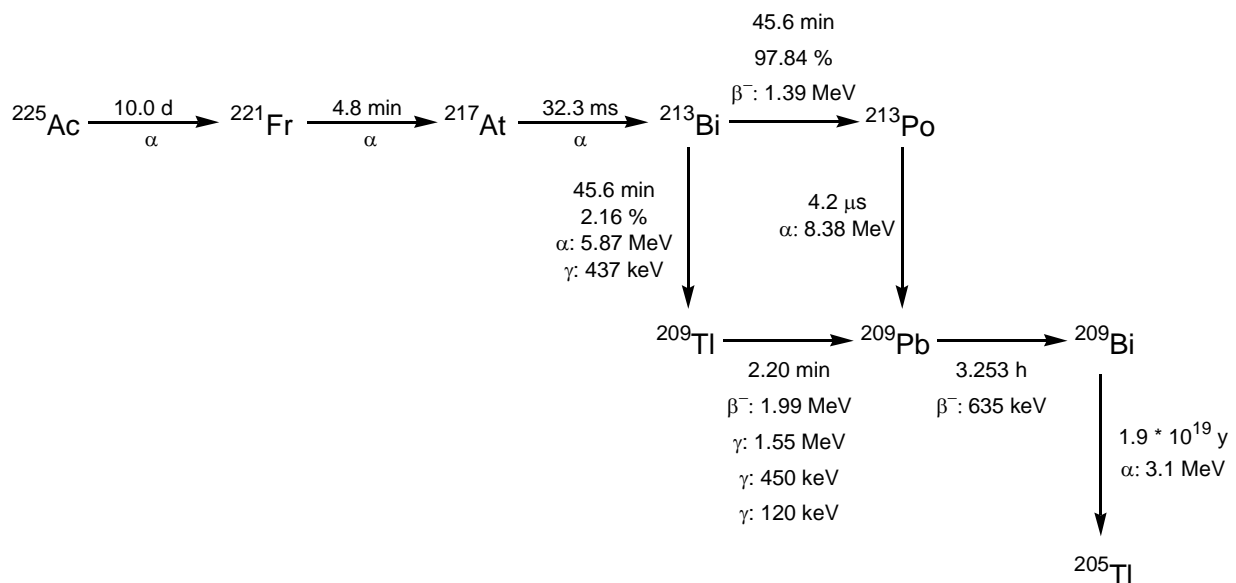
Die kurze Halbwertszeit von  $^{213}\text{Bi}$  (45.6 min) führt dazu, dass die Patienten nach einer Applikation mit diesem Radionuklid nur während einer kurzen Zeit radioaktive Strahlung aussenden und somit nur während dieser Zeit unter Einhaltung von strahlenschutztechnischen Anforderungen behandelt werden müssen. Die beim  $\alpha$ -Zerfall von  $^{213}\text{Bi}$  auftretende begleitende  $\gamma$ -Strahlung von 437 keV erlaubt eine szintigraphische Detektion des Radiopharmazeutikums.

$\alpha$ -Partikel haben einen sehr hohen linearen Energietransfer (LET) (ca.  $100 \text{ keV}/\mu\text{m}$ ), dies ist in etwa um den Faktor 100 höher als bei  $\beta^-$ -Zerfällen. Dieser hohe LET führt dazu, dass ein  $\alpha$ -Teilchen seine Energie innerhalb eines sehr kleinen Radius um den Ort des Zerfalls abgibt (ca.  $60 \mu\text{m}$ ). Wendet man solche  $\alpha$ -Zerfälle in der Nuklearmedizin an, so führt diese kurze Reichweite zu einer sehr lokalen Bestrahlung (**Tabelle 2**).

---

Die hohen Energien, welche durch  $\alpha$ -Partikel im Gewebe deponiert werden, führen zu hohen zytotoxischen Effekten, da Zellen nur begrenzte Kapazitäten zur Reparatur von DNS-Schäden haben. Daneben könnten auch apoptotische Mechanismen durch Alphastrahlung ausgelöst werden (125).

**Abbildung 16:** Zerfallsschema von  $^{225}\text{Ac}$



Nebst diesen vorteilhaften physikalischen Eigenschaften von  $^{213}\text{Bi}$  besteht ein grosser Vorteil in der Verfügbarkeit dieses Radiometalls. Ein  $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generator ermöglicht eine Verwendung im klinischen Routinebetrieb. Dabei kann  $^{225}\text{Ac}$  durch Bestrahlung von  $^{226}\text{Ra}$  in einem Zyklotron (126) oder aus dem Zerfall einer  $^{229}\text{Th}$ -Quelle (127) gewonnen werden.  $^{225}\text{Ac}$  wird dann auf einem Kationentauscher immobilisiert und kann so als Generator benutzt werden (128). Die Halbwertszeit von  $^{225}\text{Ac}$  liegt bei 10 Tagen, wodurch ein solcher Generator über mehrere Tage hinweg regelmässig eluiert werden kann. Er lädt sich dabei nach einer erfolgten Elution von  $^{213}\text{Bi}$  gemäss der Bateman-Gleichung (1) wieder auf.

$$A_{Bi-213} = \frac{\lambda_{Bi-213}}{\lambda_{Bi-213} - \lambda_{Ac-225}} * A_{Ac-225} * (e^{-\lambda_{Ac-225} * t} - e^{-\lambda_{Bi-213} * t}) \quad (1)$$

A = Aktivität

$\lambda$  = Zerfallskonstante

$$T = \frac{\ln 2}{\lambda} \quad (2)$$

T = Halbwertszeit

Die Zeit, welche benötigt wird, bis nach einer Elution wieder die maximale Aktivität an  $^{213}\text{Bi}$  auf dem Generator erreicht ist ( $t_{\max}$ ), kann mit Hilfe der Gleichungen (1) und (2) berechnet werden:

$$t_{\max} = \frac{1}{\ln 2} * \frac{T_{Ac-225} * T_{Bi-213}}{T_{Ac-225} - T_{Bi-213}} * \ln \left( \frac{T_{Ac-225}}{T_{Bi-213}} \right) \quad (3)$$

Einsetzen der Halbwertszeiten von  $^{225}\text{Ac}$  und  $^{213}\text{Bi}$  liefert als Resultat eine maximale Beladung des Generators nach 6.33 h. Praktischerweise kann man aber bereits nach ca. 3 h den Generator erneut eluieren, da der Generator dann bereits bis ca. 93 % wiederaufgeladen ist (**Tabelle 8**).

---

**Tabelle 8:** Kapazität des  $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generators in Abhängigkeit der Zeit seit der letzten Elution

---

<b>Zeit nach der letzten Elution (h)</b>	<b><math>^{213}\text{Bi}</math>-Aktivität (% der maximalen Aktivität)</b>
1	59.73
2	83.55
3	92.95
4	96.55
5	97.83
6	98.17

---

Der  $^{225}\text{Ac}$  Durchbruch, also der Anteil an  $^{225}\text{Ac}$  welcher bei einer Elution von  $^{213}\text{Bi}$  heruntergespült wird, bewegt sich mit 25 ppm bezogen auf die ursprüngliche  $^{225}\text{Ac}$  Aktivität des Generators in einem tiefen Bereich und konnte durch Anwendung einer Grössenausschlusschromatographie gar bis auf unter 1 ppm gebracht werden (129).

Die Vorteilhaften physikalischen Eigenschaften und die gute Verfügbarkeit haben dazu geführt, dass  $^{213}\text{Bi}$  für die Nuklearmedizin attraktiv geworden ist und in verschiedenen Radiopharmazeutika eingesetzt wurde (130-132). Ebenfalls bereits eingesetzt wurden Radiopharmazeutika, welche mit  $^{225}\text{Ac}$  markiert wurden und somit die selbe Zerfallsreihe zu nutzen versuchen (133, 134). Allerdings ist zu befürchten, dass dabei der erste energiereiche  $\alpha$ -Zerfall von  $^{225}\text{Ac}$  bereits zu einer Dekomplexierung führt, so dass die nachfolgenden Tochternuklide nicht mehr an das Vektormolekül resp. im Chelator gebunden sind (134). Die freien Radiometalle könnten an verschiedenen Organen im Körper akkumulieren und durch ihre radioaktive Strahlung zu unerwünschten Nebenwirkungen führen.

---

---

Für die Markierung von Antikörpern mit  $^{213}\text{Bi}$  wurden bis anhin meist Derivate mit DTPA-Analogen benutzt. Im Gegensatz dazu wurde  $^{225}\text{Ac}$  schon mit dem makrozyklischen Chelator DOTA eingesetzt, allerdings wurde dort ein „prelabeling approach“ gewählt, bei welchem DOTA-SCN zuerst markiert und erst anschliessend an einen Antikörper gebunden wurde (133). Gerade bei  $^{213}\text{Bi}$  mit seiner kurzen Halbwertszeit scheint dieser Ansatz aber ungeeignet, da diese Methode zu lange dauert und dadurch das Endprodukt an spezifischer Aktivität verlieren würde; ein „postlabeling approach“ ist zu bevorzugen. Die langsame Komplexbildungskinetik von makrozyklischen Chelatoren bei tiefen Temperaturen limitiert den Einsatz von DOTA und ähnlichen Chelatoren auf Peptide, da Antikörper höhere Temperaturen als  $37\text{ °C}$  nicht überstehen würden. Peptid-Chelator-Konjugate aber können auf Temperaturen bis  $100\text{ °C}$  gebracht werden, ohne dass sie dabei Schaden nehmen. Dadurch kann eine hohe Markierausbeute und eine hohe spezifische Aktivität erreicht werden.

### 1.5.3 Markierungen mit Mikrowellentechnik

Bei der Markierung von Radiopharmazeutika mit kurzlebigen Radionukliden ist ein rasches Markierprotokoll entscheidend. Der Zerfall des Radionuklids nach der Markierung führt einerseits zu einer Abnahme der spezifischen Aktivität des Radiopharmazeutikums, andererseits kann, insbesondere bei Radionukliden mit hohem LET, die Strahlung selbst auch das Radiopharmazeutikum beschädigen.

Die aktuellen Markierprotokolle im Universitätsspital Basel sehen zum Beispiel für die Markierung von DOTATOC mit  $^{90}\text{Y}$  eine 30-minütige Inkubation im Heizblock bei  $95\text{ °C}$ , gefolgt von einer Abkühlphase von 10 Minuten vor. Danach erst wird die Qualitätskontrolle mit HPLC und Festphasenextraktion durchgeführt. Alles in allem muss mit einem zeitlichen Aufwand von bis ca. 2 h gerechnet werden. Für die Markierung mit  $^{213}\text{Bi}$  (HWZ = 45.6 min)

---

---

oder  $^{68}\text{Ga}$  (HWZ = 68 min) bedeutet dies, dass deutlich über die Hälfte der Aktivität in dieser Zeit zerfallen würde.

Eine Markierung mit einem Mikrowellen-Gerät stellt hier ein attraktives Mittel zur Verkürzung des Zeitbedarfes dar. Für verschiedene Radionuklide wie  $^3\text{H}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$  wurde die Mikrowellentechnik bereits angewendet, wodurch nicht nur eine kürzere Reaktionszeit, sondern auch höhere Ausbeuten, weniger Nebenprodukte und bessere Reproduzierbarkeit erreicht wurden (135). Auch für eine Markierung von DOTATOC mit dem Positronen-Emitter  $^{68}\text{Ga}$  wurde Mikrowellentechnik angewendet, wobei hier ein Zeitbedarf von nur noch 10 – 12 min für den Markierprozess erzielt wurde, allerdings ohne die nötige Qualitätskontrolle einzubeziehen (136).

Mikrowellen sind elektromagnetische Wellen mit einer Frequenz zwischen 0.3 und 300 GHz. Wirkt dieses Mikrowellenfeld auf Materie, so wird Energie transferiert und zwar proportional zur elektrischen Leitfähigkeit und der Polarisierbarkeit der bestrahlten Probe. Somit muss aber bei einer chemischen Reaktion, welche unter Erhitzung mit Mikrowellen erfolgen soll, die Probe polar oder zumindest ionisch sein. Polarisierbare Moleküle können zuerst polarisiert werden und beginnen dann in dem elektrischen Feld zu rotieren. Die Rotation von Dipolen im Mikrowellenfeld erzeugt Wärme.

Während bei einem konventionellen Heizblock die Energie konduktiv durch das Reaktionsgefäß in das Lösungsmittel der Reaktion eingebracht werden muss, wirkt das Mikrowellenfeld augenblicklich und über das gesamte Volumen des Lösungsmittels. Dadurch wird eine deutlich raschere und homogenere Aufheizung erreicht.

---

## 2. Aufgabenstellung

Das für die therapeutische Anwendung entwickelte NK-1-Rezeptor-bindende Molekül DOTAGA-Substanz P wird in Blutserum rasch enzymatisch abgebaut. Geschieht dieser Abbau vor der Bindung an den NK-1 Rezeptor, so steht das daran gebundene Radionuklid nicht mehr für den gewünschten therapeutischen Effekt zur Verfügung und kann gar andere Organe bestrahlen. Daher sollen, ausgehend von der nativen Sequenz von Substanz P, verbesserte Variationen entwickelt werden, welche eine erhöhte metabolische Stabilität bei gleich bleibender Bindungsaffinität zum NK-1-Rezeptor aufweisen. Bei der Komplexierung von DOTAGA-Substanz P mit einem Radiometall wird aber auch das in der Peptidsequenz enthaltene Methionin oxidiert, was einen Einfluss auf die Bindungsaffinität des entsprechenden Produktes haben kann. Diese Oxidierung soll untersucht und nach Möglichkeit verhindert werden. Die Stabilisierung der Peptidsequenz kann durch Austausch einzelner Aminosäuren durch unnatürliche Aminosäuren erreicht werden. Neu entwickelte Derivate sollen mit Internalisierungsversuchen und Serumstabilitätstests evaluiert werden.

Die bisherigen Gastrin-Derivate weisen meist einen zu hohen Nierenuptake bzw. ein zu tiefes Tumor-zu-Nieren-Verhältnis auf. Die Niere wird dadurch zum dosislimitierenden Organ bei therapeutischen Anwendungen. Des Weiteren verwenden die meisten existierenden Gastrin-Derivate azyklische Chelatoren für die Komplexierung von Radiometallen. Diese erzielen gerade mit therapeutisch interessanten Metallen eine zu geringe in-vivo Stabilität. Verbesserte Konjugate, basierend auf dem Peptid Minigastrin, sollen deshalb an makrozyklische Chelatoren gekoppelt werden. Diese Konjugate sollen, nebst der durch makrozyklische Chelatoren erreichten verbesserten Stabilität des Metallkomplexes, einen tieferen Nierenuptake aufweisen, wodurch schliesslich das therapeutische Fenster erweitert werden kann. Die neuen Konjugate sollen in präklinischen Versuchen evaluiert werden.

---



Der Chelator DOTAGA weist gegenüber dem weit verbreiteten DOTA eine zusätzliche Carbonsäurefunktion für die Kopplung an ein Vektormolekül auf. Die Auswirkung dieser zusätzlichen Funktionalität auf die Komplexierungseigenschaften wurden bis anhin noch nicht untersucht. Man erhofft sich aber eine beschleunigte Komplexierung, wodurch wiederum raschere Reaktionen und weniger drastische Bedingungen bei der Komplexierung mit einem Radiometall erreicht werden. Es soll deshalb die Komplexierungskinetik von DOTAGA mit interessanten Metallen wie  $Y^{3+}$  und  $Lu^{3+}$  untersucht und mit DOTA verglichen werden. Diese Untersuchungen sollen unter Anwendung eines Modells für ein jeweiliges Chelator-Peptid Konjugat durchgeführt werden.

$^{213}Bi$  ist durch den  $^{225}Ac/^{213}Bi$ -Generator ein gut verfügbares und auf Grund seiner physikalischen Eigenschaften vorteilhaftes Radiometall für therapeutische Anwendungen in der Nuklearmedizin. Die bisherigen Protokolle für die Einführung in ein Chelator-Peptid-Konjugat sind allerdings zeitraubend, wodurch nur eine tiefe spezifische Aktivität für eine Applikation erreicht wird. Durch Anwendung von Mikrowellentechnik soll die Komplexierung beschleunigt werden. Dabei muss natürlich die erreichte radiochemische Reinheit gleich bleibend hoch sein wie bei den konventionellen Techniken, bei welchen ein Heizblock zur Anwendung kommt.

---

### 3. Experimenteller Teil

#### 3.1 Verwendete Chemikalien

Die kommerziell erhältlichen Chemikalien wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt. Allgemeine Verbrauchskemikalien wurden bei der Firma Fluka AG (Buchs, Schweiz) erworben, ausser die im Folgenden aufgelisteten: Lösungsmittel für die HPLC sowie für die Peptidsynthese wurden bei Acros Organics (Geel, Belgien) erworben, Aminosäuren genauso wie Rink-Amid MBHA Harz bei NovaBiochem (Läufelfingen, Schweiz). DOTA(<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub>-OH stammt von Macrocyclics (Dallas, USA), DTPA(<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub> von Mallinckrodt Medical (St. Louis, MO, USA), HATU von Applied Biosystems (Warrington, England). DTPA-Minigastrin 0 wurde von M. Béhé (Marburg, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

Zellkulturmedien (DMEM) und Zusätze (Gln, Antibiotika, FCS) stammen von Gibco BRL (Invitrogen, Basel, Schweiz) und Amimed BioConcept (Allschwil, Schweiz). Die AR4-2J Zelllinie wurde bei ECACC (Salisbury, England) gekauft, oder stand schon in unserem Labor zur Verfügung, während die Glioblastom Zelllinien vom Labor von Prof. Merlo (Universitätsspital Basel, Schweiz) zur Verfügung gestellt wurden.

<sup>111</sup>InCl<sub>3</sub> (trägerfrei) stammt von der Firma Mallinckrodt Medical Inc. (Petten, Holland), <sup>90</sup>YCl<sub>3</sub> von Perkin Elmer Life Sciences (Boston, USA), <sup>177</sup>LuCl<sub>3</sub> von NRG (Petten, Holland). Der <sup>225</sup>Ac/<sup>213</sup>Bi-Generator wurde vom Institut für Transuranium Elemente (Karlsruhe, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

---

## 3.2 Verwendete Geräte

*Festphasenextraktion:* Die SPE-Kartuschen (SepPak C<sub>18</sub>) wurden bei Waters (Rapperswil, Schweiz) erworben.

*Dünnschichtchromatographie:* Kieselgel 60 F-254 beschichtete Glasplatten der Firma Merck (Dietikon, Schweiz).

*ITLC:* Whatman Nr. 3–streifen (Whatman Switzerland AG, Bottmingen, Schweiz) wurden entweder zerschnitten und im  $\gamma$ -counter vermessen oder auf Berthold LB2820-1 Automatic TLC-Linear Scanner (Software Berthold CHROMA) analysiert.

*Säulenchromatographie:* Kieselgel 60 der Firma Fluka (Buchs, Schweiz).

*Peptidsynthesizer:* Semiautomatischer Synthesizer der Firma Rink Combichem (Bubendorf, Schweiz).

*Rotationsverdampfer:* Büchi Rotavapor RE11 und RE124, angeschlossen an ein Büchi Vacuum System B-179 (Flawil, Schweiz).

*Zentrifugal-Verdampfer:* Jouan RC10-22 der Firma Instrumente Gesellschaft (Zürich, Schweiz).

*Lyophilisator:* Christ Alpha Lyophilisator (BioBlock, Illkirch, Frankreich).

*UV/Vis-Spektroskopie:* Lambda 2 UV/Vis-Spektrophotometer von Perkin Elmer (Rodgau-Jüdesheim, Deutschland).

*HPLC:* Analytisches System: Quatenäre Pumpe und Dioden Array der Hewlett Packard 1050 Series mit und einem Durchfluss- $\gamma$ -Detektor LB506 von Berthold (Bad Wildbad, Deutschland). Analytisches und präparatives System: Bischoff 2250 Pumpensystem mit LC-CaDI 22-14 Interface und Lambda 1010 UV-Detektor (Metrohm AG, Herisau, Schweiz) sowie Durchfluss Detektor LB509 von Berthold (Bad Wildbad, Deutschland).

---

---

*HPLC-Säulen:*

Analytische Säulen:

**S1:** Macherey Nagel CC250/4 Nucleosil 120 – 3 C<sub>18</sub>, 4 \* 250 mm

**S2:** Interchrom UP5ODB\*25QS Uptisphere 4 \* 250 mm

**S3:** Agilent Zorbax Rapid Resolution Eclipse XDB C18 1.8 µm, 2.1 \* 50 mm

Präparative Säulen:

**S4:** Macherey Nagel VP250/21 Nucleosil 100-5 C<sub>18</sub>, 21\*250mm

**S5:** Interchrom UP5ODB/25DEP 10041 Uptisphere, 21\*250mm

*Mikrowellengerät:* INITIATOR der Firma Biotage AB (Uppsala, Schweden).

*ESI-MS:* Waters ZMD der Firma Micromass (Manchester, Grossbritannien) mit einem HP1100 Quatenären Pumpensystem bei Novartis (Basel, Schweiz).

*MALDI-TOF-MS:* Voyager sSTR ausgestattet mit einem Nd:YAG Laser (355 nm) der Firma Applied BioSystems (Framingham, MA, USA) bei Novartis (Basel, Schweiz).

*<sup>1</sup>H-/<sup>13</sup>C-NMR:* Bruker Spektrometer (360/99 MHz) und Varian VXR 400 (400/101 MHz) Spektrometer in der Firma Novartis (Basel, Schweiz).

*Quantitativer γ-counter:* NaI(Tl)-Bohrlochcounter COBRA II, D 5003 γ-system well counter (Canberra Packard, Melbourne, Australien).

*Quantitativer β<sup>-</sup>-counter:* Szintillationszähler TRI CARB 1500 unter Verwendung von Szintillationslösung ULTIMA-GOLD (Packard, USA).

*SPECT/CT:* Symbia T2 SPECT/CT Kamera (Siemens, München, Deutschland).

---

---

### 3.2.1 HPLC-Gradientensysteme

Eluenten: A = Acetonitril; B = 0.1 % TFA in Wasser

Analytische Gradienten:

**G1:** Fluss 0.75 ml / min; 0 min – 95 % B, 5 min – 95 % B, 10 min – 0 % B, 15 min – 0 % B, 20 min – 95 % B;  $\lambda = 214 \text{ nm} / 254 \text{ nm}$ .

**G2:** Fluss 0.75 ml / min; 0 min – 95 % B, 30 min – 45 % B, 32 min – 0 % B, 34 min – 0 % B, 37 min – 95 % B;  $\lambda = 214 \text{ nm} / 254 \text{ nm}$ .

**G3:** Fluss 0.4 ml / min; 0 min – 95 % B, 1 min – 95 % B, 1.5 min – 0 % B, 5.5 min – 0 % B, 6 min – 95 % B.

**G4:** Fluss 0.75 ml / min; 0 min – 95 % B, 10 min – 40 % B, 25 min – 40 % B, 30 min – 95 % B.

**G5:** Fluss 0.75 ml / min; 0 min – 95 % B, 5 min – 95 % B, 20 min – 0 % B, 22 min – 95 % B, 25 min – 95 % B.

Präparative Gradienten:

**G6:** Fluss 15 ml / min; 0 min – 90 % B, 25 min – 45 % B, 26 min – 0 % B, 28 min – 0 % B, 30 min – 90 % B;  $\lambda = 214 \text{ nm} / 254 \text{ nm}$ .

---

---

### 3.3 Allgemeine Arbeitsvorschriften

#### AAV 1: Festphasen-Peptidsynthese

Die Peptide werden nach Fmoc-Schutzgruppenstrategie (137) synthetisiert nach Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS). Dazu wird das Harz (0.5 – 2 g) im Reaktionsgefäß des Peptidsynthesizers vorgelegt. Für die Synthese von Peptiden, welche eine carboxyterminale Amidfunktion aufweisen, wird Rink-Amid MBHA Harz mit einer Beladungsdichte von 0.6 mmol/g verwendet. Im Peptidsynthesizer wird das aufgeführte Synthesizerprogramm angewendet (**Tabelle 9**). Zur Quantifizierung der jeweils abgespaltenen Fmoc-Schutzgruppen werden die Lösungen aus Schritt 2 und 3 gesammelt und die Absorption der entsprechenden Lösungen bei einer Wellenlänge von 300 nm bestimmt. Mit Hilfe des bekannten Extinktionskoeffizienten von Dibenzofulven ( $\epsilon_{300\text{nm}} = 7800 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ), dem Produkt der abgespaltenen Schutzgruppe, kann so die Konzentration mittels Beer-Lambert Gesetz berechnet werden. Falls der errechnete Wert tiefer als der erwartete Wert liegt, können die Abspaltungsschritte (Schritt 2 und 3 des Synthesizerprogramms) wiederholt werden.

Die Fmoc-geschützte Aminosäure (3 Äquivalent bezogen auf die vom Harz abgespaltenen Fmoc-Schutzgruppen) wird zusammen mit 3.3 Äquivalenten HOBt und 3.3 Äquivalenten DIC in NMP gelöst und 20 min inkubiert. Bei Schritt 6 des Synthesizerprogramms wird diese Lösung der Festphase beigelegt und durch Zugabe von 8 Äquivalenten DIPEA der pH auf einen Wert von ca. 8 eingestellt. Zur Kontrolle der Kopplung der Aminosäuren wird nach erfolgter Reaktion ein Kaisertest durchgeführt (**AAV 2**). Bei erfolgreicher Kopplung sollen keine freien primären Aminofunktionen mehr nachweisbar sein. Andernfalls kann die Aminosäurekopplung wiederholt werden.

---

**Tabelle 9:** Peptidsynthesizerprogramm

Schritt	Reagenzien	Wiederholungen	Zeit
1	DMF	2	1 min
2 <sup>†</sup>	20% Piperidin in DMF	4	2 min
3 <sup>†</sup>	DMF	2	0.5 min
4	Isopropanol	2	0.5 min
5	NMP	3	0.5 min
6	Aminosäure	1	45 min
7	DMF	2	0.5 min
8	Isopropanol	2	0.5 min

<sup>†</sup> = Lösungen werden gesammelt zur spektrophotometrischen Bestimmung der abgespaltenen Fmoc-Schutzgruppen

Wurde das Harz bei Synthesebeginn trocken angesetzt oder über Nacht trocken gelagert, so wird der erste Schritt des Synthesizerprogramms auf 10 min verlängert, so dass das Harz gut aufquellen kann.

## AAV 2: Kaisertest

Folgende zwei Lösungen werden zubereitet:

A: 0.5 g Ninhydrin in 10 ml Ethanol

B: 1 ml 0.01 M wässrige KCN-Lösung und 49 ml Pyridin zu einer Lösung aus 20 g Phenol in 5 ml Ethanol begeben

---

Von der Festphase, auf welcher das Peptid aufgebaut wird, werden einige (ca. 20) Harzkügelchen entnommen und fünf Mal mit Ethanol gewaschen. Das Harz wird dann mit je 50 µl der Lösung A und der Lösung B versetzt und 10 min bei 95 °C inkubiert. Eine dann resultierende tiefblaue Färbung der Lösung sowie der Festphase weist auf eine Anwesenheit primärer Aminofunktionen hin ( $> 5 - 10 \mu\text{mol Amine} / \text{g Harz}$ ). Ist nur die Festphase schwach blau gefärbt, so sind noch ca.  $1 - 2 \mu\text{mol Amine} / \text{g Harz}$  vorhanden.

### **AAV 3: Kopplung eines Prochelators mit SPPS**

Zur Einbringung eines Chelators mit SPPS muss der entsprechende Chelator in einer geschützten Form vorliegen, also z.B. für DOTA als  $\text{DOTA}(\text{tBu})_3\text{-OH}$ , für DOTAGA als  $\text{DOTAGA}(\text{tBu})_4\text{-OH}$  etc. (50, 51).

2 Äquivalent dieses Prochelators werden zusammen mit 2.2 Äquivalenten HATU in NMP gelöst und 20 min inkubiert. Danach wird diese Lösung mit 5 Äquivalenten DIPEA auf einen pH Wert von ca. 8 gebracht und der Festphase beigelegt. Unter gelegentlichem Schütteln wird 5 h inkubiert, danach die Lösung entfernt und die Festphase noch drei Mal mit NMP gespült. Mit Hilfe des Kaisertests wird die Reaktion kontrolliert (AAV 2).

### **AAV 4: Abspaltung und Entschützung eines Peptids von der Festphase**

Die Abspaltung eines Peptids kann bei Verwendung von säurelabilen Seitenketten-Schutzgruppen wie  $\text{tBu}$  oder BOC in einem Schritt erfolgen. Dazu wird das Harz in einer Spritze mit eingebauter Fritte vorgelegt und mit 3 – 4 ml einer Lösung aus 91 % TFA, 3 %  $\text{H}_2\text{O}$ , 1 % TIS und 5 % Thioanisol für 3 h inkubiert. Die Abspatlösung wird gesammelt und mit 45 ml 50 % Diisopropylether, 50 % Petrolether versetzt. 20 min wird diese Lösung im

---



---

Kühlschrank gehalten, danach der gebildete Niederschlag zentrifugiert, der Überstand abdekantiert. Die Abspaltung von der Festphase wird noch zwei Mal für je eine Stunde wiederholt. Das erhaltene Rohprodukt wird über Nacht bei 100 mbar getrocknet und danach mit präparativer HPLC (**S4, S5, G6**) gereinigt.

#### **AAV 5: Komplexierungen mit (nicht-radioaktiven) Metallen**

Zur Komplexierung von Chelator-Peptid Konjugaten mit nicht-radioaktiven Metallen werden jeweils 1 – 5 µg (0.5 – 5 nmol) des entsprechenden Konjugats als wässrige Lösung mit 300 µl 0.5 M Natriumacetatpuffer (pH 5.0, 0.4 M) versetzt. Dazu werden 5 Äquivalente der wässrigen Metalllösungen (ca. 20 mM, Indium als  $\text{InCl}_3$ , Yttrium als  $\text{Y}(\text{NO}_3)_3$ , Lutetium als  $\text{LuCl}_3$ ) gegeben und die Ansätze jeweils 30 min bei 95 °C gehalten. Nach Abkühlen der Reaktionslösungen wird das Ganze auf eine vorkonditionierte SepPak C-18-Kartusche (konditioniert durch 10 ml Methanol gefolgt von 20 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ) aufgegeben. Das überschüssige Metallsalz wird mit 10 ml Natriumacetatpuffer eluiert, dann die Kartusche mit 5 ml Luft trocken geblasen. Schliesslich wird das Produkt mit 10 ml Methanol eluiert. Die Methanolfraktion wird zur Trockne eingengt und der Rückstand aus Wasser lyophilisiert. Die Produkte werden mit HPLC (**S1, S2, G2**) und Massenspektrometrie charakterisiert.

#### **AAV 6: Komplexierung mit Radiometallen für biologische Versuche**

5 µg (1 eq) des entsprechenden DOTA-Peptid-Konjugats (**AAV 4**) werden mit 300 µl Natriumacetatpuffer (0.4 M, pH 5.0) vorgelegt und mit 1 mCi (37 MBq)  $^{111}\text{InCl}_3$ -Lösung versetzt. Bei 95 °C wird während 30 min inkubiert, danach 10 min abgekühlt. Handelt es sich bei dem Chelator-Peptid-Konjugat um eine DTPA-tragende Substanz, so wird diese bei

---

---

Raumtemperatur statt bei 95 °C inkubiert. 5 µl der Markierlösung werden auf 50 µl Ca-DTPA (0.1 mM) gegeben und die radiochemische Reinheit mit HPLC (**S1**, **S2**, **G1**) bestimmt. Für Bioverteilungsstudien wird die Markierlösung mit physiologischer NaCl-Lösung (+1 % HSA) verdünnt.

Für Serumstabilitäts- und Internalisierungsexperimente werden DOTA-tragende Substanzen nun zusätzlich noch mit 5 eq.  $^{nat}\text{InCl}_3$ -Lösung versetzt und weitere 30 min bei 95 °C gehalten. Die Lösung wird dann auf eine vorkonditionierte SepPak-C<sub>18</sub> SPE-Kartusche (10 ml MeOH, 20 ml H<sub>2</sub>O) aufgetragen und mit 10 ml H<sub>2</sub>O überschüssige Metallsalze entfernt. Mit 10 ml MeOH wird das Radiopeptid eluiert und mit einem N<sub>2</sub>-Strom und Erwärmung durch einen Fön eingengt. In physiologischer NaCl-Lösung (+1 % HSA) wird das Produkt aufgenommen und auf das benötigte Volumen verdünnt.

#### **AAV 7: Konzentrationsbestimmung von nicht-UV-absorbierenden Chelator-Peptid-Konjugaten**

Um die Konzentrationsbestimmung einer Lösung eines Chelator-Peptid-Konjugats durchzuführen, welches keine lichtabsorbierenden Aminosäuren trägt, wird zuerst eine wässrige, ca. 100 µM Y(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-Lösung hergestellt. Diese Lösung wird unter Verwendung einer kommerziellen EDTA-Lösung titriert, um so die genaue Konzentration zu erhalten. Einem  $^{90}\text{Y}$ -Vorratsgefäß werden 20 µl entnommen und zu 500 µl der Y(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-Lösung gegeben. Mit Hilfe des mit dem  $^{90}\text{Y}$  gelieferten Kalibrierscheins kann die exakte Metallkonzentration berechnet werden, und mit dieser Angabe wiederum die exakte Metallkonzentration der hergestellten  $^{90}\text{Y}/^{nat}\text{Y}$ -Lösung.

Aus der zu bestimmenden Chelator-Peptid-Lösung werden ca. 10 nmol Substanz vorgelegt und mit 300 µl 0.4 M Natriumacetatpuffer pH 5 versetzt. 15 nmol der  $^{90}\text{Y}/^{nat}\text{Y}$ -Lösung werden beigefügt und das Ganze für 30 min bei 95 °C inkubiert. Nach Abkühlen werden der

---

---

Markierlösung 10 µl entnommen und auf 50 µl 0.1 mM Ca-DTPA-Lösung gegeben. Diese Lösung wird mit HPLC (**S1, S2, G1**) analysiert und die radiochemische Ausbeute bestimmt. Das Verhältnis von freiem zu substanzgebundenen Yttrium liefert uns unter Berücksichtigung der exakten Metallkonzentration der  $^{90}\text{Y}/^{\text{nat}}\text{Y}$ -Lösung die genaue, eingesetzte Substanzmenge des Chelator-Peptids und darüber wiederum die Konzentration der ursprünglich verwendeten Substanzlösung.

Die Konzentrationsangabe wird auch bei der Herstellung von Substanzaliquots definierter Substanzmengen verwendet, indem die entsprechenden Volumina in jeweilige Gefäße transferiert werden.

#### **AAV 8: Konzentrationsbestimmung von UV-absorbierenden Chelator-Peptid-Konjugaten**

Bei Peptiden, welche stark absorbierende Aminosäuren (Tyr, Trp) enthalten, wird die Konzentration über die Absorption der entsprechenden Lösung bestimmt (138, 139).

50 µl einer etwa 200 µM wässrigen Lösung der entsprechenden Substanz werden zu 500 µl 0.1 M Essigsäure gegeben und die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Mit Hilfe des Beer-Lambertschen Gesetzes (4) und unter Kenntnis des entsprechenden Molaren Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_{280}$  kann die Konzentration berechnet werden.

$$A = \epsilon * c * d \quad (4)$$

Für die Minigastrin-Derivate, welche als stark absorbierende Aminosäuren jeweils ein Tryptophan und ein Tyrosin aufweisen, kann der Extinktionskoeffizient durch Addition der entsprechenden einzelnen Extinktionen ermittelt werden (138). Die anderen Aminosäuren

---

sowie der Chelator haben dagegen einen geringen Einfluss auf den Extinktionskoeffizient des gesamten Moleküls. Der somit verwendete Extinktionskoeffizient für die synthetisierten Minigastrine beträgt  $\epsilon_{280} = 6'890 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

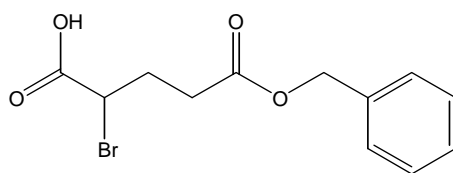
Aus den so konzentrationsbestimmten Lösungen werden Aliquots hergestellt und eingefroren, welche dann bei Bedarf für Komplezierungen mit Metallen zur Verfügung stehen.

### 3.4 Synthesen

#### 3.4.1 DOTAGA(<sup>t</sup>Bu)<sub>4</sub>-OH: 1-(1-carboxy-3-carbotertbutoxypropyl)-4,7,10-(carbotertbutoxymethyl)-1,4,7,10 -tetraazacyclododekan

Die Synthese des Prochelators DOTAGA(<sup>t</sup>Bu)<sub>4</sub>-OH ist ein mehrstufiger Prozess (50, 72) (**Abbildung 9**). Er wird im Folgenden beschrieben:

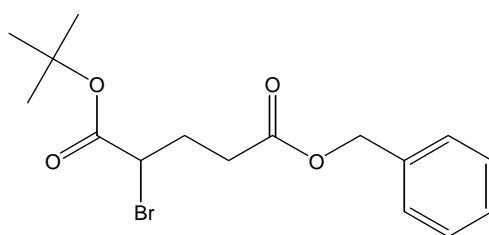
##### 3.4.1.1 2-Bromglutarsäure-5-benzylester



6 g (1 eq, 25.3 mmol) L-Glutarsäure-5-benzylester werden zusammen mit 9.1 g (3.5 eq, 88.5 mmol) NaBr in 60 ml H<sub>2</sub>O vorgelegt, auf 0 °C gekühlt und mit 5.7 ml (2 eq, 50.6 mmol) HBr versetzt. In kleinen Portionen werden danach insgesamt 3.5 g (2 eq, 50.6 mmol) NaNO<sub>2</sub> beigelegt. Für weitere 4 h wird bei 0 °C unter Rühren inkubiert. 2.25 mmol (40 mmol) konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> werden beigelegt, direkt gefolgt von 20 ml Diethylether. Die wässrige Phase wird

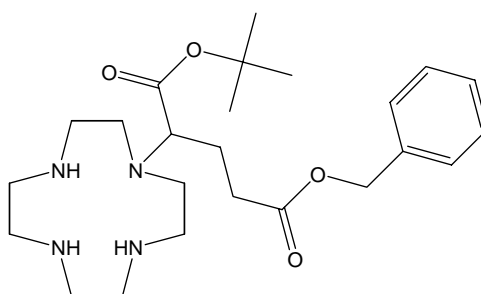
dann 4 Mal mit Diethylether extrahiert, die vereinigten organischen Phasen wiederum 3 Mal mit gesättigter NaCl(aq) gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und zur Trockne eingeengt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (SiO<sub>2</sub>, Hexan:Ethylester = 3:1). Es bleibt ein gelbliches Öl zurück (4.1 g, 54 %). R<sub>f</sub> = 0.4 (SiO<sub>2</sub>, DCM:EtOH = 7:3).

### 3.4.1.2 2-Bromglutarsäure-1-tertbutylester-5-benzylester



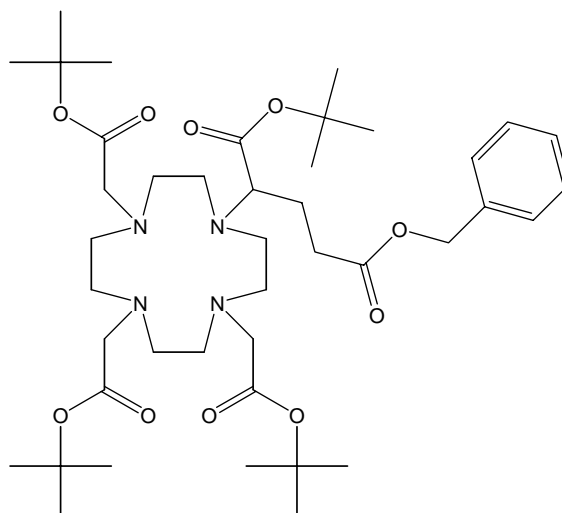
4 g (1 eq, 13.3 mmol) 2-Bromglutarsäure-5-benzylester in 30 ml DCM werden über 40 min insgesamt 6 ml (32.7 mmol) TBTA (tert-Butyltrichloroacetimidat) in 20 ml Cyclohexan beigelegt. Durch Zugabe von 2.5 ml Dimethylacetamid wird gebildeter Niederschlag wieder in Lösung gebracht. Danach werden 266 µl (20 µl/mmol) Bortrifluordiethyletherat beigelegt. Unter Rühren wird das Reaktionsgemisch für 3 d bei Raumtemperatur gehalten, danach bei 300 mbar und 50 °C DCM und Cyclohexan entfernt. Das restliche Lösungsmittel wird 3 Mal mit Hexan extrahiert, die organischen Phasen zur Trockne eingeengt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (SiO<sub>2</sub>, Hexan:Ethylacetat = 5:1). Ausbeute: 2.65 g (56 %). ESI-MS (-): 355.2 (100 %, [M - H]<sup>-</sup>); ESI-MS (+): 375.8 (40 %, [M + Na]<sup>+</sup>), 356.8 (25 %, [M + H]<sup>+</sup>), 300.8 (100 %, [M - <sup>t</sup>Bu + H]<sup>+</sup>); Reinheit (HPLC, **S1**, **G4**): 91.5 %.

**3.4.1.3 Monoalkylierung von Cyclen mit 2-Bromglutarsäure-1-tertbutylester-5-benzylester zu 1-(1-carbobenzyloxy-3-carbotertbutoxypropyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododekan**



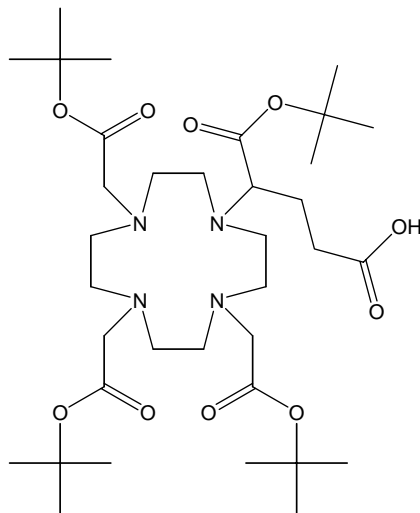
569 mg (1.2 eq, 3.3 mmol) Cyclen werden in 50 ml Chloroform gelöst und über einen Zeitraum von 90 min 983 mg (1 eq, 2.73 mmol) 2-Bromglutarsäure-1-tertbutyl-5-benzylester in 10 ml Chloroform zugefügt. Weitere 2.5 d wird bei Raumtemperatur gerührt, danach zur Trockne eingengt. Säulenchromatographisch wird das Rohprodukt gereinigt (SiO<sub>2</sub>, EtOH:NH<sub>3</sub> = 95:5). Es verbleiben 757 mg (61.3 %) leicht gelbliches Öl. R<sub>f</sub> = 0.85 (SiO<sub>2</sub>, EtOH:NH<sub>3</sub> = 95:5); ESI-MS (+): 449.0 (100 %, [M+H]<sup>+</sup>).

**3.4.1.4**     ***1-(1-carbobenzyloxy-3-carbotertbutoxypropyl)-4,7,10-***  
***(carbotertbutoxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododekan***



757 mg (1 eq, 1.69 mmol) 1-(1-carbobenzyloxy-3-carbotertbutoxypropyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododekan werden in 40 ml wasserfreiem ACN gelöst und mit 1.398 g (6 eq, 10.12 mmol)  $K_2CO_3$  versetzt. Die Suspension wird mit 723  $\mu$ l (2.9 eq, 4.89 mmol) Bromessigsäuretertbutylester versetzt und während 3 d kräftig gerührt. Danach wird die Suspension filtriert und zur Trockne eingengt. Mit einer Säulenchromatographie wird das Rohprodukt gereinigt ( $SiO_2$ , EtOH: $NH_3$  = 95:5). Ausbeute: 1.12 g (84.0 %) gelber Festkörper.  $R_f$  = 0.43 ( $SiO_2$ , EtOH: $NH_3$  = 95:5); ESI-MS (+): 813.8 (100 %,  $[M + Na]^+$ ).  $^1H$ -NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ,  $SiMe_4$ ):  $\delta$  = 7.35 (m, 5H, Ar); 5.05 (s, 2H,  $CH_2$ -Ph); 1.95 – 3.75 (m, 27H,  $CHN$ ,  $NCH_2$ ,  $CH_2COOBzl$ ,  $CHN-CH_2-CH_2$ ,  $CH_2COOC(CH_3)_3$ ); 1.45 (s, 36H,  $C(CH_3)_3$ );  $^{13}C$ -NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ ,  $SiMe_4$ ):  $\delta$  = 174.29 ( $\underline{C}OOBzl$ ); 172.57, 172.46, 172.36 ( $\underline{C}OOtBu$ ); 135.19 ( $CH_2\underline{C}$ (Ar)); 128.21, 128.00, 127.89, 127.77, 126.58 ( $\underline{C}$ (Ar)); 82.02, 81.43, 81.27 ( $\underline{C}$ ( $CH_3$ )<sub>3</sub>); 65.96 (O- $\underline{C}H_2$ -Ar); 59.52, 55.44, 55.35, 55.11, 52.23, 52.00, 48.23, 48.18, 47.79, 46.78, 43, 95 (13C,  $H\underline{C}NCH_2$ ,  $N\underline{C}H_2\underline{C}H_2N$ ,  $\underline{C}H_2COOtBu$ ,  $\underline{C}H_2COOBzl$ ); ( $NCH\underline{C}H_2CH_2$ ); 27.83, 27.70, 27.58, 27.44, 27.41, 27.30 ( $\underline{C}$ ( $CH_3$ )<sub>3</sub>).

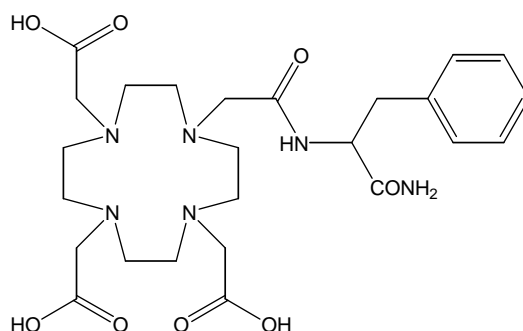
**3.4.1.5**     ***1-(1-carboxy-3-carbotertbutoxypropyl)-4,7,10-(carbotertbutoxymethyl)-1,4,7,10-tetraaza-cyclododecane (DOTAGA(<sup>t</sup>Bu)<sub>4</sub>-OH)***



70 mg Pd (10 % auf Aktivkohle) werden in 1 ml H<sub>2</sub>O aufgeschlämmt und zu 520 mg 1-(1-carbobenzyloxy-3-carbotertbutoxypropyl)-4,7,10-(carbotertbutoxymethyl)-1,4,7,10-tetraaza-cyclododekan gelöst in 40 ml MeOH gegeben. In einer H<sub>2</sub>-Atmosphäre wird über Nacht bei Normaldruck hydriert. Über Hyflo Super Gel wird die Suspension filtriert und zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (SiO<sub>2</sub>, EtOH:NH<sub>3</sub> = 95:5). Es verbleiben 158 g (34.3 %) des Prochelators. ESI-MS (+): 724.0 (100 %, [M + Na]<sup>+</sup>); <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, SiMe<sub>4</sub>): δ = 6.5 (br, 1H, COOH); 3.6-2.0 (m, 27H, CHN, NCH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>COOH, CHN-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>COOC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 1.45 (s, 36H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, SiMe<sub>4</sub>): δ = 177.66 (C=O); 176.36, 172.84, 172.72, 172.47 (C=O); 82.15, 82.05, 81.99, 81.74 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 61.07 (NCHCOOtBu); 55.88, 55.62, 53.03, 52.79, 48.76, 48.49, 48.18, 47.21, 44.30 (12C, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, CH<sub>2</sub>COOtBu, CH<sub>2</sub>COOH); 36.12 (NCHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 28.45, 28.25, 28.13, 28.00, 27.96 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

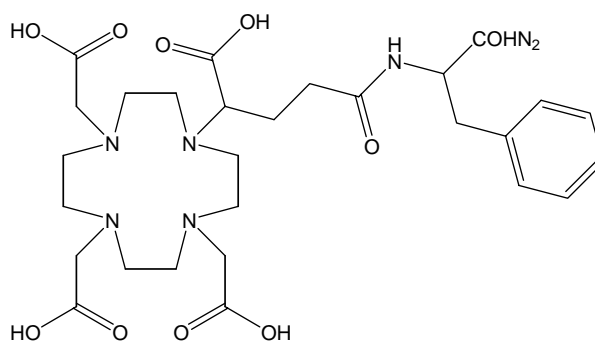


### 3.4.2 DOTA-D-Phe-NH<sub>2</sub>



65 mg (1 eq, 114  $\mu\text{mol}$ ) DOTA(<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub>-OH werden zusammen mit 18.6 mg (1 eq, 114  $\mu\text{mol}$ ) H-D-Phe-NH<sub>2</sub> in 10 ml DMF gelöst und mit 24  $\mu\text{l}$  (1.2 eq, 137  $\mu\text{mol}$ ) DIPEA versetzt. 52 mg (1.2 eq, 137  $\mu\text{mol}$ ) HATU, gelöst in 3 ml DMF, werden dieser Lösung beigelegt und 16 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird die Lösung mit 30 ml Essigsäureethylester versetzt und die organische Phase 3 Mal mit 5 %-iger, wässriger NaHCO<sub>3</sub> gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen werden mit Essigsäureethylester zurückextrahiert und schliesslich die vereinigten organischen Phasen 3 Mal mit H<sub>2</sub>O neutral gewaschen. Schliesslich werden die organischen Phasen zur Trockne eingengt. Das geschützte Konjugat wird mit 3 ml einer Lösung aus 96 % TFA, 3 % TIS und 1 % H<sub>2</sub>O für 4 h inkubiert. Mit 40 ml Diisopropylether: Petrolether = 1:1 wird das Rohprodukt ausgefällt und zentrifugiert. Durch Reinigung mit präparativer HPLC erhält man schliesslich 61 mg (97 %) des Produkts als weissen Festkörper. ESI-MS (-): 549.4 (100 %, [M - H]<sup>-</sup>), 587.3 (25 %, [M + K - 2 H]<sup>-</sup>); ESI-MS (+): 276.4 (100 %, [M + 2 H]<sup>2+</sup>), 295.3 (65 %, [M + Ca]<sup>2+</sup>), 551.3 (40 %, [M + H]<sup>+</sup>), 589.2 (15 %, [M + K]<sup>+</sup>). Reinheit (HPLC, **S2**, **G4**): 95.5 %.

### 3.4.3 DOTAGA-D-Phe-NH<sub>2</sub>



200 mg (1 eq, 286  $\mu\text{mol}$ ) DOTAGA(<sup>t</sup>Bu)<sub>4</sub>-OH werden zusammen mit 46.9 mg (1 eq, 286  $\mu\text{mol}$ ) H-D-Phe-NH<sub>2</sub> in 10 ml DMF gelöst und mit 59  $\mu\text{l}$  (1.2 eq, 572  $\mu\text{mol}$ ) DIPEA versetzt. 130 mg (1.2 eq, 572  $\mu\text{mol}$ ) HATU werden in 3 ml DMF gelöst und obiger Lösung beigegeben. 45 h wird bei Raumtemperatur inkubiert, danach mit 30 ml Essigsäureethylester versetzt und im Scheidetrichter 3 Mal mit 5 %-iger, wässriger NaHCO<sub>3</sub> gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen werden mit Essigsäureethylester zurückextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden dann 3 Mal mit H<sub>2</sub>O neutral gewaschen. Die gesammelten organischen Phasen werden zur Trockne eingeengt. Das Zwischenprodukt wird mit 3 ml einer Lösung aus 96 % TFA, 3 % TIS und 1 % H<sub>2</sub>O für 4 h inkubiert. Mit 40 ml Diisopropylether: Petrolether = 1:1 wird gefällt und der Niederschlag zentrifugiert, der Überstand abdekantiert. Das Rohprodukt wird durch präparative HPLC gereinigt, und so werden schliesslich 95 mg (52 %) des Produkts als weisser Festkörper erhalten.

ESI-MS (+): 331.3 (100 %, [M+K+H]<sup>2+</sup>), 661.6 (30 %, [M+H]<sup>+</sup>). Reinheit (HPLC, **S2**, **G4**): 96.8 %.

---

## 3.5 Komplexe zwischen $\text{Lu}^{3+}$ und $\text{Y}^{3+}$ und makrozyklischen Chelatoren

### 3.5.1 Komplexierungskinetik

Zur Untersuchung der Komplexbildungskinetik werden wässrige Lösungen des jeweiligen Chelators, die verwendeten Pufferlösungen sowie die Radiometall enthaltenden Lösungen mit Hilfe eines thermostatisierten Wasserbades auf die jeweilige Reaktionstemperatur gebracht. Die Metallkonzentrationen der Radiometalllösungen werden auf Grund des mitgelieferten Kalibrationsscheins berechnet. 500  $\mu\text{l}$  einer titrierten Lösung des entsprechenden nicht-radioaktiven Metalls werden mit 25  $\mu\text{l}$  der Radiometalllösung gemischt und die resultierende Metallkonzentration berechnet.

Zu Beginn des Experimentes werden jeweils die DOTA-D-Phe-NH<sub>2</sub>- resp. DOTAGA-D-Phe-NH<sub>2</sub>-Lösung mit 110  $\mu\text{l}$  der Pufferlösung und mit der Metalllösung gemischt und auf ein Gesamtvolumen von 400  $\mu\text{l}$  gebracht. Für die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten pseudoerster Ordnung resultieren so Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  für die verwendeten Metallionen, 100  $\mu\text{M}$  für die Chelatoren und 0.8 M Pufferkonzentration. Für die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung sind die Metallionen- und Chelatorkonzentrationen jeweils 10  $\mu\text{M}$  gehalten. Nach bestimmten Inkubationszeiten werden den Reaktionslösungen jeweils 25  $\mu\text{l}$  entnommen und mit 25  $\mu\text{l}$  einer 0.1 M Ca-DTPA-Lösung versetzt, wodurch nicht reagierte Metallionen abgefangen werden. Diese Lösungen werden schliesslich mittels HPLC analysiert (**S1**, **G1**) und so der Anteil von umgesetztem Metall bestimmt.

---

---

### 3.5.2 Komplexstabilität

Ein 5 µg Aliquot DOTA-D-Phe-NH<sub>2</sub> (9.08 nmol, 1 eq) resp. DOTAGA-D-Phe-NH<sub>2</sub> (7.57 nmol) wird mit 200 µl 0.4 M Natriumacetatpuffer pH 5.0 versetzt und zusammen mit 0.25 mCi (9.25 MBq) <sup>177</sup>Lu 30 min bei 95 °C gehalten. Nach Abkühlen wird mit 500 µl einer 0.1 M Ca-DTPA-Lösung (> 5500 eq) versetzt und 20 µl mit HPLC (**S1**, **G1**) analysiert. Bei Raumtemperatur resp. 37 °C wird inkubiert und nach gewissen Zeiten jeweils eine Probe zu 20 µl entnommen und analysiert.

### 3.5.3 Spezifische Aktivität eines <sup>177</sup>Lu-Komplexes

Aliquots mit ansteigenden Mengen DOTAGA-Substanz P (10 µg, 5 µg, 4 µg, 3 µg und 1.5 µg) werden mit jeweils 10 mCi (370 MBq) <sup>177</sup>LuCl<sub>3</sub> versetzt und mit 0.4 M Natriumacetatpuffer pH 5.0 auf ein Totalvolumen von 200 µl gebracht. Diese Ansätze werden im Heizblock für 25 min bei 100 °C inkubiert und anschliessend während 15 min bei Raumtemperatur abgekühlt. Jeweils 5 µl der Probe werden auf 100 µl 0.1 M Ca-DTPA gegeben und mit HPLC (**S1**, **G1**) die Markierausbeute bestimmt.

---

## 3.6 Biologische Experimente

### 3.6.1 Serumstabilitäten

Ca. 3 ml frisches, humanes Blut wird gewonnen, 15 min bei Raumtemperatur ruhen gelassen und zentrifugiert. Das überstehende, klare Blutserum wird in ein Röhrchen transferiert und bei 37 °C gehalten.

[<sup>111</sup>In/<sup>nat</sup>In]-markiertes Chelator-Peptid-Konjugat (**AAV 6**) wird in physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und ebenfalls auf 37 °C gebracht. 2 ml des frischen Blutserums werden vorgelegt, mit 40 pmol des Radiopeptids versetzt und gut durchmischt. Im Inkubator wird bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> gehalten. Zu verschiedenen Zeitpunkten wird von der Reaktionslösung eine Probe von 100 µl entnommen und zu 100 µl Methanol gegeben. Diese Lösung wird kräftig durchmischt um Proteine zu fällen. Der dabei ausgebildete Niederschlag wird abzentrifugiert, der klare Überstand abdekantiert und mit HPLC (**S1, S2, G2**) analysiert. Um die Ausgangssituation zu ermitteln, wird die erste Probe gleich zu Beginn des Experiments gezogen und die nachfolgenden Chromatogramme auf diese Ausgangssituation bezogen.

### 3.6.2 Internalisierung

Internalisierungsversuche werden analog zu bestehenden Verfahren durchgeführt (33, 140). Im Falle der Substanz P-Derivate, welche an den NK-1-Rezeptor binden, werden dazu Zellen des Typs LN319 benutzt. Dies sind Zellen aus einem humanen Glioblastoma multiforme. Die

---

Minigastrin-Derivate werden an den CCK<sub>2</sub>-Rezeptor tragenden Zellen des Typs AR4-2J getestet.

In Zellkulturplatten mit 6 Löchern („6-well plates“) werden am Vortag des Internalisierungsexperimentes 10<sup>6</sup> der jeweiligen Zellen in jedes Loch gegeben und über Nacht in je 3 ml Zellkulturmedium mit 10 % FCS bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> gehalten. 1 h vor Versuchsbeginn wird das Medium entfernt und durch 1.2 ml Zellkulturmedium mit 10 % FCS ersetzt. Der Hälfte aller Löcher einer Platte werden dann 150 µl der Blockierlösung beigelegt, der anderen Hälfte weitere 150 µl Zellkulturmedium. Als Blockierlösung dient im Falle der Minigastrine eine 20 µM wässrige Lösung DOTA-Minigastrin 11, bei den Substanz P-Derivaten wird 50 µM wässrige Substanz P-Lösung verwendet.

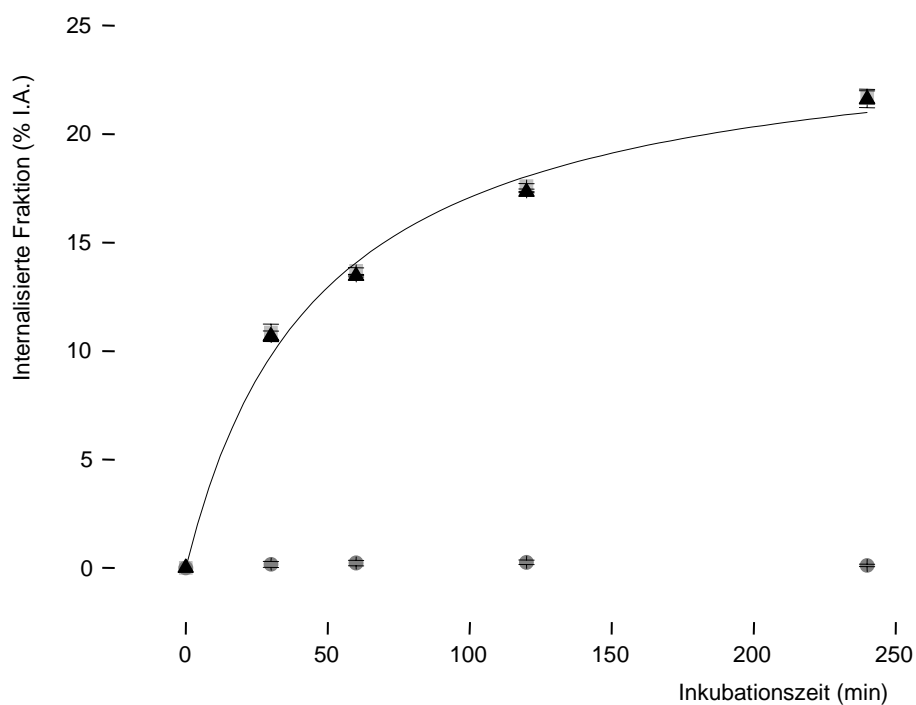
Zum Startzeitpunkt des Versuchs werden jedem Loch schliesslich je 150 µl einer Lösung des Radiopeptids beigelegt (**AAV 6**). Diese Lösungen sind so verdünnt, dass dieses Volumen bei den Minigastrin-Derivaten eine Substanzmenge von 0.25 pmol und bei den Substanz P-Derivaten 2.5 pmol entspricht. Bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt werden die Platten dann ruhen gelassen.

Nach Inkubationszeiten von 30 min, 1 h, 2 h und 4 h wird jeweils bei einer Platte das Inkubationsmedium entfernt und gesammelt. Zwei Mal wird mit je 1 ml eiskalter Phosphatpufferlösung (PBS, pH 7.2) gespült. Diese drei Fraktionen ergeben zusammen den nicht an die Zelle gebundenen Anteil des applizierten Radiopeptids. Danach werden die Zellen zwei Mal mit je 1 ml eiskaltem Glycinpuffer (0.05 M Glycin, pH 2.8) während 5 min auf Eis inkubiert; diese beiden Fraktionen zusammen repräsentieren den oberflächlich gebundenen, aber nicht internalisierten Anteil. Schliesslich werden die Zellen mit 1 M NaOH für 10 min bei 37 °C gehalten. Noch weitere zwei Mal wird mit 1 M NaOH gespült und so schliesslich der internalisierte Anteil des Radiopeptids gewonnen. Alle Fraktionen werden in separaten Röhrchen gesammelt und im  $\gamma$ -counter gemessen.

---

Um die rezeptorspezifische Internalisierung von nicht-rezeptorspezifischer Aufnahme in die Zellen zu unterscheiden, wird die Differenz aus den Werten mit Zugabe von Blockierlösung und ohne Zugabe von Blockierlösung berechnet (**Abbildung 17**). Alle Internalisierungswerte werden schliesslich auf 1 Mio Zellen normiert, indem eine zusätzliche Zellkulturplatte während des Versuches mitgezogen und damit die Zellzahl bestimmt wird.

**Abbildung 17:** Internalisierung von [ $^{111}\text{In}$ -DOTAGA]-Substanz P in LN319 Zellen



Internalisierte Fraktion als % der beigefügten Radioaktivität (injected Activity). ▲ = Internalisierung in den Zellen ohne Blockierung der NK-1 Rezeptoren; ● = Internalisierung mit Blockierung der NK-1 Rezeptoren; ▲ = rezeptorspezifisch internalisierte Aktivität.

### 3.6.3 Bioverteilung

Die Tierversuche werden gemäss den eidgenössischen Vorschriften durchgeführt und durch das schweizerische Bundesamt für Veterinärwesen bewilligt (Bewilligungsnummer 789). Die Tiere werden im Tierstall des Departements Forschung des Universitätsspitals Basel in Gruppen zu 6 Tieren pro Tierbox gehalten und haben unbeschränkten Zugang zu Wasser und Nahrung.

Als Tiermodell werden 6 Wochen alte männliche Lewis-Ratten verwendet. Den Tieren werden unter Narkose (3 % Isofluran bei 0.6 l O<sub>2</sub>/min) subkutan  $15 \cdot 10^6$  AR4-2J Tumorzellen in 200 µl physiologischer Kochsalzlösung in das rechte Hinterbein inokuliert (geimpft). Die Ratten bilden dann in einen Zeitraum von 2 Wochen an dieser Stelle einen Tumor mit einem Durchmesser von bis zu 1.5 cm aus.

Am Tag des Versuches wird den Tieren unter Narkose (Isofluran, s.o.) die entsprechende <sup>111</sup>In/<sup>nat</sup>In-markierte Substanz (0.1 nmol in 200 µl physiol. NaCl-Lösung) in die linke Beinvene (Vena Saphena Magna) gespritzt, wobei diese Vene zuvor operativ freigelegt wird. Die entstandene Wunde wird mit einem Clip verschlossen.

Nach entsprechender Inkubationszeit werden die Tiere erneut unter Narkose gesetzt (Isofluran, s.o.) und schliesslich mit CO<sub>2</sub> getötet. Die einzelnen Organe werden herausoperiert, Magen und Darm mit Wasser ausgespült und alle Organe abgetrocknet. Schliesslich werden alle Organe in Röhrchen transferiert, gewogen und im γ-counter gemessen. Für die Bestimmung der unspezifischen Organanreicherung wird bei einer Gruppe von Tieren der Applikationslösung zusätzlich zum Radioliganden ein Überschuss an Blockiersubstanz beigefügt. Die Anreicherungen (Uptake) in den einzelnen Organen werden als Prozent injizierter Aktivität pro Gramm Gewebe berechnet.

---



---

### 3.7 $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generator

Der  $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generator wird durch das Institut für Transuranium-Elemente (ITU) aus Karlsruhe geliefert (127). Er wird mit einer Abschirmung versehen, an eine Peristaltikpumpe angeschlossen und mit entsprechenden Vorratsgefäßen versehen (**Abbildung 18**).

Der Lösungsmittelfluss, welche für die Elutionen verwendet werden soll, beträgt 0.7 ml/min. Vor jedem Lösungsmittelwechsel wird der Generator trockengeblasen, indem mit der gleichen Pumpeneinstellung Luft durchgeblasen wird.

Für die Elution des Generators wird ein Lösungsmittelgemisch aus je 300 µl 0.2 M NaJ und 300 µl 0.2 M HCl hergestellt. Nach Trockenblasen des Generators wird mit diesem Gemisch eluiert. Das Eluat wird in einem Röhrchen aufgefangen, in welchem 110 µl 1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  und 50 µl 20 %-iger Ascorbinsäure vorgelegt sind. Nach der Elution des Generators wird der pH Wert kontrolliert und, falls nötig, mit 2 M HCl auf einen Wert von ca. 8.5 eingestellt.

Das zu markierende Chelator-Peptid-Konjugat wird als wässrige Lösung in einem metallfreien Gefäß vorgelegt. Dazu wird nun das ganze Eluat beigefügt, das Gefäß verschlossen und im Heizblock für 15 min bei 95 °C inkubiert. Danach wird das Gefäß in einem Wasserbad abgekühlt und eine Probe mit ITLC oder mit HPLC (**S2**, **S3**, **G3**) analysiert. Alternativ dazu kann die Inkubation auch mit Mikrowellentechnik durchgeführt werden.

---

Abbildung 18:  $^{213}\text{Bi}$ -Generator



### 3.8 Markierungsversuche mit Mikrowellentechnik

Beim Gebrauch des Mikrowellengerätes „Initiator“ der Firma Biotage müssen spezielle Glasgefäße verwendet werden (Abbildung 19). Das kleinste dieser von uns verwendeten Gläschen ist für ein Volumen von 0.5 – 2 ml ausgelegt.

Für die Markierung wird das gewünschte Chelator-Peptid-Konjugat zusammen mit dem entsprechenden Radiometall und einem Puffer im Gläschen vorgelegt, das Fläschen mit einem Septum und Alucap dicht verschlossen. Für die Markierung von makrozyklischen Chelatoren wird dann im Mikrowellenofen das Reaktionsgemisch für 3 min auf 95 °C gebracht. Danach wird das Gläschen durch einen Luftstrom abgekühlt. Das Septum wird geöffnet und eine Probe für die Qualitätskontrolle (ITLC oder HPLC, **S1 / G1**, **S3 / G3**) gezogen.

---

**Abbildung 19:** Mikrowellenofen INITIATOR der Firma BIOTAGE und zugehörige Vials

---



## 4. Resultate und Diskussion

### 4.1 Substanz P-basierende Radiopharmazeutika

#### 4.1.1 Synthesen der Substanz P-Derivate

Es wurden verschiedenste Derivate von Substanz P synthetisiert. Dazu wurden die Peptide an der Festphase unter Verwendung des Rink-amid MBHA Harz aufgebaut (SPPS, **AAV 1**). Bei der Synthese wurde die Fmoc-Strategie angewandt (137) und die Aminosäuren als seitenkettengeschützte Derivate verwendet, sofern dies nötig war. So wurde Arginin als Fmoc-Arg(Pbf)-OH und Lysin als Fmoc-Lys(BOC)-OH eingesetzt. Nachdem die ganze Aminosäuresequenz aufgebaut war, wurde ebenfalls noch an der Festphase der Chelator als geschütztes Derivat eingeführt. Dazu wurde das Kopplungsreagenz HATU (**AAV 3**) verwendet. Sämtliche Kopplungen wurden jeweils durch einen Kaisertest kontrolliert und bei Bedarf die einzelnen Kopplungsschritte wiederholt (**AAV 2**). Nach erfolgreichem Aufbau des gesamten Chelator-Peptid-Konjugats erfolgte schliesslich in einem Schritt die Entschützung der Seitenkettenschutzgruppen und die Abspaltung von der Festphase (**AAV 4**). Die erhaltenen Rohprodukte wurden durch Anwendung von präparativer HPLC (**S4 / S5, G6**) gereinigt, schliesslich durch analytische HPLC (**S1 / S2, G1**) und massenspektroskopische Methoden analysiert (**Tabelle 10**). Die Produkte wurden aus Wasser lyophilisiert und ergaben so weisse Feststoffe.

---

Von den erhaltenen Produkten wurden wässrige Lösungen hergestellt und die Substanzkonzentration mittels Umsetzung eines bekannten Überschusses an Metall bestimmt, da die synthetisierten Substanz P Derivate keine nennenswerte UV-Absorption aufweisen (AAV 7). Nach dieser Konzentrationsbestimmung wurden die Lösungen bei Bedarf in Aliquots unterschiedlicher Grösse aufgeteilt, so dass sie gebrauchsfertig für entsprechende Markierungen mit unterschiedlichen Metallen bereitstanden.

Alle Substanzen wurden zur Ermittlung der Bindungsaffinitäten mit nicht-radioaktiven Metallen komplexiert (AAV 5), respektive bei Verwendung in Internalisierungsversuchen oder bei Verwendung in Serumstabilitätsstudien mit Radiometallen versehen (AAV 6).

Von DOTAGA-Substanz P und DOTA-[Thi<sup>8</sup>, Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]-Substanz P wurden jeweils nach Filtration mit einem sterilen 0.22 µm-Filter Aliquots hergestellt und deren Sterilität durch die Firma Confarma (Hombourg, Frankreich) bestätigt. Danach wurden diese Aliquots für Patientenstudien verwendet und entsprechend mit <sup>111</sup>In, <sup>90</sup>Y oder <sup>177</sup>Lu markiert. Der für die Markierung verwendete Puffer wurde vor Gebrauch ebenfalls über einem 0.22 µm-Filter steril filtriert.

Die Bereitstellung der sterilen Aliquots erlaubt die Komplexierung mit Radiometallen für die anschliessende Verwendung am Patienten, ohne dass nach Einbringung des Radiometalls, wie in den älteren Protokollen, noch eine zusätzliche sterile Filtration nötig ist. Daraus resultiert für das Laborpersonal eine geringere Expositionszeit und somit eine geringere Strahlenbelastung bei der Zubereitung einer Applikation.

---

**Tabelle 10:** Analytische Daten der synthetisierten Substanz P-Derivate

Substanz	Molekulargewicht [g/mol]	Massenspektrometrie <sup>1</sup>	Reinheit <sup>2</sup>	Retentionszeit <sup>2</sup>
DOTAGA-Substanz P	1806.1	1806.9 [M + H] <sup>+</sup> ; 100 % 1827.9 [M + Na] <sup>+</sup> ; 20 %	95.5 %	23.8 min
DOTA-Substanz P	1734.0	1731.8 [M – H] <sup>+</sup> ; 100 % 1345.6 [M – DOTA] <sup>+</sup> ; 50 %	98.7 %	19.7 min
DOTAGA-[Met(O) <sup>11</sup> ]-Substanz P	1822.1	1823.2 [M + H] <sup>+</sup> ; 100 %	98.2 %	23.7 min
DOTAGA-[Sar <sup>9</sup> , Met(O <sub>2</sub> ) <sup>11</sup> ]-Substanz P	1850.2	1851.6 [M + H] <sup>+</sup> ; 100 % 1873.6 [M + Na] <sup>+</sup> ; 25 %	99.0 %	26.1 min
DOTA-[Met(O <sub>2</sub> ) <sup>11</sup> ]-Substanz P	1766.0	1765.2 [M] <sup>+</sup> ; 100 % 1379.2 [M – DOTA] <sup>+</sup> ; 35 %	96.4 %	25.9 min
DOTA-[Sar <sup>9</sup> ]-Substanz P	1748.1	1748.5 [M] <sup>+</sup> ; 100 % 1361.4 [M – DOTA] <sup>+</sup> ; 20 %	92.5 %	28.0 min
DOTA-[Thi <sup>8</sup> ]-Substanz P	1740.1	1740.5 [M] <sup>+</sup> ; 100 % 1354.4 [M – DOTA] <sup>+</sup> ; 15 %	98.5 %	27.9 min
DOTA-[Thi <sup>7</sup> ]-Substanz P	1740.1	1740.6 [M] <sup>+</sup> ; 100 % 1353.4 [M – DOTA] <sup>+</sup> ; 45 %	96.8 %	27.7 min
DOTA-[Sar <sup>9</sup> , Met(O <sub>2</sub> ) <sup>11</sup> ]-Substanz P	1780.1	1780.1 [M] <sup>+</sup> ; 100 % 1393.8 [M – DOTA] <sup>+</sup> ; 60 %	97.4 %	25.3 min
DOTA-[Thi <sup>8</sup> , Met(O <sub>2</sub> ) <sup>11</sup> ]-Substanz P	1772.1	1771.9 [M] <sup>+</sup> ; 100 % 1793.9 [M + Na] <sup>+</sup> ; 20 % 1727.9 [M – CO <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> ; 20 % 1815.8 [M + 2 Na – H] <sup>+</sup> ; 10%	99.3 %	21.9 min
DOTA-[Thi <sup>7</sup> , Thi <sup>8</sup> ]-Substanz P	1746.1	1746.4 [M] <sup>+</sup> ; 100 % 1359.3 [M – DOTA] <sup>+</sup> ; 30 %	96.3 %	27.3 min
DOTA- δ-Ava-Phe-Pro-N-Me-Leu-Met-NH <sub>2</sub> (DOTA-GR73632)	1184.4	1182 [M – H] <sup>+</sup> ; 55 % 591 [M – 2H] <sup>2+</sup> ; 100 %	98.7 %	15.7 min

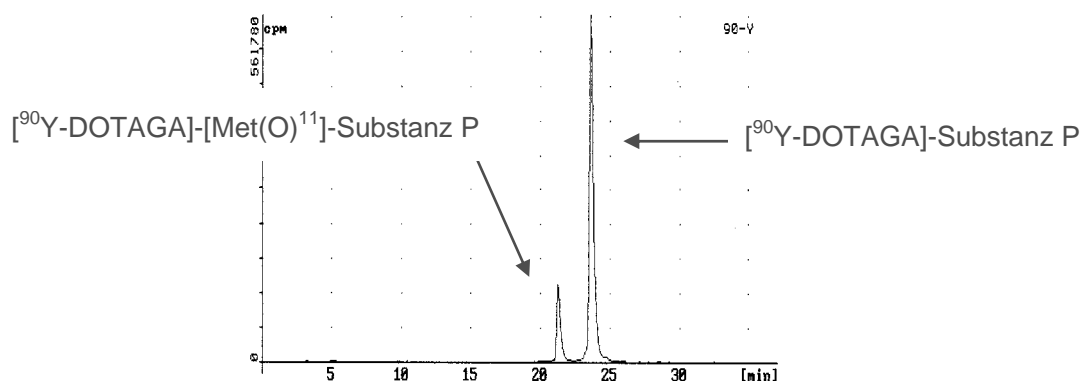
<sup>1</sup> Beobachtete Massenpeaks in g/mol, Interpretation, relative Signalintensität; <sup>2</sup> mittels HPLC ermittelt (**S1, G2**)

#### 4.1.2 Untersuchung der Oxidation von DOTAGA-Substanz P

Bei der routinemässigen Markierung von DOTAGA-Substanz P mit  $^{90}\text{Y}$  zur Therapie von malignen Hirntumoren bei Patienten wurde eine spezifische Aktivität von 1 mCi (37 MBq)  $^{90}\text{Y}$  pro 1  $\mu\text{g}$  (0.554 nmol) DOTAGA-Substanz P verwendet. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 95 °C in einem Puffer, welcher auf 10 ml insgesamt 2 g Na-Ascorbat, 328 mg Na-acetat und 370 mg 2,5-Di-hydroxy-benzoesäure enthielt und mit Essigsäure auf einen pH-Wert von 5.0 eingestellt wurde. Nach erfolgter Markierung wurde eine Qualitätskontrolle durch HPLC ausgeführt (S1, G2), und nur bei einer radiochemischen Ausbeute von über 99 % wurde die Substanz für die Applikation am Menschen freigegeben.

Der bei dieser Qualitätskontrolle sichtbare zweite Peak mit einer Retentionszeit von rund 22 min wurde als  $[\text{}^{90}\text{Y-DOTAGA}]\text{-[Met(O)}^{11}\text{]-Substanz P}$  identifiziert, indem man diese Substanz zum Vergleich durch Oxidation mit Wasserstoffperoxid herstellte und in der HPLC coinjizierte.

**Abbildung 20:** Radiochromatogramm einer Applikationslösung  $[\text{}^{90}\text{Y-DOTAGA}]\text{-Substanz P}$  (S1, G2)



Markierung von 30  $\mu\text{g}$  DOTAGA-Substanz P mit 30 mCi (1.11 GBq)  $^{90}\text{Y}$ ; 20 % oxidierte Form

Trotz der Beigabe der recht grossen Menge Antioxidantien konnte die Oxidation des Chelator-Peptid-Konjugats nicht komplett unterdrückt werden und resultierte schliesslich in rund 20 % Gesamtanteil der oxidierten Form in der Applikationslösung (**Abbildung 20**). Dies ist deshalb von Bedeutung, weil das entsprechende oxidierte Derivat eine gegenüber [<sup>90</sup>Y-DOTAGA]-Substanz P deutlich reduzierte Bindungsaffinität aufweist (**Tabelle 11**).

Eine applikationsbereite Lösung [<sup>90</sup>Y-DOTAGA]-Substanz P wurde im Kühlschrank bei 4 °C gelagert, und nach gewissen Zeiten wurde jeweils eine Probe entnommen und mit HPLC analysiert. Dadurch sollte untersucht werden, ob die Oxidation von DOTAGA-Substanz P nur während der Inkubation bei 95 °C auftritt und somit eine Folge der erhöhten Temperatur ist, oder ob sie eher auf die radioaktive Strahlung zurückzuführen ist.

**Tabelle 11:** Einfluss der Oxidation von Methionin während der Markierung von DOTAGA-Substanz P mit <sup>90</sup>Y auf die Bindungsaffinität der resultierenden Verbindung

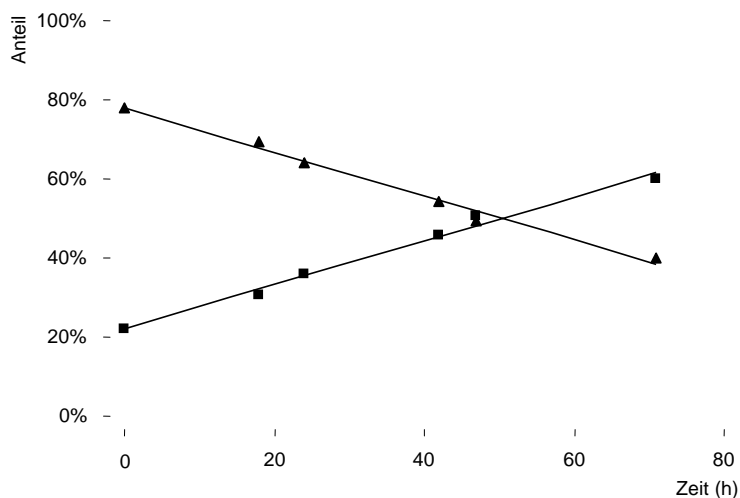
<b>Substanz</b>	<b>n</b>	<b>Bindungsaffinität IC<sub>50</sub></b>
DOTAGA-Substanz P	3	1.5 ± 0.3
DOTAGA-[Met(O) <sup>11</sup> ]-Substanz P	2	9.8 ± 1.0
[Y-DOTAGA]-Substanz P	3	1.0 ± 0.4
[Y-DOTAGA]-[Met(O) <sup>11</sup> ]-Substanz P	2	8.2 ± 2.6

Bindungsaffinitäten IC<sub>50</sub> in (nM), als Durchschnitt ± Standardabweichung

Bei der Inkubation der Applikationslösung im Kühlschrank sah man eine kontinuierliche Abnahme des Anteils an unoxidiertes [<sup>90</sup>Y-DOTAGA]-Substanz P zu Gunsten des oxidierten Analogons. Dies zeigt einerseits, dass die Oxidation auf Grund der radioaktiven Strahlung erfolgt, andererseits wird deutlich, dass eine Applikationslösung erst direkt vor Applikation an den Menschen zubereitet werden darf.



**Abbildung 21:** Oxidation einer Applikationslösung von [ $^{90}\text{Y}$ -DOTAGA]-Substanz P



Inkubation bei 4°C; ▲ = [ $^{90}\text{Y}$ -DOTAGA]-Substanz P, ■ = [ $^{90}\text{Y}$ -DOTAGA]-[Met(O)<sup>11</sup>]-Substanz P

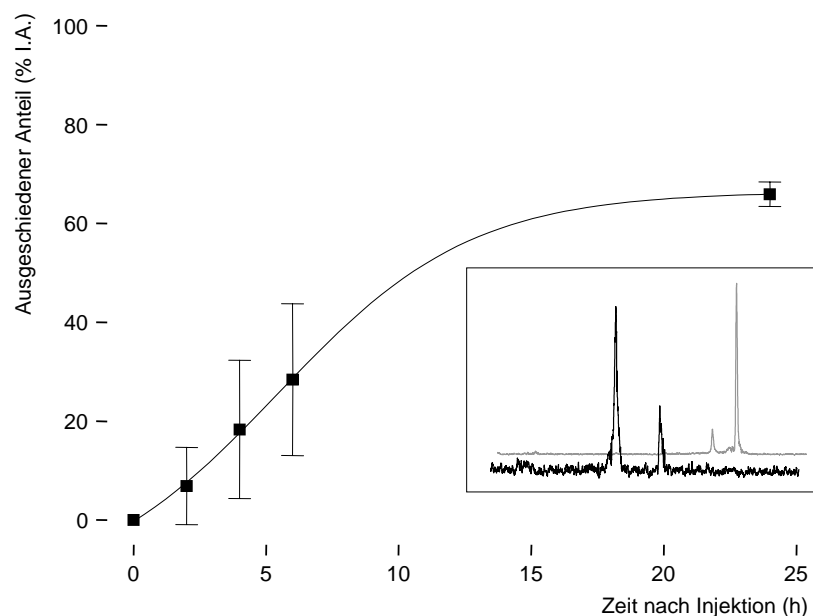
#### 4.1.3 Ausscheidung des applizierten Radiopharmazeutikums

Zur Untersuchung der Ausscheidungsgeschwindigkeit von [ $^{90}\text{Y}$ -DOTAGA]-Substanz P über die Nieren wurde nach der Applikation der Urin einiger Patienten gesammelt und die darin vorhandene Radioaktivität quantifiziert.

Dazu wurde von den Applikationslösungen jeweils ein definiertes Volumen (10  $\mu\text{l}$ ) abgezweigt, welches als Standard zur Quantifizierung der ausgeschiedenen Radioaktivität diente. Nach der Applikation an den Patienten wurde von diesen in folgenden Zeiträumen der Urin gesammelt: 0 bis 2 h, 2 bis 4 h, 4 bis 6 h und 6 bis 24 h. Diese Proben wurden verdünnt, mit Szintillationslösung versetzt, und im  $\beta$ -counter wurde die Radioaktivität gemessen. Das Energiefenster wurde dabei auf einen Wert von 300 – 2000 keV eingestellt, da dort die Interferenz mit der  $\gamma$ -Strahlung der ebenfalls applizierten [ $^{111}\text{In}$ -DOTAGA]-Substanz P nur

gering ist (141). Von jeder erhaltenen Probe wurde ebenfalls je ein Teil filtriert, mit HPLC untersucht (S1, G2) und mit der ursprünglichen Applikationslösung verglichen.

**Abbildung 22:** Ausscheidung von Radioaktivität über die Nieren nach Applikation von [ $^{90}\text{Y}$ -DOTAGA]-Substanz P



Messung der Radioaktivität im  $\beta$ -counter nach Applikationen von [ $^{90}\text{Y}$ -DOTAGA]-Substanz P; zwei Applikationen berücksichtigt; Kästchen: Chromatogramme der applizierten Substanz (grau) und der ausgeschiedenen Aktivität (schwarz)

Bei der Quantifizierung der ausgeschiedenen Radioaktivität hat sich herausgestellt, dass innerhalb eines Zeitraumes von 24 h nach Applikation insgesamt rund 65 % der Aktivität wieder ausgeschieden wurden, allerdings verlief die Ausscheidung gerade in der Anfangsphase nicht sehr rasch (**Abbildung 22**). Die im Patienten verbliebene Aktivität war beim Tumor lokalisiert, wie durch Ganzkörperszintigraphie bestätigt wurde (77). Der Vergleich der Chromatogramme der ausgeschiedenen Radioaktivität und der applizierten [ $^{90}\text{Y}$ -DOTAGA]-Substanz P zeigte, dass die gesamte ausgeschiedene Radioaktivität nur noch an Bruchstücke der ursprünglich applizierten Substanz gebunden war.

---

Dies ist leicht verständlich, ist doch das Peptid Substanz P in Blut wenig stabil (23, 142). Das Chromatogramm, welches von der ausgeschiedenen Substanz aufgenommen wurde, wies dabei dasselbe Muster auf wie jenes, welches nach einer in-vitro Inkubation von [<sup>90</sup>Y-DOTAGA]-Substanz P in humanem Blutserum aufgenommen wurde.

Dieselbe Untersuchung wurde auch bei einem Patienten durchgeführt, welcher eine Applikation von 60 mCi (2.22 GBq) [<sup>90</sup>Y-DOTA]-[Thi<sup>8</sup>, Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]-Substanz P (60 µg) erhalten hatte. Es wurde wiederum über einen Zeitraum von insgesamt 24 h der Urin gesammelt und die darin vorhandene Radioaktivität quantifiziert. Über diesen Zeitraum wurden hier rund 62 % der applizierten Radioaktivität über die Nieren ausgeschieden, dieser Wert bewegte sich somit im selben Bereich wie nach einer Applikation von [<sup>90</sup>Y-DOTAGA]-Substanz P.

Allerdings dürfen die hier ermittelten Zahlen nicht überbewertet werden: Wie im nachfolgenden Kapitel über die Stabilitätsuntersuchung in Liquorflüssigkeit von Patienten gezeigt wird, ist die Stabilität eines applizierten Substanz P-Derivats stark von der Beschaffenheit des jeweiligen Liquors abhängig. Grosse Unterschiede in der Ausscheidungsgeschwindigkeit sind deshalb bei unterschiedlichen Patienten zu erwarten.

#### **4.1.4 Stabilitätsuntersuchungen**

##### **4.1.4.1 *Stabilitätsuntersuchungen in Liquor von Patienten***

Erste Versuche sollten den Stellenwert des enzymatischen Abbaus von [<sup>90</sup>Y-DOTAGA]-Substanz P beim Patienten evaluieren. Dazu wurde von Hirntumorpatienten Liquor (Cerebrospinale Flüssigkeit CSF) gewonnen. Es stellte sich heraus, dass diese Proben in ihrer Beschaffenheit deutlich variieren können. Während sich bei gewissen Patienten die CSF als

---

klare, farblose Flüssigkeit darstellte, so waren die Proben von anderen Patienten deutlich rot gefärbt und trübe. Das Auftreten dieser Rotfärbung muss auf eine Kontamination der CSF mit Blut zurückgeführt werden. Dieses Blut kann einerseits von dem zuvor erfolgten operativen Eingriff stammen oder aber auf ein inneres Bluten des Tumors selber hindeuten.

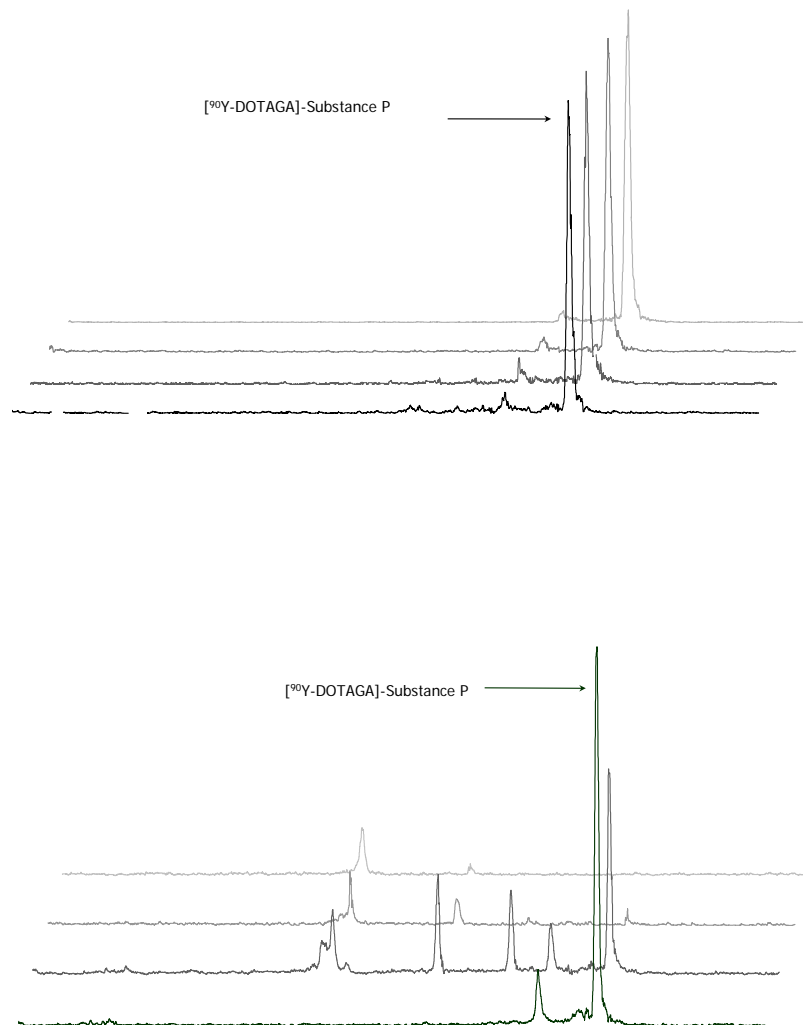
Die Liquorproben wurden im Inkubator auf 37 °C gebracht und mit 0.2 µg (1.11 nmol) [<sup>90</sup>Y-DOTAGA]-Substanz P versetzt (**AAV 6**). Nachdem die Lösungen gut durchmischt waren, wurden sie bei 37 °C inkubiert, und in gewissen Zeitabständen wurden davon jeweils Proben gezogen und mit HPLC analysiert (**S1, G2**).

Die erhaltenen Chromatogramme variierten deutlich, je nach Beschaffenheit der eingesetzten CSF. Während bei Inkubation von [<sup>90</sup>Y-DOTAGA]-Substanz P in einer klaren, farblosen Probe über einen Zeitraum von rund 24 h praktisch kein enzymatischer Abbau festgestellt wurde, so war nach 30 h Inkubation in roter, trüber CSF die eingesetzte Substanz vollständig abgebaut (**Abbildung 23**).

Da sich die Kontamination der CSF mit Blutserum im Tumorpatienten nicht beeinflussen lässt und von Patient zu Patient erheblich variieren kann, wird die Geschwindigkeit der enzymatischen Metabolisierung von applizierter [<sup>90</sup>Y-DOTAGA]-Substanz P auch in vivo deutliche Unterschiede zeigen. Dies hat einen Einfluss auf die Verfügbarkeit des applizierten Radiopharmazeutikums über einen längeren Zeitraum.

---

**Abbildung 23:** Inkubation von [ $^{111}\text{In}$ -DOTAGA]-Substanz P in Cerebrospinaler Flüssigkeit (CSF)



Oben: Inkubation in klarem farblosen Liquor eines Patienten, HPLC-Analysen (**S1**, **G2**) nach 0 h, 2 h, 16 h, 24 h (von oben nach unten); Unten: Inkubation in trübem, roten Liquor eines Patienten, nach 0 h, 2 h, 5 h, 30 h (von unten nach oben).

---

#### 4.1.4.2 *Stabilität in Blutserum*

Substanz P wird bekanntlich von einer ganzen Reihe von Enzymen angegriffen und metabolisiert (142). Durch Austausch verschiedener Aminosäuren wurde deshalb versucht, das Peptid zu stabilisieren. Jene resultierenden Peptide, welche eine hohe Bindungsaffinität zum NK-1-Rezeptor aufwiesen, wurden danach auch auf ihre Stabilität in humanem Blutserum hin getestet. Sie wurden dazu mit  $^{111}\text{In}$  komplexiert (**AAV 6**) und bei 37 °C in frisch gewonnenem Serum bei einer Konzentration von 1 nmol / ml getestet.

Eine typische Applikation im Patienten umfasst 30 µg des entsprechenden Radiopeptids, welches direkt in den Tumor oder in die nach operativer Entfernung des Tumors verbleibende Resektionshöhle gespritzt wird. Das Volumen dieser Resektionshöhle kann dabei bis zu ca. 150 ml betragen. Die Flüssigkeit, welche die Resektionshöhle ausfüllt, besteht zum grössten Teil aus Liquor (CSF), welcher, wie schon im vorigen Kapitel erwähnt, keine grosse metabolische Zersetzung des Radiopharmakons verursacht. Die allenfalls vorhandene Kontamination mit Blutserum ist stark vom jeweiligen Fall abhängig. Das hier für die Evaluation der Serumstabilität gewählte Verhältnis zwischen Radiopharmazeutikum und Blutserum sollte aber in etwa in einem Bereich liegen, welcher auch im Patienten auftreten kann; das heisst dass die 30 µg Substanz in ca. 10 bis 20 ml Blut gelöst wären.

In regelmässigen Abständen wurden aus der Inkubationslösung Proben gezogen und mit HPLC (**S1**, **G1**) analysiert. Im Falle von [ $^{111}\text{In}$ -DOTAGA]-Substanz P wurde das bereits bei der Markierung auftretende Oxidationsprodukt [ $^{111}\text{In}$ -DOTAGA]-[Met(O) $^{11}$ ]-Substanz P zur intakten Substanz hinzugezählt, da dieses Produkt ja nicht durch enzymatischen Abbau, sondern vielmehr durch radiolytische Oxidation bei der Markierung mit dem Radiometall entsteht.

---

Die berechneten Halbwertszeiten für den enzymatischen Abbau waren wie folgt (**Tabelle 12**):

**Tabelle 12:** In-vitro Serumstabilität von Chelator-Peptid-Derivaten von Substanz P

<b>Substanz</b>	<b>Halbwertszeit in-vitro (h)</b>
[ <sup>111</sup> In-DOTAGA]-Substanz P	2.6 ± 0.3
[ <sup>111</sup> In-DOTA]-Substanz P	3.6
[ <sup>111</sup> In-DOTA]-[Thi <sup>8</sup> , Met(O <sub>2</sub> ) <sup>11</sup> ]-Substanz P	7.8 ± 0.5 ( <i>P</i> < 0.01)
[ <sup>111</sup> In-DOTAGA]-[Thi <sup>8</sup> , Met(O <sub>2</sub> ) <sup>11</sup> ]-Substanz P	8.2 ± 0.6 ( <i>P</i> < 0.01)
[ <sup>111</sup> In-DOTA]-[Sar <sup>9</sup> , Met(O <sub>2</sub> ) <sup>11</sup> ]-Substanz P	6.8

HPLC-Analysen (**S1**, **G1**) nach Inkubation in frischem humanem Blutserum bei 37 °C (1 nmol / ml)

Der durchgeführte Austausch der Aminosäuren an Position 8, 9 und 11 des Peptids waren also mit einer Erhöhung der Stabilität der resultierenden Radiopeptide verbunden. Im Falle der beiden Substanzen [<sup>111</sup>In-DOTA]-[Thi<sup>8</sup>, Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]-Substanz P und [<sup>111</sup>In-DOTAGA]-[Thi<sup>8</sup>, Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]-Substanz P war die Verbesserung gegenüber der ursprünglich im Patienten eingesetzten [<sup>111</sup>In-DOTAGA]-Substanz P jeweils signifikant (*P* < 0.01).

Auch der Austausch von Glycin an Position 9 durch die unnatürliche Aminosäure Sarcosin erbrachte zwar eine metabolische Stabilisierung, allerdings nicht im gleichen Ausmass wie der Austausch der Position 8 durch Thienylalanin.

---

#### 4.1.5 Bindungsaffinitäten

Die Bestimmung der Bindungsaffinitäten erfolgte mit Chelator-Peptid-Konjugaten, welche teilweise mit den natürlichen Isotopen des jeweiligen Metalls komplexiert wurden (**AAV 5**). Diese Verbindungen wurden am Institut für Pathologie an der Universität Bern durch die Arbeitsgruppe von Prof. J.-C. Reubi an humanen GBM-Tumoren untersucht (*58, 143, 144*). Dazu wurden Proben von Tumoren direkt nach deren Gewinnung bei  $-70\text{ °C}$  eingefroren und Schnitte davon hergestellt. Diese wurden durch Rezeptorautoradiographie unter Verwendung des NK-1-rezeptorspezifischen Radioliganden  $^{125}\text{I}$ -Bolton-Hunter-Substanz P ( $^{125}\text{I}$ -BHSP) auf das Vorhandensein von entsprechenden Rezeptoren getestet. Von den neuen, zu testenden Substanzen wurden ansteigende Mengen dem  $^{125}\text{I}$ -BHSP-enthaltenden Inkubationsmedium beifügt und zu den Tumorschnitten gegeben. Als Kontrolle wurde der gleiche Versuch auch mit natürlicher Substanz P ausgeführt. Nach dem Waschen der Tumorschnitte wurden mit diesen Tumoren während 1 – 7 Tagen Biomax MR-Filme (Kodak) belichtet. Die entstehenden Autoradiographien wurden mit einem computergestützten Auswertungsprogramm quantifiziert, und von den getesteten Substanzen wurden jene Konzentration berechnet, welche die Bindung der Referenzsubstanz  $^{125}\text{I}$ -BHSP zur Hälfte inhibierte (*145*). Dieser Wert wird als  $\text{IC}_{50}$  (Inhibition-Constant) bezeichnet. Je tiefer dieser Wert, desto bessere Bindungseigenschaften weist die entsprechende Substanz zum NK-1-Rezeptor auf.

Zur Ermittlung des Einflusses verschiedener verwendeter Radiometalle auf die Bindungseigenschaften der NK-1-rezeptorspezifischen DOTAGA-Substanz P wurden deren nicht-radioaktiven Metallisotope verwendet (**Tabelle 13, AAV 5**).

Es hat sich dabei gezeigt, dass der Einfluss der verwendeten Metalle auf die Bindungsaffinität recht gering ist.

---



Der für die Bindung an den NK-1-Rezeptor verantwortliche Abschnitt in der Peptidsequenz von Substanz P ist am carboxyterminalen Ende lokalisiert (146). Das Peptid selber weist mit einer Länge von 11 Aminosäuren offenbar einen genügend grossen Abstand zwischen diesem Teil und dem am aminoterminalen Ende angeknüpften Chelator auf, so dass Veränderungen am aminoterminalen Ende des Peptids keinen grossen Einfluss auf die Bindungsaffinität haben.

**Tabelle 13:** Einfluss verschiedener Metalle und Chelatoren auf die Bindungseigenschaften von DOTAGA-Substanz P

<b>Substanz</b>	<b>n</b>	<b>Bindungsaffinität IC<sub>50</sub></b>
DOTAGA-Substanz P	3	1.5 ± 0.3
[In-DOTAGA]-Substanz P	2	1.3 ± 0.2
[Y-DOTAGA]-Substanz P	3	1.0 ± 0.4
[Lu-DOTAGA]-Substanz P	2	1.9 ± 0.3
DOTA-Substanz P	3	0.5 ± 0.1
[In-DOTA]-Substanz P	2	3.5 ± 1.5
[Y-DOTA]-Substanz P	3	1.4 ± 0.6

Bindungsaffinität auf NK-1 Rezeptoren als IC<sub>50</sub> Werte (nM) als Durchschnitt ± Standardabweichung

Diese Annahme wird auch bestätigt durch den Vergleich der Bindungsaffinität mit Konjugaten, welche anstatt dem Chelator DOTAGA den Chelator DOTA aufweisen. DOTAGA weist im Vergleich zu DOTA eine zusätzliche Funktionalität auf, welche auch als Spacer (Abstandhalter) zwischen dem Peptid und dem Chelator agiert. Die Bindungsaffinitäten allerdings waren bei Verwendung beider Chelatoren vergleichbar; der zusätzliche Spacer hatte also keinen nennenswerten Einfluss.

Es wurde versucht, durch Kopplung des bekannten peptidischen Substanz P-Agonisten GR73632 mit dem makrozyklischen Chelator DOTA ein neues Radiopharmazeutikum zu entwickeln. GR73632 ist dafür bekannt, dass es gegenüber dem nativen Peptid Substanz P eine deutlich erhöhte metabolische Stabilität besitzt (147). Ebenfalls wurde mit NKP608 ein selektiver NK-1-Rezeptor Antagonist auf seine Bindungsaffinität hin getestet (148). Leider zeigten aber die hier getesteten Substanzen deutlich schlechtere Bindungsaffinitäten als die Derivate von nativer Substanz P (**Tabelle 14**).

**Tabelle 14:** Bindungsaffinität zu NK-1-Rezeptoren von peptidischen Agonisten und Antagonisten von Substanz P

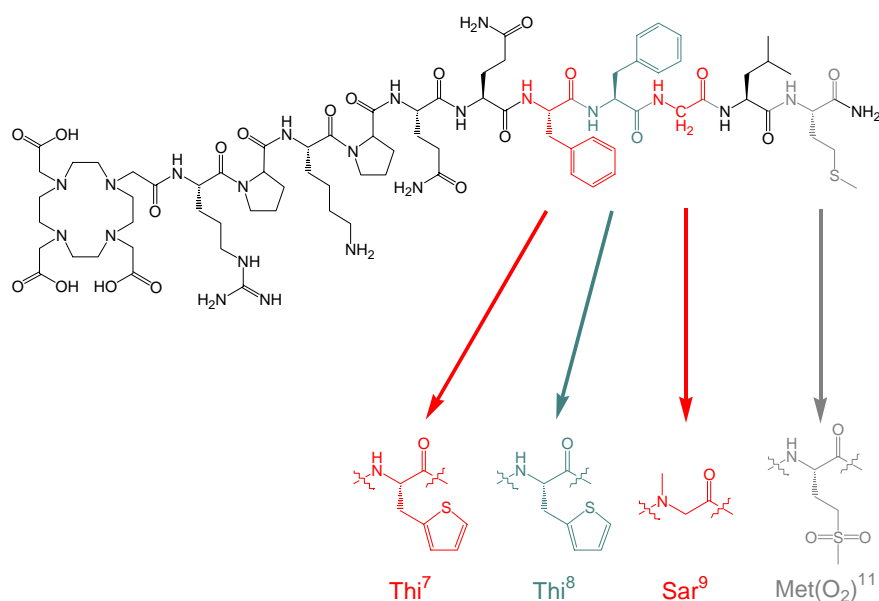
<b>Substanz</b>	<b>n</b>	<b>Bindungsaffinität IC<sub>50</sub></b>
DOTAGA-Substanz P	3	1.5 ± 0.3
DOTA-Substanz P	3	0.5 ± 0.1
GR73632	2	7.9 ± 2.1
DOTA-GR73632	2	467 ± 424
NKP608	5	52.5 ± 11.5

Bindungsaffinität auf NK-1 Rezeptoren als IC<sub>50</sub> Werte (nM) als Durchschnitt ± Standardabweichung

Da die Verwendung obiger Substanzen bzw. deren Kopplung an Chelatoren zu unbefriedigenden Bindungsaffinitäten zu NK-1-Rezeptoren führte, wurde durch Austausch einzelner Aminosäuren eine Stabilisierung der Peptidsequenz von Substanz P versucht (149). Aminosäuren, die neben Positionen liegen welche enzymatisch angegriffen werden (142), wurden durch unnatürliche Aminosäuren ausgetauscht (**Abbildung 24**). Die vorher enzymatisch angreifbaren Positionen des Peptids sollten so durch ein Enzym nicht mehr erkannt werden.

Die resultierenden Chelator-Peptid-Konjugate müssen natürlich weiterhin eine hohe Bindungsaffinität zum NK-1-Rezeptor aufweisen. Um dies sicherzustellen, wurden die entwickelten Konjugate mit  $^{111}\text{In}$  komplexiert (**AAV 5**) und getestet.

**Abbildung 24:** Stabilisierung der Peptidsequenz durch Austausch einzelner Aminosäuren



Der Austausch der Aminosäure Methionin an Position 11 des Peptids durch das Sulfonderivat Met(O<sub>2</sub>) erbrachte erfreulicherweise keine Verschlechterung der Bindungsaffinität. Wie bereits vorgängig erwähnt, wird Methionin bei der Komplexierung des Chelator-Peptid-Konjugats mit Radiometallen zu Methionin-sulfoxid oxidiert, was mit einer Verschlechterung der Bindungsaffinität verbunden ist. Durch Austausch der Aminosäure Met durch Met(O<sub>2</sub>) steht nun eine effiziente Möglichkeit zur Lösung dieses Problems zur Verfügung (**Tabelle 15**).

Die beste Bindungsaffinität aller getesteten Substanzen wies [ $^{111}\text{In}$ -DOTA]-[Thi<sup>8</sup>, Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]-Substanz P auf, mit einem IC<sub>50</sub> Wert von  $0.65 \pm 0.06$  nM. Diese hohe Bindungsaffinität

konnte nicht unbedingt erwartet werden, weisen doch die Konjugate, bei welchen von der nativen Peptidsequenz jeweils nur Position 8 oder Position 11 durch Thienylalanin resp. Methionin-Sulfon ersetzt wurde, keine derart hohe Affinität zum NK-1-Rezeptor auf.

Leider ist aber somit auch kein systematischer Zusammenhang zwischen dem Austausch einzelner Aminosäuren und der Bindungsaffinität der resultierenden Substanz erkennbar.

**Tabelle 15:** Bindungsaffinität von substituierten Analogen von Substanz P

<b>Substanz</b>	<b>n</b>	<b>Bindungsaffinität IC<sub>50</sub></b>
[In-DOTA]-Substanz P	2	3.65 ± 1.55
[In-DOTA]-[Met(O <sub>2</sub> ) <sup>11</sup> ]-Substanz P	5	2.04 ± 0.67
[In-DOTA]-[Sar <sup>9</sup> ]-Substanz P	5	1.95 ± 0.58
[In-DOTA]-[Thi <sup>8</sup> ]-Substanz P	5	4.49 ± 1.33
[In-DOTA]-[Thi <sup>7</sup> ]-Substanz P	5	5.78 ± 1.63
[In-DOTA]-[Sar <sup>9</sup> , Met(O <sub>2</sub> ) <sup>11</sup> ]-Substanz P	5	2.10 ± 0.16
[In-DOTA]-[Thi <sup>8</sup> , Met(O <sub>2</sub> ) <sup>11</sup> ]-Substanz P	5	0.65 ± 0.06
[In-DOTA]-[Thi <sup>8</sup> , Sar <sup>9</sup> ]-Substanz P	5	2.86 ± 0.45
[In-DOTA]-[Thi <sup>7</sup> , Thi <sup>8</sup> ]-Substanz P	5	6.83 ± 1.11
[Y-DOTA]-[Sar <sup>9</sup> , Met(O <sub>2</sub> ) <sup>11</sup> ]-Substanz P	2	1.18 ± 0.63
[Y-DOTAGA]-[Sar <sup>9</sup> , Met(O <sub>2</sub> ) <sup>11</sup> ]-Substanz P	2	5.1 ± 0.1

Bindungsaffinität auf NK-1-Rezeptoren als IC<sub>50</sub> Werte (nM) als Durchschnitt ± Standardabweichung

Schliesslich wurde von der aussichtsreichen Substanz auch das Konjugat mit dem Chelator DOTAGA anstatt DOTA synthetisiert. Die Bindungsaffinität von [In-DOTAGA]-[Thi<sup>8</sup>, Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]-Substanz P wurde mit IC<sub>50</sub> = 1.3 nM bestimmt und ist somit erfreulicherweise ebenfalls sehr hoch.

---

#### 4.1.6 Internalisierungen

Durch Internalisierung des an NK-1-Rezeptoren gebundenen Radiopeptids in die Tumorzellen soll einerseits die radioaktive Strahlung in die Nähe des Nukleus gebracht werden. Dadurch soll auch bei kurzreichweitiger Strahlung ein zytotoxischer Effekt ermöglicht werden (150). Das enzymatisch angreifbare Peptid wird aber durch Internalisierung zusätzlich auch aus der Umgebung des Blutserums gebracht. Das Internalisierungsverhalten ist daher ein wichtiger Aspekt bei der präklinischen Beurteilung neuer, Substanz P-basierender Radiopharmazeutika.

Es musste zuerst eine Zelllinie gefunden werden, welche für den Internalisierungsversuch geeignet ist.

Die Zelllinie AR4-2J ist bekannt dafür, dass sie nebst vielen anderen Rezeptoren auch NK-1-Rezeptoren ausbildet. Inkubation von [<sup>111</sup>In-DOTAGA]-Substanz P (2.5 pmol / Mio Zellen) mit AR4-2J Zellen ergab aber nur eine sehr geringe Internalisierungsrate von unter 2 % der applizierten Substanz innerhalb 4 h, was die Verwendung dieser Zelllinie als nicht sinnvoll erscheinen liess.

Versuche mit der Zelllinie LN401, einer humanen GBM-Zelllinie, resultierten innerhalb 6 h Inkubation sowohl bei 1 pmol / Mio Zellen wie auch bei 2.5 pmol / Mio Zellen in tiefen Anreicherungsraten in den Tumorzellen von unter 2.5 % der applizierten Radioaktivität. Die Blockierung der Rezeptoren durch DOTAGA-Substanz P (3 nmol) erzielte nur eine Reduktion um rund 50 % der aufgenommenen Radioaktivität. Die resultierende, rezeptorspezifische Internalisierungsrate schliesslich war entsprechend tief und nicht reproduzierbar. Des Weiteren war das Zellwachstum dieser Zelllinie äusserst schwer zu kontrollieren – die Zellen zeigten eine derart rasche Verdopplungsrate, dass die dadurch entstehenden Unterschiede in den Zellzahlen ebenfalls für die Gewinnung reproduzierbarer

---

---

Daten hinderlich waren. Ähnliche Probleme wie bei der Zelllinie LN401 traten auch mit der Zelllinie U343 auf.

Schliesslich wurde die Zelllinie LN319 verwendet, ebenfalls eine humane Zelllinie, welche aus einem Tumor des Typs GBM stammt.

Als Vorversuch wurde die Stabilität von [ $^{111}\text{In}$ -DOTAGA]-Substanz P in einer Zellkulturplatte mit Zellen des Typs LN319 untersucht. Dazu wurden 1 Million Zellen in eine Platte gebracht und 10 pmol der markierten Substanz beigefügt. Bei 37 °C wurde inkubiert, und nach gewissen Zeiten wurden Proben des Mediums gezogen und mit HPLC (**S1**, **G2**) analysiert. Die so ermittelte Halbwertszeit betrug 15.25 h.

Diverse Versuche führten schliesslich zu einem Internalisierungsprotokoll, welches auf 1 Million LN319 Zellen jeweils 0.25 pmol (2.8 kBq) des  $^{111}\text{In}$  markierten Substanz P-Derivats verwendet. Die Blockierung der rezeptorspezifischen Internalisierung erfolgte durch Zugabe von 3 nmol DOTA-[Thi<sup>8</sup>, Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]-Substanz P zum Internalisierungsmedium. Durch diese Blockierung konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme des Radioliganden spezifisch über den NK-1-Rezeptor erfolgt, da die Aufnahme bis zu einem Wert von unter 2 % der applizierten Radioaktivität reduziert werden konnte (**Abbildung 17**).

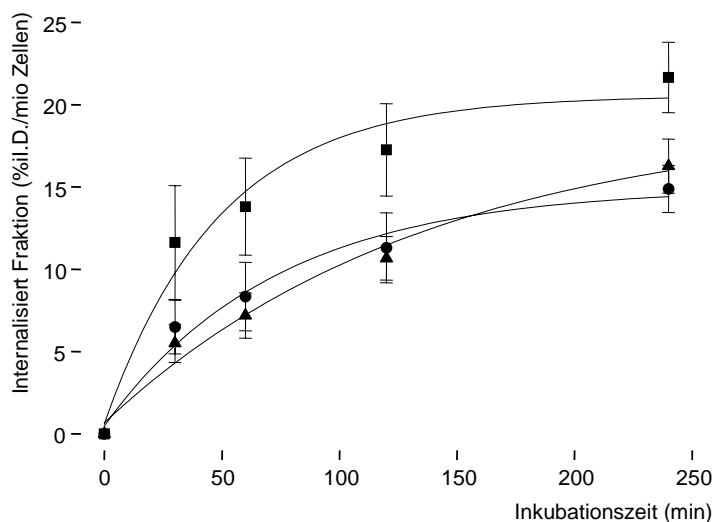
Die beiden aussichtsreichsten entwickelten Substanzen [ $^{111}\text{In}$ -DOTA]-[Thi<sup>8</sup>, Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]-Substanz P und [ $^{111}\text{In}$ -DOTAGA]-[Thi<sup>8</sup>, Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]-Substanz P wurden schliesslich dem entwickelten Internalisierungsprotokoll unterzogen und mit der Internalisierung von [ $^{111}\text{In}$ -DOTAGA]-Substanz P verglichen (**Abbildung 25**).

[ $^{111}\text{In}$ -DOTAGA]-Substanz P zeigte nach einer Inkubationszeit von 4 h die höchste Internalisierungsrate mit  $21.66 \pm 2.14$  % (n = 4) der applizierten Radioaktivität. Es folgten [ $^{111}\text{In}$ -DOTAGA]-[Thi<sup>8</sup>, Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]-Substanz P mit  $16.27 \pm 1.64$  % (n = 4) und [ $^{111}\text{In}$ -

---

DOTA]-[Thi<sup>8</sup>, Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]-Substanz P mit  $14.88 \pm 1.43$  % ( $n = 4$ ) Internalisierung nach 4 h Inkubation.

**Abbildung 25:** Internalisierung der Substanz P-Derivate



■ = [<sup>111</sup>In-DOTAGA]-Substanz P; ▲ = [<sup>111</sup>In-DOTAGA]-[Thi<sup>8</sup>, Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]-Substanz P; ● = [<sup>111</sup>In-DOTA]-[Thi<sup>8</sup>, Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]-Substanz P

Der Unterschied der Internalisierung nach 4 h zwischen [<sup>111</sup>In-DOTA]-[Thi<sup>8</sup>, Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]-Substanz P und [<sup>111</sup>In-DOTAGA]-Substanz P war signifikant ( $P = 0.002$ ), ebenso der Unterschied zwischen [<sup>111</sup>In-DOTAGA]-[Thi<sup>8</sup>, Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]-Substanz P und [<sup>111</sup>In-DOTAGA]-Substanz P ( $P = 0.007$ ). Der Unterschied zwischen [<sup>111</sup>In-DOTA]-[Thi<sup>8</sup>, Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]-Substanz P und [<sup>111</sup>In-DOTAGA]-[Thi<sup>8</sup>, Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]-Substanz P hingegen war nicht signifikant ( $P = 0.249$ ).

Trotz dieser Unterschiede darf festgehalten werden, dass die Derivate mit stabilisierter Substanz P-Aminosäuresequenz noch immer eine hohe, rezeptorspezifische Internalisierungsrate aufweisen.

#### 4.1.7 Externalisierungen

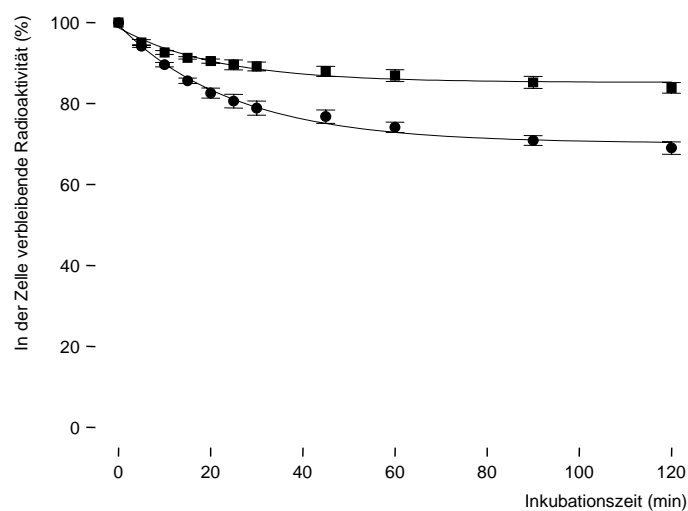
Nebst der Internalisierung interessiert auch die Verweildauer von in der Zelle aufgenommener Radioaktivität. Je länger einmal aufgenommene Radioaktivität in der Zelle verbleibt, umso höher ist die durch die Strahlung erfolgte Wirkung auf diese Zelle. Die Ausscheidung von in der Zelle akkumulierter Substanz wird als Externalisierung bezeichnet.

Um eine Vorstellung der Verweildauer in der Zelle zu erhalten, wurde deshalb die Externalisierungsrate untersucht. Dazu wurde nach einer 2 h dauernden Internalisierungsphase gemäss Kapitel 3.6.2 das Internalisierungsmedium von den Zellen entfernt, und durch Anwendung des Waschvorgangs mit Glycinpuffer das an der Membranoberfläche gebundene Radiopeptid entfernt. Danach wurden 3 ml des DMEM-Zellkulturmediums (mit 10 % FCS) beigelegt und bei 37 °C inkubiert. Das Medium wurde nach 5 min entfernt und durch neues Medium ersetzt. Dieser Mediumwechsel wurde nach 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 25 min, 30 min, 45 min, 60 min, 90 min und 120 min wiederholt und schliesslich die Zellen durch Einwirkung von 1 N NaOH komplett von der Zellkulturplatte gelöst. Alle Fraktionen wurden gesammelt und im  $\gamma$ -counter die entsprechende Radioaktivität quantifiziert (**Abbildung 26**).

Der über einen Zeitraum von 2 h externalisierte Anteil der in der Tumorzelle akkumulierten Radioaktivität betrug für [ $^{111}\text{In}$ -DOTA]-[Thi<sup>8</sup>, Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]-Substanz P 30.07 %, für [ $^{111}\text{In}$ -DOTAGA]-Substanz P lag er bei 18.18 %.

---



**Abbildung 26:** Externalisierung aus LN319 Tumorzellen

■ = [<sup>111</sup>In-DOTAGA]-Substanz P; ● = [<sup>111</sup>In-DOTA]-[Thi<sup>8</sup>, Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]-Substanz P

Bei beiden Substanzen ist die Externalisierungsrate recht tief, vergleicht man sie zum Beispiel mit der Externalisierungsrate von [<sup>111</sup>In-DOTA]-TOC aus sstr2A-HEK Zellen, wo innerhalb von 2 h rund 45 % der internalisierten Radioaktivität wieder ausgeschieden wurden (151). Auch die Ausscheidung von anderen Analogen von Octreotid aus Zellen des Typs AR4-2J verläuft meist deutlich rascher (20).

Auch wenn diese Werte nicht direkt mit unseren Resultaten verglichen werden können, da sowohl die verwendeten Tumorzellen als auch die verwendeten Substanzen unterschiedlich sind, so können sie doch einen Anhaltspunkt geben für die Beurteilung unserer tieferen Externalisierungsraten.

---

#### 4.1.8 Applikationen am Patienten

Im Rahmen einer Pilotstudie in Zusammenarbeit mit der nuklearmedizinischen und der neurochirurgischen Abteilung des Universitätsspital Basel wurden Hirntumor-Patienten mit den beiden Chelator-Peptid-Konjugaten DOTAGA-Substanz P und DOTA-[Thi<sup>8</sup>, Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]-Substanz P behandelt. Die Auswahl der Radiometalle, mit welchen die Substanzen markiert wurden, richtete sich nach der Lokalisation der Tumoren. Befand sich der Tumor in der Nähe eines kritischen Gebietes, so wurde auf den kurzreichweitigeren Emitter <sup>177</sup>Lu zurückgegriffen, während die Mehrzahl der Patienten mit dem Radiometall <sup>90</sup>Y behandelt wurden. Die Markierung der Chelator-Peptid-Konjugate erfolgte unter sterilen Bedingungen durch Inkubation des Radiometalls mit einem sterilen Aliquot und Pufferlösung für 30 min bei einer Temperatur von 95 °C. Die nachfolgende HPLC-Qualitätskontrolle (**S1 / S2, G1 / G2**) stellte eine Markierausbeute von über 99 % sicher, worauf die Lösung mit physiologischer Kochsalzlösung auf ein Volumen von 1 ml verdünnt wurde.

Vor der ersten Injektion der mit einem therapeutisch wirksamen Radiometall komplexierten Substanz wurde jeweils eine Testinjektion mit 0.3 mCi (11 MBq) <sup>111</sup>In markierter Substanz durchgeführt. Durch szintigraphische Bildgebung konnte so sichergestellt werden, dass die Substanz auch effektiv an dem gewünschten Tumor deponiert wird.

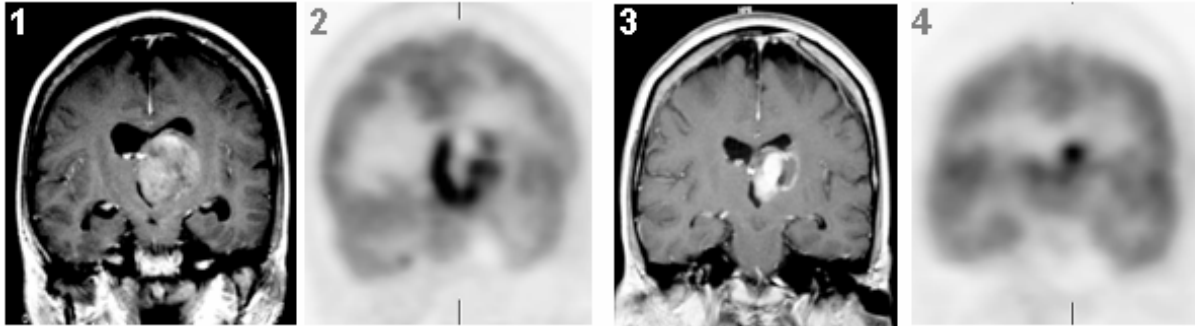
Der Therapieverlauf wurde durch MRI und PET (FDG) kontrolliert. So konnte zum Beispiel bei einer 44 jährigen Patientin mit einem inoperablen GBM im linken Thalamus eine deutliche Schrumpfung des Tumors nach Applikation von insgesamt 130 mCi (4.81 GBq) [<sup>90</sup>Y-DOTAGA]-Substanz P gezeigt werden (**Abbildung 27**). Die Schrumpfung des Tumors war durch eine deutliche Verbesserung der körperlichen Gesamtsituation begleitet (77).

---

---

**Abbildung 27:** Volumenreduktion eines inoperablen Tumors

---



---

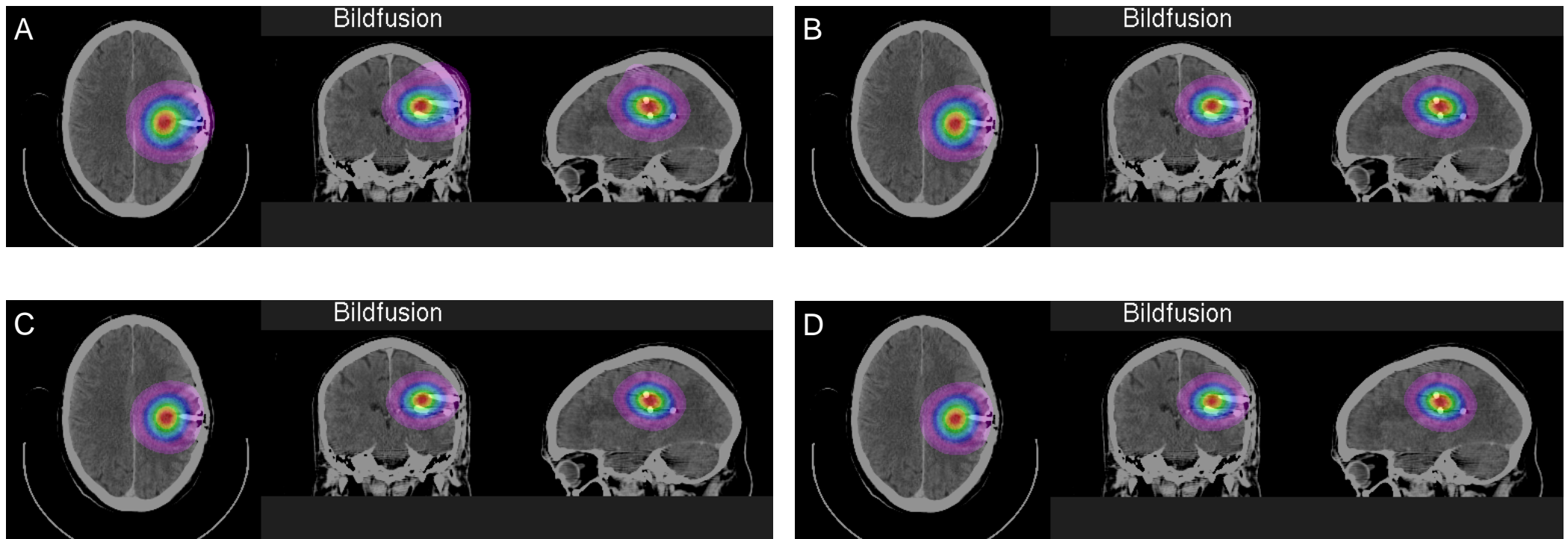
MRI (1, 3) und FDG-PET (2, 4) vor Beginn der rezeptorgesteuerten Radiopeptidtherapie (1, 2) und 3 Monate nach Therapie (3, 4)

---

Bei allen Patienten wurde nach Applikation des Radiopeptids mit szintigraphischen Mitteln kontrolliert, dass die Radioaktivität auch tatsächlich am gewünschten Ort verbleibt. Dies ist in einer Bildreihenfolge dokumentiert (**Abbildung 28**). Man sieht dort fusionierte SPECT/CT Aufnahmen über einen Zeitraum von insgesamt 28 h nach Applikation von [ $^{90}\text{Y}$ -DOTA]-[Thi<sup>8</sup>, Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]-Substanz P. Die SPECT-Aufnahmen (in Farbe) zeigen, dass die applizierte Radioaktivität sich nicht über den gesamten Schädel verbreitete, sondern am Ort des Tumors verblieb. Die Strahlenwirkung bleibt dadurch möglichst auf Tumorgewebe beschränkt.

---

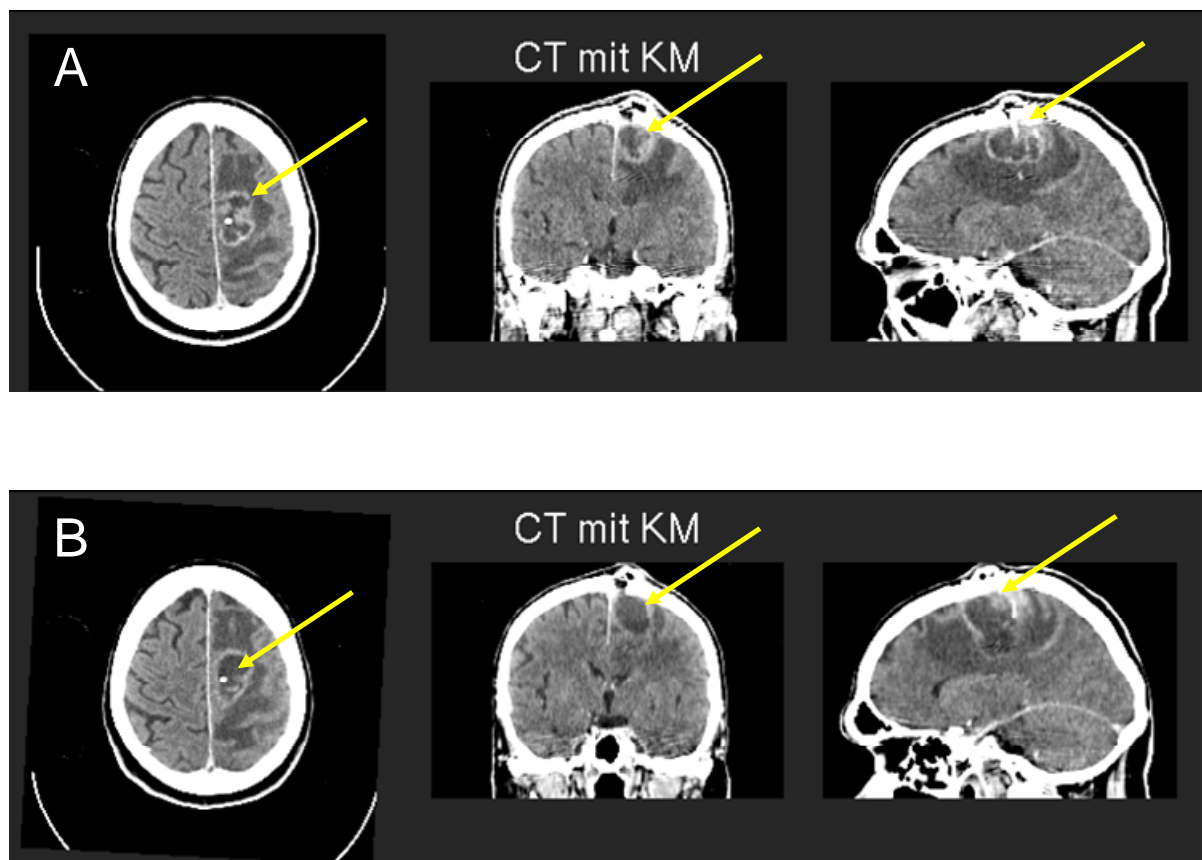
**Abbildung 28:** Lokalisationskontrolle von applizierter [ $^{90}\text{Y}$ -DOTA]-[Thi $^8$ , Met(O $_2$ ) $^{11}$ ]-Substanz P mit SPECT/CT



Fusionierte SPECT/CT Bilder; SPECT: Intensitäten farbig dargestellt; CT: in Graustufen dargestellt. A = Aufnahme unmittelbar nach Applikation; B = Aufnahme 4 h nach Applikation; C = Aufnahme 24 h nach Applikation; D = Aufnahme 28 h nach Applikation

Als Beispiel eines Verlaufes nach Applikation von [ $^{90}\text{Y}$ -DOTA]-[Thi $^8$ , Met(O $_2$ ) $^{11}$ ]-Substanz P soll hier ein 69 jähriger Patient mit einem GBM aufgeführt werden. Beim ersten Therapiezyklus des Patienten wurde 4 h nach Applikation ein SPECT/CT aufgenommen, wovon hier nur das CT-Bild abgebildet ist (**Abbildung 29**).

**Abbildung 29:** Verlauf nach Applikation von [ $^{90}\text{Y}$ -DOTA]-[Thi $^8$ , Met(O $_2$ ) $^{11}$ ]-Substanz P



A = CT (mit Kontrastmittel) eines GBM Patienten beim ersten Radiopeptid-Zyklus;  
B = CT des selben Patienten zwei Monate später anlässlich einer erneuten Applikation

Bei diesen Bildern sieht man einen Tumor, welcher in unterschiedlich hohem Masse Kontrastmittel aufnimmt. Die Unterschiede rühren von der unterschiedlichen Vitalität des entsprechenden Tumorgewebes her; die ausgedehnten hellen Ränder entsprechen dabei aktivem Tumorgewebe, während die dunklen Stellen nekrotisches Tumorgewebe darstellen.

Bei der ersten Applikation unserer Substanz war noch ein sehr inhomogenes Erscheinungsbild des Patienten feststellbar; aktives Tumorgewebe und nekrotisches Gewebe gingen stark ineinander über (**Abbildung 29A**).

Zwei Monate nach der ersten Injektion des Radiopharmazeutikums wurde nochmals ein CT aufgenommen. Der Tumor stellte sich nun deutlich homogener dar als bei der ersten Aufnahme. Grosse Anteile aktiven Tumorgewebes wurden offenbar in einen nekrotischen Zustand überführt (**Abbildung 29B**). Durch diese Umwandlung von Tumorgewebe wurde es für den Chirurgen auch deutlich einfacher, bei der anschliessenden operativen Entfernung des Tumors zwischen Tumorgewebe und umgebendem, gesundem Gewebe zu unterscheiden.

---

---

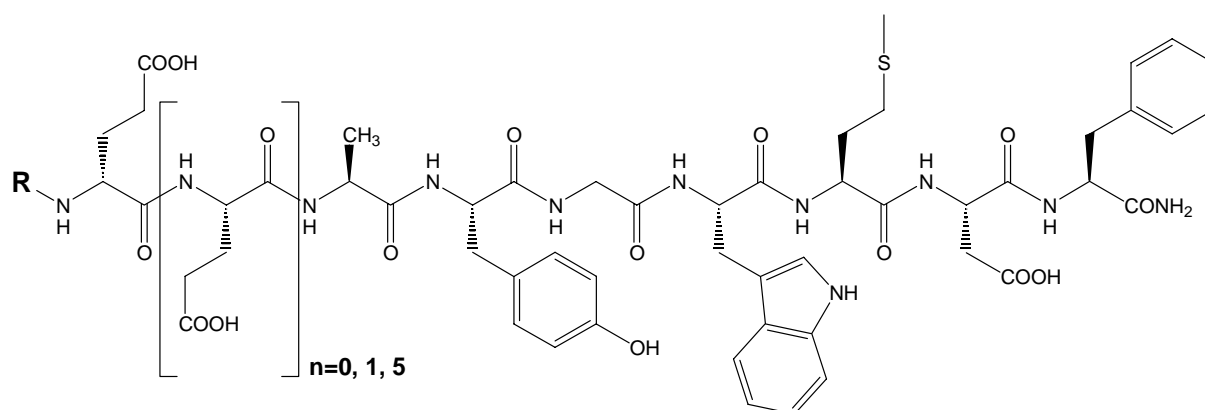
## 4.2 Gastrin-basierende Radiopharmazeutika

### 4.2.1 Synthesen der Minigastrin-Derivate

Basierend auf der Sequenz von Minigastrin (**Abbildung 30**) wurden verschiedene Peptidsequenzen mit SPPS auf Rink-Amid MBHA-Harz (theoretische Beladung 0.6 mmol/g) aufgebaut. Dazu wurde eine Fmoc-Synthesestrategie gemäss **AAV 1** angewandt. Die folgenden Aminosäuren mussten dabei als seitenkettengeschützte Derivate eingesetzt werden um so unerwünschte Nebenprodukte zu verhindern: D-Glutamat als Fmoc-D-Glu(O<sup>t</sup>Bu)-OH, L-Glutamat als Fmoc-Glu(O<sup>t</sup>Bu)-OH, Tyrosin als Fmoc-Tyr(<sup>t</sup>Bu)-OH, Tryptophan als Fmoc-Trp(BOC)-OH und schliesslich Aspartat als Fmoc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-OH. Die makrozyklischen Chelatoren wurden ebenfalls mittels SPPS eingeführt, unter Verwendung der entsprechenden Synthons DOTA(<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub>-OH bzw. DOTAGA(<sup>t</sup>Bu)<sub>4</sub>-OH (**AAV 3**). Die einzelnen Reaktionsschritte wurden jeweils durch einen Kaisertest auf allenfalls noch vorhandene freie primäre Amine getestet (**AAV 2**), und von allen Fmoc-Abspaltlösungen wurde jeweils spektrophotometrisch die Menge an abgespaltener Fmoc-Schutzgruppe bestimmt.

---

**Abbildung 30:** Strukturen der Minigastrin-Derivate



n = 0: Minigastrin 11; n = 1: Minigastrin 10; n = 2: Minigastrin 9; n = 5: Minigastrin 0;  
R = Chelator

Die Seitenkettenschutzgruppen des Peptids und die Schutzgruppen des Chelators wurden nach erfolgreichem Aufbau im selben Arbeitsschritt entfernt, wie auch das Konjugat von der Festphase abgelöst wurde (**AAV 4**). Die Rohprodukte wurden schliesslich mit präparativer HPLC (**S5**, **G6**) gereinigt und aus Wasser lyophilisiert. Die Charakterisierung der Endprodukte erfolgte mit HPLC (**S2**, **G2**) und massenspektrometrischen Methoden (**Tabelle 16**).

Im Gegensatz zu den anderen Minigastrin-Derivaten wurde DTPA-Minigastrin 0 von Dr. Martin Béhé (Marburg, Deutschland) zur Verfügung gestellt und lediglich eine Analyse der Substanz vor ihrer Verwendung durchgeführt. Sämtliche Substanzen ergaben schliesslich weisse Lyophilisate.

Von den synthetisierten Derivaten wurden wässrige Lösungen hergestellt und die Konzentration auf Grund der vorhandenen UV-Absorption bestimmt (**AAV 8**) (138).



**Tabelle 16:** Analytische Daten der synthetisierten Minigastrin-Derivate

Substanz	Molekulargewicht [g/mol]	Massenspektrometrie <sup>1</sup>	Reinheit <sup>2</sup>	Retentionszeit <sup>2</sup>
DOTAGA-Minigastrin 11	1474.6	1475.6, [M + H] <sup>+</sup> ; 85 % 1497.3, [M + Na] <sup>+</sup> ; 100 % 1519.6, [M + 2 Na - H] <sup>+</sup> ; 46 %	97.3 %	27.88 min
DOTA-Minigastrin 11	1402.6	1403.6, [M + H] <sup>+</sup> ; 100 % 1425.4, [M + Na] <sup>+</sup> ; 55 % 1441.3, [M + 2 Na - H] <sup>+</sup> ; 30 %	98.2 %	27.85 min
DOTA-Minigastrin 10	1531.6	1532.4, [M + H] <sup>+</sup> ; 100 % 1554.5, [M + Na] <sup>+</sup> ; 25 %	96.8 %	27.62 min
DOTA-Minigastrin 9	1660.7	1661.5, [M + H] <sup>+</sup> ; 100 % 1683.5, [M + Na] <sup>+</sup> ; 25 %	97.8 %	27.47 min
DTPA-Minigastrin 11	1391.5	1392.4, [M + H] <sup>+</sup> ; 18 % 1414.4, [M + Na] <sup>+</sup> ; 100 % 1436.3, [M + 2 Na] <sup>+</sup> ; 38 %	96.3 %	26.84 min
DTPA-Minigastrin 0	2036.8	2059.3, [M + Na] <sup>+</sup> ; 100 % 2075.2, [M + K] <sup>+</sup> ; 55 %	95.8 %	26.63 min
DOTA-[Nle] <sup>15</sup> -minigastrin 11	1385.5	1407.8, [M + Na] <sup>+</sup> ; 100 % 1385.8, [M] <sup>+</sup> ; 65 % 1423.7, [M + K] <sup>+</sup> ; 60 %	97.7 %	28.34 min
DOTA-[Ile] <sup>15</sup> -minigastrin 11	1385.5	1385.6, [M + H] <sup>+</sup> ; 95 % 1407.6, [M + Na] <sup>+</sup> ; 100 %	98.0 %	28.91 min
DOTA-[Met(O)] <sup>15</sup> -minigastrin 11	1419.5	721.6, [M + Na + H] <sup>2+</sup> ; 100 % 1442.1, [M + Na] <sup>+</sup> ; 25 %	94.6 %	26.04 min
DOTA-[Met(O) <sub>2</sub> ] <sup>15</sup> -minigastrin 11	1435.5	1435.5, [M + H] <sup>+</sup> ; 100 % 718.2, [M + 2H] <sup>2+</sup> ; 16 %	98.6 %	25.40 min

<sup>1</sup> Beobachtete Massenpeaks in g/mol, Interpretation, relative Signalintensität; <sup>2</sup> mittels HPLC ermittelt (**S2, G2**)

#### 4.2.2 Markierungen der Substanzen mit $^{111}\text{In}$

Die Markierung der Minigastrin-Derivate wurde für Konjugate mit makrozyklischen Chelatoren durch Inkubation gemäss **AAV 6** bei 95 °C ausgeführt; DTPA-tragende Derivate hingegen konnten schon bei Raumtemperatur mit  $^{111}\text{In}$  umgesetzt werden. Es wurden folgende radiochemischen Reinheiten gemäss HPLC (**S2, G1**) erreicht (**Tabelle 17**):

**Tabelle 17:** HPLC-Analysen der  $^{111}\text{In}$ -markierten Minigastrin-Derivate

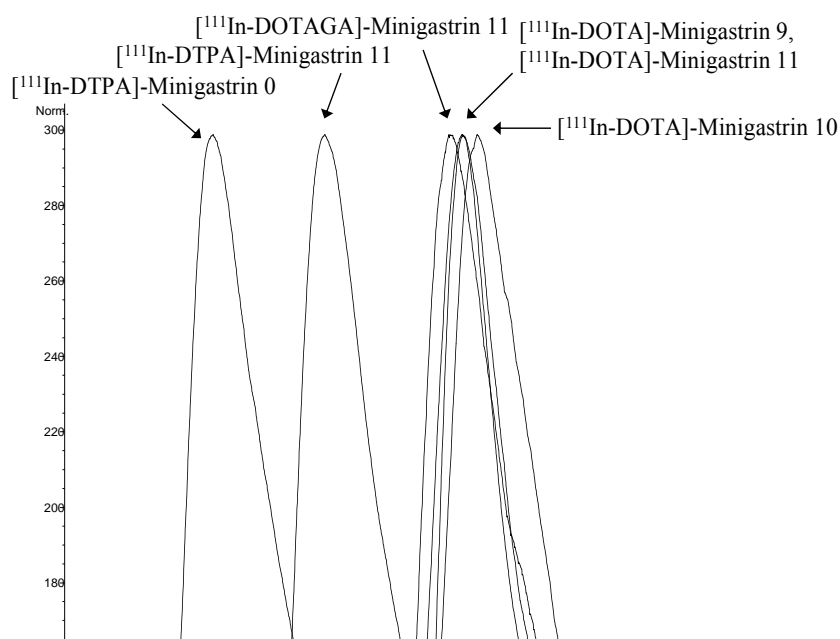
Substanz	Retentionszeit (min)	Radiochemische Reinheit (%)
[ $^{111}\text{In}$ -DTPA]-Minigastrin 0	21.82	99.03
[ $^{111}\text{In}$ -DOTA]-Minigastrin 9	22.30	99.95
[ $^{111}\text{In}$ -DOTA]-Minigastrin 10	22.90	95.88
[ $^{111}\text{In}$ -DOTA]-Minigastrin 11	22.97	97.79
[ $^{111}\text{In}$ -DOTAGA]-Minigastrin 11	22.90	97.55
[ $^{111}\text{In}$ -DTPA]-Minigastrin 11	22.85	99.43

Radiochemische Reinheit gemäss HPLC (**S2, G1**)

Die HPLC-Retentionszeiten hängen nebst der Grösse der Moleküle vor allem von der Hydrophilie der Substanzen ab. Da wir eine „reversed-phase“, also eine apolare Festphase für die Chromatographie, benutzen, eluiert eine Substanz um so früher, je polarer sie ist. Bei unseren Minigastrin-Derivaten konnten solche Unterschiede auch gesehen werden (**Abbildung 31**): Das DTPA-Derivat von Minigastrin 0 besitzt mit seinen 5 L-Glutamaten im Vergleich zu den anderen Molekülen deutlich mehr negative Ladungszentren. Die daraus resultierende höhere Polarität widerspiegelte sich in der kürzesten Retentionszeit. Der

Austausch von DOTA mit DTPA bei Minigastrin 11 erbrachte ebenfalls eine Verkürzung der Retentionszeit, während sich der Unterschied zwischen dem DOTA- und dem DOTAGA-tragenden Konjugat von Minigastrin 11 trotz der zusätzlichen Carbonsäurefunktion nur noch in einem geringen Unterschied zeigte. Die unterschiedlichen DOTA-Konjugate von Minigastrin 11, Minigastrin 10 und Minigastrin 9 verhielten sich praktisch identisch, mit jeweils nur sehr geringen Retentionszeitunterschieden. Die unerwartete Reihenfolge von DOTA-Minigastrin 10 und DOTA-Minigastrin 11 dürfte auf Schwankungen des HPLC Systems zurückzuführen sein, welche durch verschiedenste apparative Effekte hervorgerufen werden können.

**Abbildung 31:** Überlagerung der Chromatogramme der Minigastrin-Derivate



Zur deutlicheren Darstellung wurde der interessante Bereich der überlagerten Chromatogramme vergrößert.

### 4.2.3 Bestimmung der Bindungsaffinitäten

Zur Bestimmung der Bindungsaffinitäten wurden die  $^{nat}\text{In}$ -komplexierten Chelator-Peptid-Konjugate (**AAV 5**) zur Arbeitsgruppe von Prof. J.-C. Reubi am Institut für Pathologie der Universität Bern gesendet. Er und seine Mitarbeiterin B. Waser haben dann die Affinität der entsprechenden Substanz zu CCK<sub>1</sub>- und CCK<sub>2</sub>-Rezeptoren nach publizierten Methoden getestet (95). Dazu wurden Proben von menschlichen Tumoren entnommen, welche bekanntermassen CCK-Rezeptoren ausbilden (85). Diese Proben wurden direkt nach Entnahme bei -70 °C gelagert und Kryostat-Schnitte davon durch Rezeptor-autoradiographie getestet. Die Verwendung des Radioliganden  $^{125}\text{I}$ -DTyr-Gly-Asp-Tyr(SO<sub>3</sub>H)-Nle-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH<sub>2</sub> ( $^{125}\text{I}$ -CCK) erlaubte die Identifizierung von CCK-Rezeptoren (88). Wurde in Gewebeschnitten die Bindung von  $^{125}\text{I}$ -CCK durch die Beigabe von 50 nM CCK8, nicht aber durch 50 mM Gastrin verhindert, so wurde dieses Gewebe als CCK<sub>1</sub>-Rezeptor positiv klassifiziert. Umgekehrt wurde bei CCK<sub>2</sub>-Rezeptor positivem Gewebe die Aufnahme von  $^{125}\text{I}$ -CCK zwar durch Beigabe von Gastrin, nicht aber durch CCK8 inhibiert.

Ansteigende Mengen der zu testenden,  $^{nat}\text{In}$ -komplexierten DOTA-Minigastrin-Derivate wurden schliesslich dem  $^{125}\text{I}$ -CCK enthaltenden Inkubationsmedium beigefügt und dadurch kompetitive Inhibierungskurven generiert. Kontrollen mit unmarkiertem Gastrin und/oder CCK wurden ebenfalls durchgeführt. Nach den entsprechenden Inkubationen wurden die Gewebsschnitte gewaschen und ein entsprechender Film mit diesen nun radioaktiven Schnitten belichtet. Diese Autoradiographien wurden durch ein computergestütztes Bildverarbeitungsprogramm ausgewertet (145).

Im Gegensatz zu den anderen aufgelisteten Resultaten wurde DTPA-Minigastrin 0 direkt durch Martin Béhé an Prof. Reubi zugesandt und dort gemessen. Deshalb liegt dieses Resultat auch nur für die Verbindung ohne entsprechendes Metall vor (**Tabelle 18**).

**Tabelle 18:** Bindungsaffinitäten zu CCK-Rezeptoren der verschiedenen Minigastrin-Derivate

Substanz	n	Bindungsaffinität zu CCK <sub>2</sub>	Bindungsaffinität zu CCK <sub>1</sub>
[DTPA]-Minigastrin 0	6	0.98 ± 0.4	> 100
[In-DOTA]-Minigastrin 9	2	1.2 ± 0.4	> 100
[In-DOTA]-Minigastrin 10	2	2.5 ± 0.1	> 100
[In-DOTA]-Minigastrin 11	6	4.8 ± 0.7	> 100
[In-DOTAGA]-Minigastrin 11	2	3.4 ± 2.0	> 100
[In-DTPA]-Minigastrin 11	3	3.9 ± 0.6	-
[In-DOTA]-DGlu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Ile-Asp-Phe-NH <sub>2</sub>	2	200 ± 5.0	> 1000
[In-DOTA]-DGlu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH <sub>2</sub>	2	9.9 ± 0.1	> 1000
[In-DOTA]-DGlu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met(O <sub>2</sub> )-Asp-Phe-NH <sub>2</sub>	2	1195 ± 760	> 1000
[In-DOTA]-DGlu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met(O)-Asp-Phe-NH <sub>2</sub>	2	1096 ± 116	> 1000

Bindungsaffinitäten als IC<sub>50</sub>-Werte [nM] als Durchschnitt ± Standardabweichung; n = Anzahl Messungen

Alle getesteten Substanzen wiesen gegenüber dem CCK<sub>1</sub>-Rezeptor eine deutlich geringere Affinität auf als zum CCK<sub>2</sub>-Rezeptor. Sie sind also spezifisch für den uns interessierenden Rezeptorsubtyp CCK<sub>2</sub>. Auffallend ist weiter, dass die Bindungsaffinität zum CCK<sub>2</sub>-Rezeptor mit abnehmender Anzahl an Glutamat-Einheiten leicht abnahm, allerdings nur in geringem Masse.

Der Einfluss des Chelators scheint gering zu sein, dies wird beim Vergleich der DOTA-, DOTAGA- bzw. DTPA-Derivate von Minigastrin 11 deutlich. Alle drei Substanzen wiesen vergleichbare Bindungsaffinitäten auf.

Bereits früher wurden DTPA-Konjugate von CCK- und Gastrin-Derivaten synthetisiert (96, 106, 107). Die azyklische Struktur des Chelators führt aber zu einer hohen Dekomplexierungsrate und ist daher speziell für therapeutische Anwendungen nicht empfehlenswert (40). Dass die hohe Bindungsaffinität durch den Wechsel zu einem makrozyklischen Chelator erhalten bleibt, ist von grosser Bedeutung, wird dadurch doch eine höhere Stabilität der Radiometallkomplexe erreicht.

Weil die ursprüngliche Sequenz von Minigastrin die Aminosäure Methionin enthält, wird bei der Anwendung von therapeutischen Dosen an Radiometallen mit hohem LET wie z.B. <sup>90</sup>Y oder <sup>213</sup>Bi eine Oxidation des im Methionin enthaltenen Schwefels stattfinden. Dieser Prozess führt zu dem Met(O)-Derivat des ursprünglichen Radiopeptids, was in unserem Beispiel von [In-DOTA]-Minigastrin 11 zu einer dramatischen Abnahme der Bindungsaffinität zum CCK<sub>2</sub>-Rezeptor auf einen Wert von IC<sub>50</sub> = 1096 nM geführt hat. Um diese Oxidation zu unterdrücken, können der Markierungslösung Antioxidantien wie z.B. Na-Ascorbat beigelegt werden (152). Alternativ kann die entsprechende Aminosäure Methionin durch Methionin-sulfon oder aber durch eine nicht-Schwefel-tragende Aminosäure ersetzt

---

werden. Diese Aminosäuren unterliegen dann nicht mehr den radiolytischen oxidativen Prozessen während der Markierung (153).

Bei den hier getesteten Substanzen wurden, ausgehend von DOTA-Minigastrin 11, beide Synthesestrategien verfolgt. Einerseits wurde Methionin durch sein zweifach oxidiertes Analogon Met(O<sub>2</sub>) ersetzt, andererseits wurde es auch durch die beiden nicht-Schwefeltragenden Aminosäuren Norleucin und Isoleucin ausgetauscht. Der Wechsel zu Methionin-sulfon führte genauso wie der Austausch mit Isoleucin zu einem dramatischen Abfall der Bindungsaffinität, auch die Einführung von Norleucin resultierte noch immer in einem markanten Verlust der Bindungsaffinität auf einen Wert von  $9.9 \pm 0.1$  nM. Die Minigastrin-Konjugate, welche die ursprüngliche carboxyterminale Aminosäuresequenz enthielten, wiesen im Gegensatz dazu hohe Bindungsaffinitäten zum CCK<sub>2</sub>-Rezeptor mit IC<sub>50</sub>-Werten von unter 5 nM auf. Zumindest die Analoga mit Methionin-sulfon, Methionin-sulfoxid sowie Isoleucin müssen deshalb für eine klinische Anwendung ausgeschlossen werden. Das Norleucin-Derivat kommt eventuell für eine Anwendung in Frage, da der Verlust von Bindungsaffinität durch den Vorteil der erhöhten Stabilität bei der Markierung mit einem therapeutischen Radiometall kompensiert werden kann.

#### **4.2.4 Serumstabilitäten**

Gastrin- und CCK-Derivate werden rasch aus dem Blut ausgewaschen (91, 96). Die Stabilität von Gastrin-Derivaten wird dabei recht unterschiedlich beurteilt. So wurde einerseits berichtet, dass radioaktiv markierte Gastrin-Derivate in humanem Blutserum Halbwertszeiten von mehreren Stunden aufweisen und deshalb von einer zusätzlichen Stabilisierung der Peptidsequenz abgesehen werden kann (93). Allerdings wurde in diesen Versuchen eine recht hohe Substanzkonzentration verwendet, indem 1 µg des entsprechenden Radiopeptids in 2 ml

---

Blutserum inkubiert wurde. Geht man von einem Blutserumvolumen im Menschen von ca. 3 l aus, so würde dies einer Applikation von total 1.5 mg des Radiopharmazeutikums entsprechen. Verglichen mit den bei einer therapeutischen Applikation üblicherweise verwendeten Mengen von bis zu ca. 200 µg eines Radiopeptids, sind solche Mengen aber unrealistisch hoch.

In einem anderen Versuch wurde zwar ebenfalls von einer hohen Stabilität von Minigastrin-Derivaten gesprochen, allerdings wurden auch dort 200 – 1000 pmol/ml Blutserum eingesetzt, was wiederum deutlich über der Konzentration bei einer Applikation beim Patienten liegen dürfte (102). Schliesslich wurde in einer nächsten Publikation zwar von einer gewissen Degradation von CCK-Analogen in Blutserum gesprochen, allerdings sind dort keine Angaben über die verwendeten Konzentrationen gemacht worden (96).

Die Geschwindigkeit eines enzymatischen Abbaus von Peptiden ist abhängig vom Verhältnis Peptid zu Serum; eine höhere verwendete Konzentration führt auch zu langsamerem Abbau des Peptids (154). Die Wahl einer zu hohen Konzentration führt folglich zu einer falschen Beurteilung, was die Stabilität einer Substanz betrifft.

Geht man von einer Applikation von ca. 100 µg eines Radiopeptides bei einem Patienten aus, und nimmt man des Weiteren ein Blutserum-Volumen von 3 l in einem durchschnittlichen Erwachsenen an, so erhält man, bei einem Molekulargewicht von etwa 1500 g/mol, eine applizierte Menge von 67 nmol. Diese Berechnung wurde als Grundlage für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuche verwendet, indem für die Untersuchung der Serumstabilität eine Konzentration von 40 pmol pro 2 ml frisch gewonnenem Blutserum gewählt wurde (**Kapitel 3.6.1**). In der Tat unterlagen bei diesen Konzentrationen alle getesteten Substanzen einem enzymatischen Abbau (**Abbildung 32**).

Den bei 37°C inkubierten Lösungen wurden nach bestimmten Zeitpunkten Proben entnommen und mit HPLC (**S2, G1**) untersucht. Es wurde der Anteil der noch intakten im Verhältnis zur gesamten eingesetzten Substanz bestimmt.

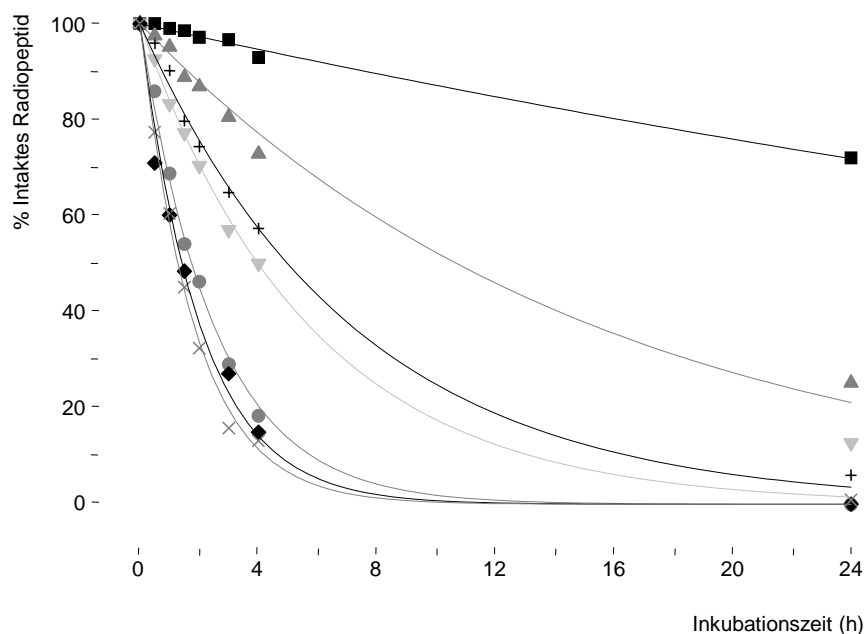
---



Die resultierenden Messwerte wurden mit dem Programm Origin unter Annahme eines Reaktionsgeschwindigkeitsgesetzes erster Ordnung ausgewertet und die entsprechenden Halbwertszeiten der einzelnen Verbindungen berechnet. Die Reihenfolge der Stabilitäten präsentierte sich wie folgt:

[<sup>111</sup>In-DTPA]-Minigastrin 0 (50.39 h Halbwertszeit), [<sup>111</sup>In-DOTA]-Minigastrin 9 (10.74 h), [<sup>111</sup>In-DOTAGA]-Minigastrin 11 (4.99 h), [<sup>111</sup>In-DOTA]-Minigastrin 10 (3.99 h), [<sup>111</sup>In-DTPA]-Minigastrin 11 (1.84 h), [<sup>111</sup>In-DOTA]-Minigastrin 11 (1.75 h) und [<sup>111</sup>In-DOTA]-[Nle]<sup>15</sup>-Minigastrin 11 (1.42 h).

**Abbildung 32:** Serumstabilitäten der In-markierten Minigastrin-Derivate

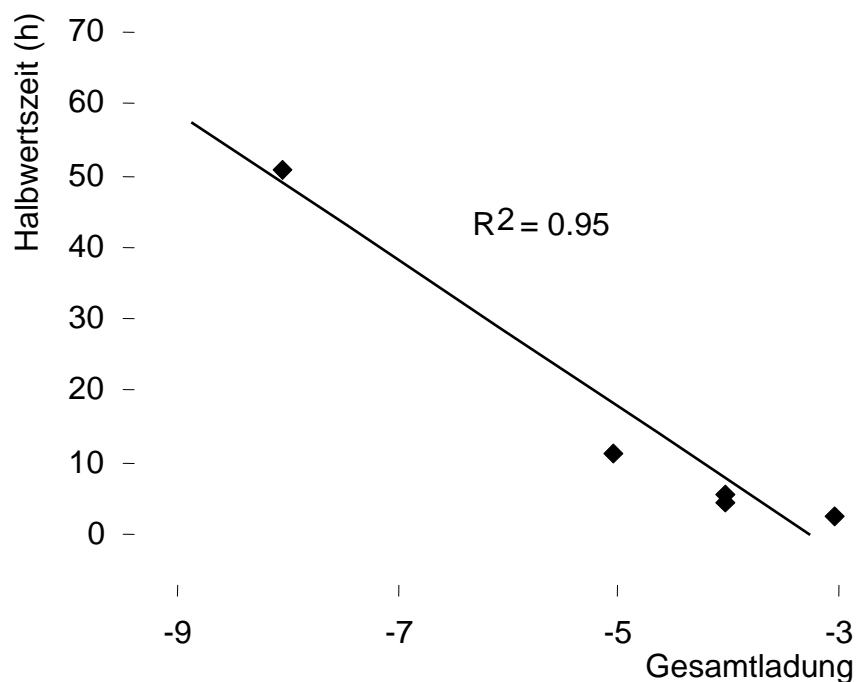


■ = [In-DTPA]-Minigastrin 0, ▲ = [In-DOTA]-Minigastrin 9, ▼ = [In-DOTA]-Minigastrin 10, + = [In-DOTAGA]-Minigastrin 11, ● = [In-DTPA]-Minigastrin 11, ◆ = [In-DOTA]-Minigastrin 11, × = [In-DOTA]-[Nle]<sup>15</sup>-Minigastrin 11

Es fällt auf, dass bei dem Derivat von Minigastrin 0, welches eine Aminosäuresequenz von fünf L-Glutamaten enthält, die Stabilität am höchsten war und mit abnehmender Anzahl der Glutamate abnahm. Das DOTAGA-Derivat von Minigastrin 11 wies im Vergleich zum entsprechenden DOTA-Derivat eine längere Halbwertszeit auf.

Wahrscheinlich verursacht die grössere Anzahl von negativ geladenen Stellen eine erhöhte Serumstabilität. Setzt man die Halbwertszeit der einzelnen Substanzen mit den Gesamtladungen dieser Substanzen in Beziehung, so kann man eine Korrelation, wobei der Gütefaktor des linearen Fittings erstaunlich hoch ist ( $R^2 = 0.95$ ) (**Abbildung 33**).

**Abbildung 33:** Korrelation der Serumstabilität mit der Ladung



Lineares Fitting

Der Austausch von Methionin durch Norleucin in der Sequenz von DOTA-Minigastrin erbrachte keine Steigerung der Serumstabilität. Somit scheint die Stelle um diese Aminosäure kein Angriffspunkt für Enzyme zu sein.

#### 4.2.5 Internalisierung

Als Internalisierung bezeichnet man den Rückzug von oberflächengebundenen Rezeptoren in das Innere der Zelle. Dies kann geschehen, wenn Rezeptoren durch einen entsprechenden Liganden angeregt werden (155). Während man früher davon ausging, dass nur Agonisten internalisiert werden, so weiss man heute, dass auch Antagonisten internalisiert werden können (156). Antagonisten sind Substanzen, welche einen agonistisch wirkenden Stoff unter Blockierung seines Rezeptors in seiner Wirkung hemmen, ohne selbst einen Effekt auszulösen.

Die Liganden, welche bei einer Internalisierung am Rezeptor gebunden bleiben, werden sequestriert, das heisst dieser Wirkstoff akkumuliert sich im Innern der entsprechenden Zelle (150). Das hat verschiedene Vorteile: der Wirkstoff, in unserem Falle das Radiopeptid, wird in die Nähe des Nukleus und somit der DNS der Tumorzelle gebracht. Gerade bei Verwendung von sehr kurzreichweitigen Strahlern wie z.B. Auger-Emittern ist dies wichtig, um so die DNS der Tumorzellen effektiv zu schädigen (5). Durch die Internalisierung entzieht sich das Radiopeptid aber auch den im Blut befindlichen Enzymen. Falls ein enzymatischer Abbau erst im Innern der Zelle erfolgen sollte, so wird die radioaktive Strahlung immer noch die Tumorzelle bestrahlen, sofern die entstehenden Bruchstücke die Zelle nicht rasch verlassen.

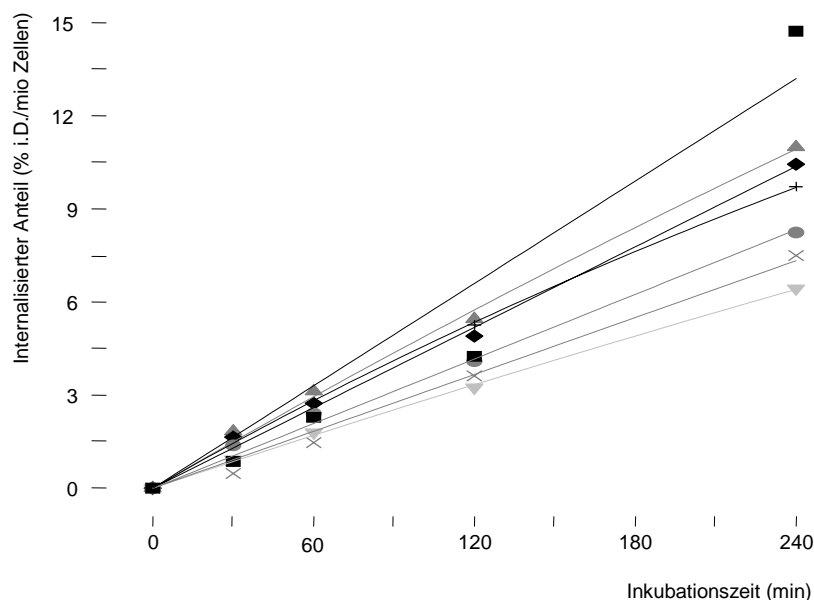
Für die Untersuchung der Internalisierungseigenschaften wurden hier Tumorzellen des Typs AR4-2J verwendet, eine Zelllinie, welche nebst einer ganzen Reihe anderer Rezeptoren auch den für uns interessanten CCK<sub>2</sub>-Rezeptor exprimiert (157). Bei dieser Zelle handelt es sich um eine Pankreas-Tumorzelllinie, welche aus Ratten stammt.

---

Zu einer Million dieser Zellen wurde jeweils 0.25 pmol der zu untersuchenden, <sup>111</sup>In-markierten Substanz beigefügt und bei 37°C gemäss Kapitel **3.6.2** inkubiert. Zur Differenzierung von durch Rezeptorinternalisation und durch unspezifische Prozesse aufgenommener Radioaktivität, wurden pro 6-well Platte jeweils bei 3 wells zusätzlich zum Radiopeptid noch 3 nmol (10'000 facher Überschuss) DOTA-Minigastrin 11 beigefügt. Diese Blockierung führt zu einer Absättigung der vorhandenen Rezeptoren, so dass die gesamte dann noch durch die Zelle aufgenommene Radioaktivität aus nicht-spezifischen Prozessen stammen muss. Nach jeweils 30 min, 1 h, 2 h oder 4 h wurde die Inkubation gestoppt und die Platten weiterverarbeitet (33, 140). Die Radioaktivität aller gesammelten Fraktionen wurde im  $\gamma$ -counter quantifiziert. Die internalisierte Radioaktivität wurde als Differenz zwischen nicht blockierter und blockierter Aufnahme berechnet und als prozentualer Anteil der den Tumorzellen beigefügten Aktivität angegeben (**Abbildung 34**).

---

**Abbildung 34:** Internalisierungen der Minigastrin-Derivate



■ = [In-DTPA]-Minigastrin 0, ▲ = [In-DOTA]-Minigastrin 9, ▼ = [In-DOTA]-Minigastrin 10, + = [In-DOTAGA]-Minigastrin 11, ● = [In-DTPA]-Minigastrin 11, ◆ = [In-DOTA]-Minigastrin 11, × = [In-DOTA]-[Nle]<sup>15</sup>-Minigastrin 11

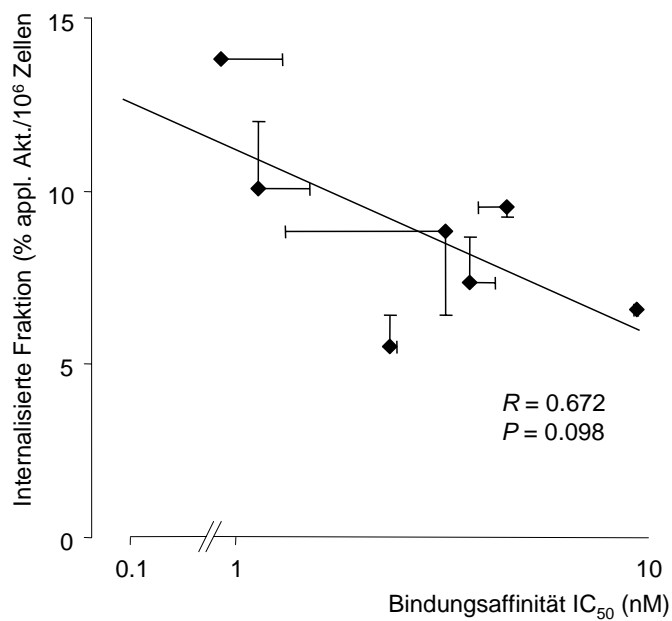
Die internalisierten Fraktionen nach 4 h Inkubationszeit zeigten folgende Reihenfolge auf: [<sup>111</sup>In-DOTA]-Minigastrin 10 (6.43 % ± 0.87 % der zugegebenen Radioaktivität pro 10<sup>6</sup> Zellen, n = 3), [<sup>111</sup>In-DOTA]-[Nle]<sup>15</sup>-Minigastrin 11 (7.50 %, n = 1), [<sup>111</sup>In-DTPA]-Minigastrin 11 (8.24 % ± 1.32 %, n = 3), [<sup>111</sup>In-DOTAGA]-Minigastrin 11 (9.72 % ± 2.39 %, n = 4), [<sup>111</sup>In-DOTA]-Minigastrin 11 (10.44 % ± 0.27 %, n = 3), [<sup>111</sup>In-DOTA]-Minigastrin 9 (10.99 % ± 1.90 %, n = 4), [<sup>111</sup>In-DTPA]-Minigastrin 0 (14.73 %, n = 1) (**Abbildung 34**).

Alle internalisierten Fraktionen nach 4 h Inkubation wurden durch die Zugabe der Blockiersubstanz DOTA-Minigastrin 11 auf einen Wert unter 0.5 % gebracht ( $P < 0.001$ ). Somit wiesen alle getesteten Substanzen eine rezeptorspezifische Internalisierung in AR4-2J Zellen auf.

Die Oberflächen-gebundene Fraktion (mit Glycin-Puffer ablösbar) betrug jeweils unter 2 % der applizierten Radioaktivität.

Die Internalisierungsrate nach 4 h Inkubation korrelierte mit der Bindungsaffinität der entsprechenden Substanz, wobei allerdings dieser Trend nicht signifikant war ( $R = 0.67$ , **Abbildung 35**).

**Abbildung 35:** Korrelation der Internalisierung mit der Bindungsaffinität



#### 4.2.6 Bioverteilung

Die Bioverteilung im lebenden Tier stellt den wahrscheinlich aussagekräftigsten präklinischen Versuch dar. Zwar sind die damit erhaltenen Daten nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragbar, aber das Tier stellt mit seinem gesamten Metabolismus und seiner Physiologie ein ähnlich komplexes System dar wie der Mensch.

Für die hier entwickelten Minigastrin-Derivate wurde ein Tiermodell verwendet, bei dem männlichen Lewis-Ratten AR4-2J Tumorzellen in das rechte Hinterbein inokuliert wurden (siehe Kapitel **3.6.3**). Diesen Tieren wurde nach Ausbildung eines lokalen Tumors der entsprechende Radioligand appliziert. Für die Bestimmung der unspezifischen Organanreicherung wurden zusätzlich zum Radioliganden 100 µg DOTA-Minigastrin 11 appliziert, was die vorhandenen CCK<sub>2</sub>-Rezeptoren absättigte. Nach einer gewissen Inkubationszeit (4 h, 24 h) wurden die Tiere getötet, die Organe entnommen und die darin vorhandene Radioaktivität quantifiziert. Die Aufnahmen in den einzelnen Organen sind in **Tabelle 19** als prozentualer Anteil der applizierten Radioaktivität pro Gramm Gewebe des entsprechenden Organs (% I.A./g Gewebe) aufgeführt.

---

**Tabelle 19:** Bioverteilungsdaten der Minigastrin-Derivate

Substanz	Tumor	Magen	Pankreas	Leber	Nieren	Milz	Darm	Lunge	Herz	Knochen	Blut	Tumor/ Nieren	Tumor/ Magen	Tumor/ Pankreas
[ <sup>111</sup> In-DTPA]-Minigastrin 0 4 h (n=5) <sup>7</sup>	0.638 ±0.112	0.164 ±0.011	0.013 ±0.003	0.038 ±0.005	8.660 ±0.437	0.086 ±0.007	0.025 ±0.004	0.019 ±0.002	0.011 ±0.001	0.031 ±0.005	0.045 ±0.031	0.07	3.88	47.81
[ <sup>111</sup> In-DTPA]-Minigastrin 0 24 h (n=2)	0.575 ±0.224	0.177 ±0.004	0.025 ±0.019	0.033 ±0.003	10.539 ±4.113	0.077 ±0.004	0.024 ±0.004	0.024 ±0.012	0.010 ±0.001	0.034 ±0.002	0.010 ±0.002	0.05	3.25	23.00
[ <sup>111</sup> In-DOTA]-Minigastrin 9 4 h (n=5)	0.677 ±0.401 <sup>3</sup>	0.143 ±0.045	0.007 ±0.002	0.029 ±0.003	1.457 ±0.225 <sup>2</sup>	0.04 ±0.007	0.036 ±0.039	0.018 ±0.001	0.010 ±0.001	0.020 ±0.002	0.022 ±0.007	0.46	11.10	94.15
[ <sup>111</sup> In-DOTA]-Minigastrin 9 4 h (n=5), blocked <sup>1</sup>	0.110 ±0.004 <sup>4</sup>	0.010 ±0.001	0.003 ±0.001	0.032 ±0.002	1.126 ±0.127	0.034 ±0.004	0.009 ±0.001	0.010 ±0.001	0.005 ±0.001	0.014 ±0.002	0.005 ±0.001			
[ <sup>111</sup> In-DOTA]-Minigastrin 9 24 h (n=3)	0.449 ±0.308	0.047 ±0.018	0.005 ±0.002	0.022 ±0.008	1.217 ±0.547 <sup>6</sup>	0.025 ±0.004	0.013 ±0.002	0.010 ±0.001	0.006 ±0.001	0.013 ±0.003	0.004 ±0.000	0.37	9.55	89.80
[ <sup>111</sup> In-DOTA]-Minigastrin 10 4 h (n=5)	0.319 ±0.148 <sup>2</sup>	0.061 ±0.009	0.008 ±0.006	0.021 ±0.002	0.315 ±0.017 <sup>2</sup>	0.022 ±0.003	0.012 ±0.001	0.014 ±0.001	0.008 ±0.001	0.012 ±0.000	0.016 ±0.002	1.01	5.23	38.85
[ <sup>111</sup> In-DOTA]-Minigastrin 10 24 h (n=3)	0.279 ±0.215	0.023 ±0.011	0.005 ±0.003	0.015 ±0.003	0.382 ±0.014 <sup>2</sup>	0.013 ±0.002	0.008 ±0.001	0.009 ±0.001	0.004 ±0.000	0.010 ±0.002	0.002 ±0.001	0.73	12.13	34.88



Substanz	Tumor	Magen	Pankreas	Leber	Nieren	Milz	Darm	Lunge	Herz	Knochen	Blut	Tumor/ Nieren	Tumor/ Magen	Tumor/ Pankreas
[ <sup>111</sup> In-DOTA]-Minigastrin 11 4 h (n=4)	0.314 ±0.036 <sup>2</sup>	0.049 ±0.008	0.005 ±0.004	0.018 ±0.002	0.355 ±0.066 <sup>2</sup>	0.023 ±0.002	0.014 ±0.003	0.012 ±0.001	0.006 ±0.000	0.009 ±0.002	0.015 ±0.004	0.89	6.42	68.72
[ <sup>111</sup> In-DOTA]-Minigastrin 11 4 h (n=5) blocked <sup>1</sup>	0.042 ±0.008 <sup>5</sup>	0.008 ±0.002	0.004 ±0.003	0.019 ±0.002	0.310 ±0.024	0.022 ±0.004	0.018 ±0.007	0.013 ±0.001	0.007 ±0.000	0.009 ±0.001	0.014 ±0.006			
[ <sup>111</sup> In-DOTA]-Minigastrin 11 24 h (n=3)	0.339 ±0.007	0.023 ±0.011	0.005 ±0.001	0.024 ±0.006	0.343 ±0.037 <sup>2</sup>	0.028 ±0.004	0.013 ±0.003	0.013 ±0.002	0.007 ±0.001	0.014 ±0.002	0.006 ±0.000	0.99	14.74	67.80
[ <sup>111</sup> In-DOTAGA]-Minigastrin 11 4 h (n=4)	0.341 ±0.086 <sup>2</sup>	0.068 ±0.020	0.003 ±0.001	0.018 ±0.001	0.334 ±0.012 <sup>2</sup>	0.024 ±0.002	0.015 ±0.003	0.013 ±0.001	0.006 ±0.002	0.011 ±0.001	0.016 ±0.006	1.02	4.98	107.07
[ <sup>111</sup> In-DOTAGA]-Minigastrin 11 24 h (n=3)	0.279 ±0.186	0.045 ±0.011	0.004 ±0.001	0.020 ±0.006	0.395 ±0.061 <sup>2</sup>	0.016 ±0.002	0.010 ±0.003	0.010 ±0.002	0.005 ±0.001	0.014 ±0.001	0.003 ±0.001	0.71	6.20	69.75
[ <sup>111</sup> In-DOTA]-[Nle]-Minigastrin 11 4 h (n=3)	0.796 ±0.429	0.065 ±0.019	0.008 ±0.007	0.021 ±0.003	0.354 ±0.028 <sup>2</sup>	0.027 ±0.003	0.014 ± 0.000	0.013 ±0.002	0.006 ±0.001	0.013 ±0.001	0.006 ±0.001	2.25	12.25	99.50
[ <sup>111</sup> In-DOTA]-[Nle]-Minigastrin 11 24 h (n=3)	0.240 ±0.161	0.012 ±0.007	0.004 ±0.001	0.016 ±0.005	0.345 ±0.071 <sup>2</sup>	0.018 ±0.002	0.010 ±0.003	0.012 ±0.001	0.005 ±0.001	0.013 ±0.004	0.003 ±0.001	0.70	20.00	60.00

Uptake als %IA/g Gewebe als Durchschnittswert ± Standardabweichung; <sup>1</sup>Blockiert mit 100 µg DOTA-Minigastrin 11, coinjiziert mit dem Radiopeptid; <sup>2</sup> $P < 0.01$  vs. [<sup>111</sup>In-DTPA]-Minigastrin 0; <sup>3</sup> $P = 0.85$  vs. [<sup>111</sup>In-DTPA]-Minigastrin 0; <sup>4</sup> $P = 0.04$  vs. unblockiertes [<sup>111</sup>In-DOTA]-Minigastrin 9; <sup>5</sup> $P < 0.01$  vs. unblockiertes [<sup>111</sup>In-DOTA]-Minigastrin 11; <sup>6</sup> $P < 0.05$  vs. [<sup>111</sup>In-DTPA]-Minigastrin 0; <sup>7</sup>n = Anzahl getesteter Tiere

---

Der Unterschied in der Tumoranreicherung zwischen [ $^{111}\text{In}$ -DOTA]-Minigastrin 11 ( $0.31\% \pm 0.04\%$  I.A./g Gewebe) und [ $^{111}\text{In}$ -DOTAGA]-Minigastrin 11 ( $0.34\% \pm 0.09\%$ ) nach 4 h Inkubation war nicht signifikant ( $P = 0.71$ ). Der Einfluss des Chelators scheint also gering zu sein.

Der Unterschied von [ $^{111}\text{In}$ -DTPA]-Minigastrin 0 ( $0.64\% \pm 0.11\%$ ) zu [ $^{111}\text{In}$ -DOTA]-Minigastrin 11 ( $P < 0.01$ ) nach 4 h war genauso signifikant wie auch zu [ $^{111}\text{In}$ -DOTAGA]-Minigastrin 11 und [ $^{111}\text{In}$ -DOTA]-Minigastrin 10. Hier scheint die Reduktion der Anzahl an Glutamaten in der Sequenz eine Auswirkung auf die Anreicherung im Tumor zu haben. [ $^{111}\text{In}$ -DOTA]-Minigastrin 9 ( $0.68\% \pm 0.40\%$ ) aber wies eine vergleichbar hohe Anreicherung nach 4 h Inkubation auf wie die Referenzsubstanz [ $^{111}\text{In}$ -DTPA]-Minigastrin 0. Den deutlich höchsten Tumouruptake zeigte allerdings [ $^{111}\text{In}$ -DOTA]-[Nle] $^{15}$ -Minigastrin 11 ( $0.80\% \pm 0.43\%$ ).

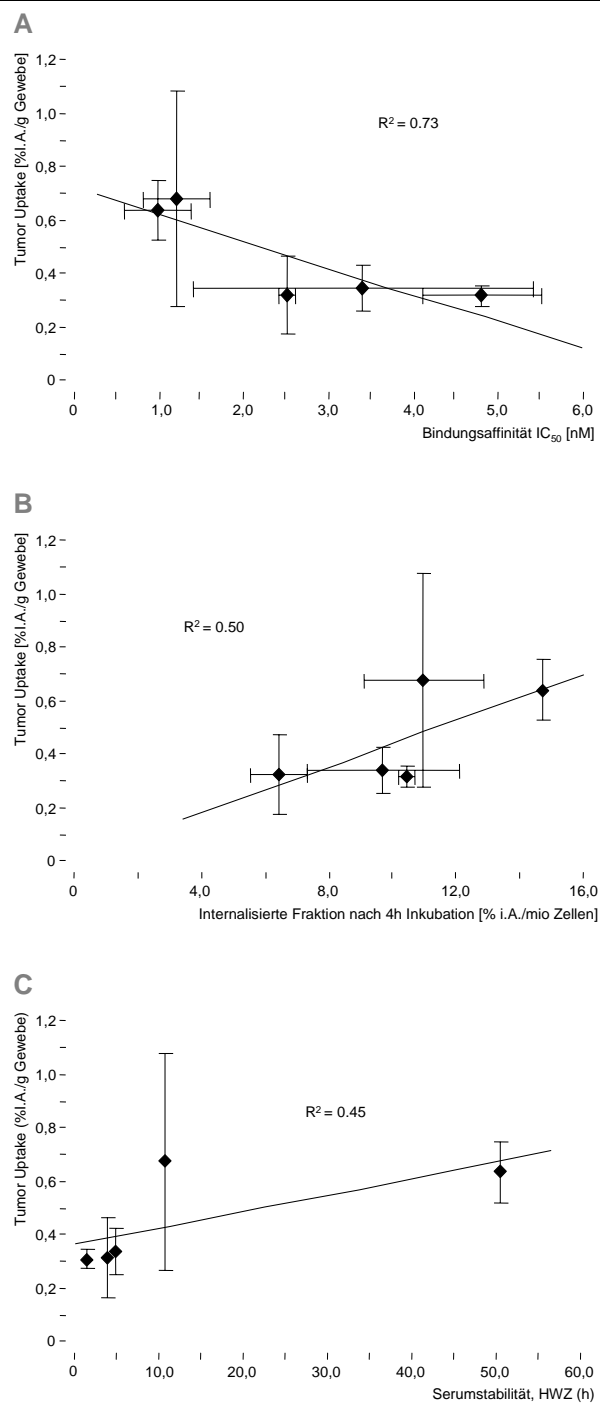
Nimmt man die Daten von [ $^{111}\text{In}$ -DTPA]-Minigastrin 0, [ $^{111}\text{In}$ -DOTA]-Minigastrin 9, [ $^{111}\text{In}$ -DOTA]-Minigastrin 10, [ $^{111}\text{In}$ -DOTA]-Minigastrin 11 und [ $^{111}\text{In}$ -DOTAGA]-Minigastrin 11 nach 4 h Inkubation zur Grundlage, so zeigt die Aufnahme im Tumor eine positive Korrelation mit der Bindungsaffinität der entsprechenden Substanz ( $R^2 = 0.73$ ), mit der Internalisierungsrate nach 4 h Inkubationszeit ( $R^2 = 0.50$ ) und auch mit der Stabilität in Serum ( $R^2 = 0.45$ ; **Abbildung 36**).

Die Anreicherung nach 4 h Inkubation von [ $^{111}\text{In}$ -DOTA]-Minigastrin 11 im Tumor konnte durch Zugabe eines Überschuss DOTA-Minigastrin 11 genauso blockiert werden (Reduktion um  $87\%$ ;  $P < 0.01$ ) wie auch der Tumouruptake von [ $^{111}\text{In}$ -DOTA]-Minigastrin 9 (Reduktion um  $84\%$ ;  $P < 0.01$ ). Dies beweist, dass die Aufnahme der Radiopharmaka durch den Tumor spezifisch stattfindet. Eine ähnlich gute Blockierung konnte nur noch im Magen erreicht

---

werden, wobei auch hier bekannt ist, dass es sich beim Magen um ein CCK<sub>2</sub>-Rezeptor-positives Gewebe handelt. Alle anderen Organe zeigten einen praktisch unveränderten Uptake des Radiopeptids.

**Abbildung 36:** Korrelation zwischen Tumor Uptake nach 4 h Inkubation und Bindungsaffinität (A), Internalisierter Fraktion nach 4 h Inkubation (B) und Serumstabilität (C)

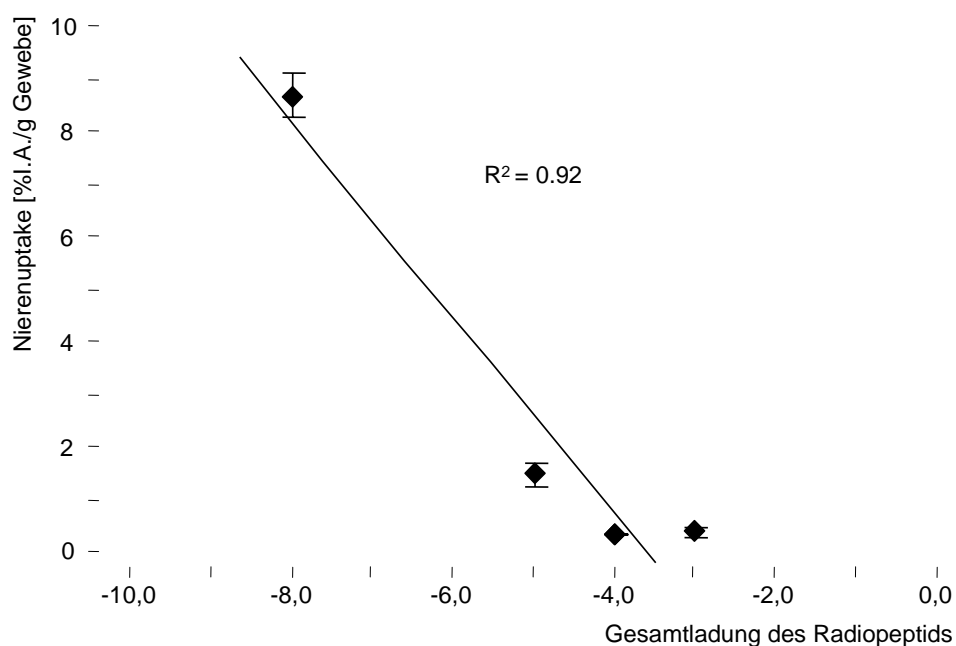


In der Einleitung wurde bereits erwähnt, dass die Nieren bei den bestehenden Radiopharmazeutika, welche an den CCK<sub>2</sub>-Rezeptor binden, das dosislimitierende Organ sind. Die hohe Anreicherung in den Nieren zeigte sich in unseren Experimenten bei der Referenzsubstanz [<sup>111</sup>In-DTPA]-Minigastrin 0 mit einem Wert von 8.66 % ± 0.44 % nach 4 h Inkubation. Sämtliche hier entwickelten, neuen Substanzen wiesen demgegenüber einen deutlichen Rückgang des Nierenuptakes auf. Während bei [<sup>111</sup>In-DOTA]-Minigastrin 9 der Wert nach 4 h noch bei über 1 % lag (1.46 % ± 0.23 %), so war er bei den Derivaten von Minigastrin 10 und Minigastrin 11 bereits unter 0.4 %. Dies hat zur Folge, dass die daraus berechneten Quotienten Tumor-/ Nieren-Anreicherung im Vergleich zur Referenzsubstanz deutlich ansteigen. In der nuklearmedizinischen Praxis wird dies einerseits zu verbesserter szintigraphischer Darstellung von Tumoren führen, und erweitert andererseits auch das therapeutische Fenster. Das heisst, dass einem Patienten eine höhere Radioaktivitätsdosis verabreicht werden kann, ohne dass dabei Nierentoxizität auftreten sollte. Der beobachtete Nierenuptake zeigt eine positive Korrelation mit der Gesamtladung der getesteten Substanz. Je tiefer die Gesamtladung ist, je weniger negativ geladene Glutamate die Aminosäuresequenz also aufweist, desto tiefer ist auch der entsprechende Nierenuptake (**Abbildung 37**).

Der Magen als ebenfalls CCK<sub>2</sub> Rezeptor-positives Organ könnte auch ein potenzielles Problem bzw. dosislimitierendes Organ für ein entsprechendes Radiopharmazeutikum darstellen. Aber auch hier hat sich gezeigt, dass das Tumor-/ Magen-Verhältnis für die Anreicherung gegenüber der Referenzsubstanz verbessert ist.

---

**Abbildung 37:** Korrelation zwischen Nierenuptake und Gesamtladung des Radiopeptids



Die Blut-clearance (Abnahme der im Blut vorhandenen Radioaktivität) aller getesteten Verbindungen verlief rasch und resultierte in Werten von unter 0,05 % I.A./g Blut nach 4 h.

Die Tumor-Uptakewerte nach 24 h lagen in einem vergleichbaren Bereich wie nach 4 h Inkubation. Die beobachteten Unterschiede waren nicht signifikant: [ $^{111}\text{In}$ -DTPA]-Minigastrin 0:  $P = 0.402$ , [ $^{111}\text{In}$ -DOTA]-Minigastrin 9:  $P = 0.377$ , [ $^{111}\text{In}$ -DOTA]-Minigastrin 10:  $P = 0.617$ , [ $^{111}\text{In}$ -DOTA]-Minigastrin 11:  $P = 0.402$ , [ $^{111}\text{In}$ -DOTA]-[Nle $^{15}$ ]-Minigastrin 11:  $P = 0.204$ , [ $^{111}\text{In}$ -DOTAGA]-Minigastrin 11:  $P = 0.687$ . Bei den Versuchen über 24 h waren zum Teil recht hohe Standardabweichungen zu beobachten, wobei bei einzelnen Tieren die Tumoren recht gross und auch nekrotisch waren. Die beobachtete, geringe Abnahme des Tumoruptake über 24 h ist Voraussetzung für eine therapeutische Verwendung entsprechender Radiopharmaka, um so eine ausreichend lange Bestrahlung des Tumorgewebes sicherzustellen (140).

Die Ursache für den hohen Tumoruption von [ $^{111}\text{In}$ -DOTA]-[Nle] $^{15}$ -Minigastrin 11 nach 4 h ist unklar. Die hohe Standardabweichung kann aber ein Hinweis darauf sein, dass dieser Wert einen Ausreisser darstellt, insbesondere da die Anreicherung nach 24 h im Rahmen der anderen, vergleichbaren Substanzen liegt.

#### 4.2.7 Szintigraphie von [ $^{111}\text{In}$ -DOTA]-Minigastrin 11

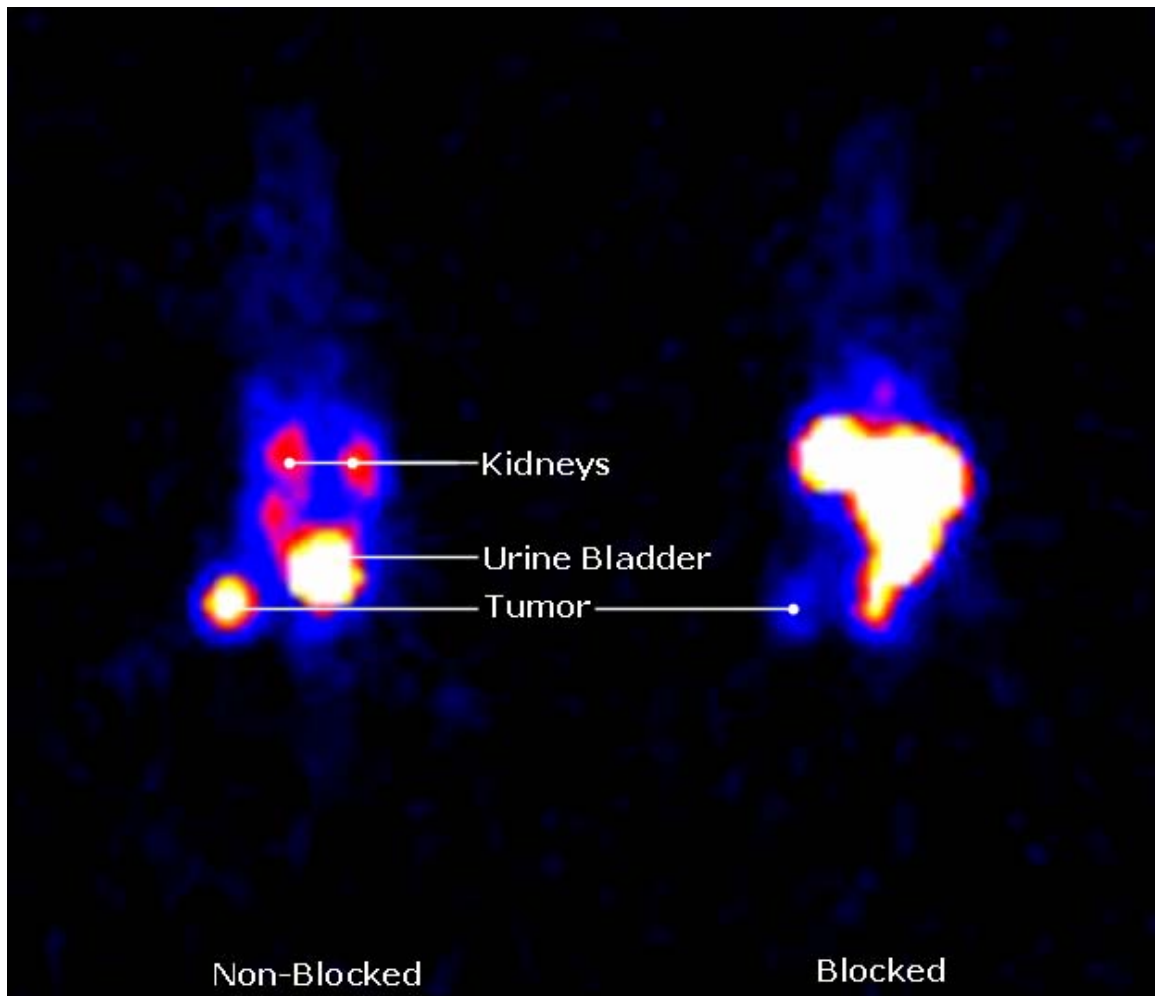
Zum Nachweis der prinzipiellen Durchführbarkeit einer szintigraphischen Darstellung von CCK $_2$ -Rezeptor positivem Tumorgewebe durch [ $^{111}\text{In}$ -DOTA]-Minigastrin 11 wurden von zwei AR4-2J-Tumor tragenden Lewisratten entsprechende Aufnahmen gemacht. Dazu wurden die Tiere gleich behandelt wie bei einer Bioverteilungsstudie, 4 h nach Applikation der Radiopharmazeutika narkotisiert und mit CO $_2$  getötet. Die Tiere wurden dann auf einer SPECT/CT-Kamera platziert.

So wurden planare Szintigraphien von zwei Tieren aufgenommen, wobei im einen Tier durch Gabe eines Überschusses DOTA-Minigastrin 11 der spezifische Uptake des Radiopeptids unterdrückt wurde, während im anderen Tier auf diese Blockierung verzichtet wurde (**Abbildung 38**).

Der Tumoruption von [ $^{111}\text{In}$ -DOTA]-Minigastrin 11 war bei dem Tier, welchem keine Blockiersubstanz appliziert wurde, deutlich dargestellt. Nach Gabe der Blockiersubstanz wurde im zweiten Tier der Uptake im Tumor stark unterdrückt, während der Uptake in den anderen Organen nicht sichtbar reduziert wurde. Diese szintigraphische Beobachtung steht im Einklang mit den entsprechenden Bioverteilungsdaten.

---

**Abbildung 38:** Planare Szintigraphie von [ $^{111}\text{In}$ -DOTA]-Minigastrin 11

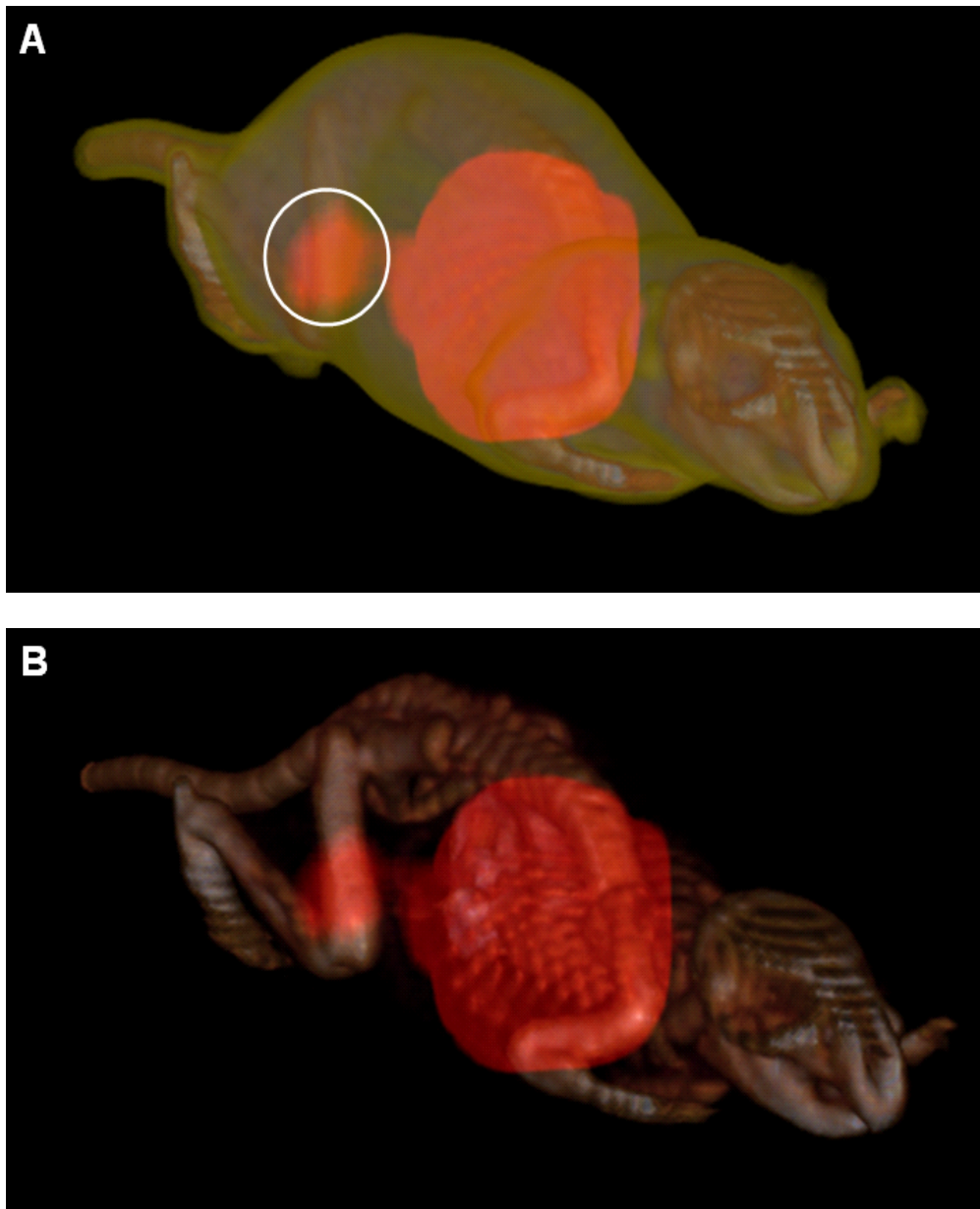


Rechts: Blockierung des Tumoruptake durch Überschuss DOTA-Minigastrin 11. Links: keine Blockierung des Tumoruptake

Als zweite Aufnahmemodalität wurden iterativ rekonstruierte SPECT Bilder (8 Iterationen) mit einer dreidimensionalen Rekonstruktion des Spiral-CT (1.25 mm Schichtdicke, 130 kV, 48 mAs) überlagert (**Abbildung 39**). Dabei wurden einmal eine Überlagerung des SPECT mit einer Weichteilaufnahme (**A**) und einmal eine Überlagerung mit der Darstellung der Knochen des Tieres (**B**) durchgeführt. Die resultierenden SPECT/CT Bilder zeigten klar die

Lokalisation der erhöhten Aufnahme im Bereich des Hinterbeines der Ratte. Dies entspricht auch der Lokalisation des applizierten AR4-2J Tumors.

**Abbildung 39:** SPECT/CT Bild einer AR4-2J Tumor tragenden Lewisratte nach Applikation von [ $^{111}\text{In}$ -DOTA]-Minigastrin 11



Tumorlokalisierung am Hinterbein: ○; dreidimensionale Rekonstruktion der Weichteile (A) und des Skeletts (B)



### 4.3 Komplexe von DOTA und DOTAGA mit $Y^{3+}$ und $Lu^{3+}$

#### 4.3.1 Stabilitätsuntersuchung

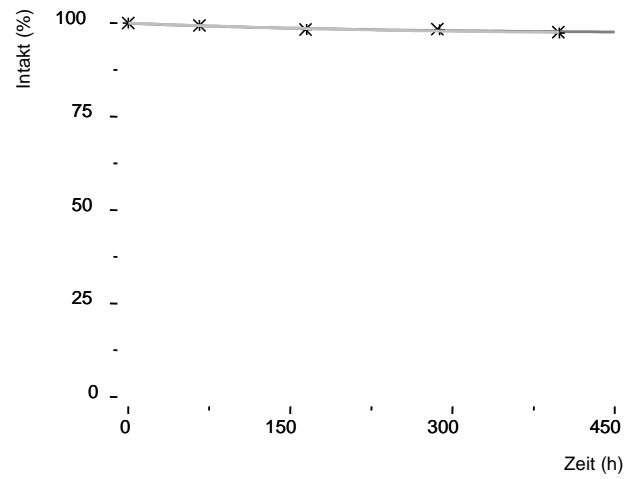
Die beiden Substanzen [ $^{177}Lu$ -DOTA]-D-Phe-NH<sub>2</sub> und [ $^{177}Lu$ -DOTAGA]-D-Phe-NH<sub>2</sub> wurden gemäss Kapitel 3.5.2 jeweils sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 37 °C mit einem mehr als 5'500-fachen Überschuss Ca-DTPA inkubiert, womit dekomplexiertes Radiometall abgefangen wird. Die so beobachteten Dekomplexierungen waren bei beiden Komplexen gering; nach einer Inkubationszeit über 10 d resultierten weniger als 2 % dekomplexiertes  $^{177}Lu$  (**Abbildung 40**). Diese hohe Stabilität bestätigt bisherige Beobachtungen über die Stabilität solcher makrozyklischen Komplexe (158).

Die Stabilität ist gegenüber jener von Komplexen mit offenkettigen Chelatoren deutlich höher, was gerade bei Applikationen von therapeutischen Dosen eines Radiopharmazeutikums im Patienten von Bedeutung ist, um dort unerwünschte Bestrahlung von nicht-Zielorganen zu verhindern. Beide verwendeten Chelatoren zeigten vergleichbar hohe Stabilitäten.

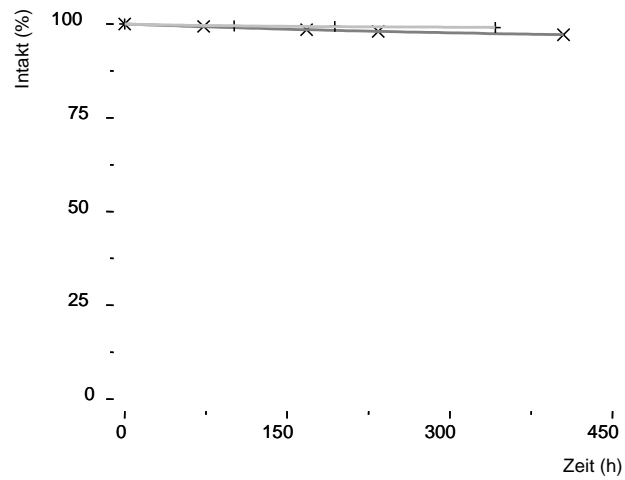
---

**Abbildung 40:** Stabilität der Modellkomplexe [ $^{177}\text{Lu}$ -DOTA]-D-Phe-NH<sub>2</sub> (x) und [ $^{177}\text{Lu}$ -DOTAGA]-D-Phe-NH<sub>2</sub> (+)

**A**



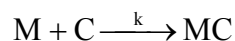
**B**



**A** = Inkubation bei Raumtemperatur; **B** = Inkubation bei 37 °C.

### 4.3.2 Mathematische Grundlagen der Komplexbildungskinetik

Die Komplexierung eines Chelators C mit einem Metall M kann wie folgt beschrieben werden:



Mit der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante  $k$  kann die Zeitabhängigkeit der Komplexbildungsreaktion in einem Geschwindigkeitsgesetz zweiter Ordnung beschrieben werden:

$$\frac{d[MC]_t}{dt} = k * [M]_t * [C]_t \quad (5)$$

Sind die Startbedingungen des Experiments so gewählt, dass die Chelatorkonzentration die Metallkonzentration deutlich übertrifft ( $[C]_0 \gg [M]_0$ ), so kann die Chelatorkonzentration über den gesamten Zeitraum des Versuches als konstant betrachtet werden ( $[C]_t = [C]_0 = \text{const.}$ ). Die beobachtete Reaktionsgeschwindigkeitskonstante  $k_{\text{obs}}$ , welche definiert werden kann als  $k_{\text{obs}} = k * [C]_0$ , kann somit in die Gleichung (5) eingesetzt werden, wodurch sich diese vereinfachen lässt:

$$\frac{d[MC]_t}{dt} = -k_{\text{obs}} * [M]_t \quad (6)$$

Die Konzentration des freien Metalls in Abhängigkeit von der Zeit kann beschrieben werden als  $[M]_t = [M]_0 - [MC]_t$ , woraus durch Einsetzen in Gleichung (6) folgt:

$$\frac{d[\text{MC}]_t}{dt} = -k_{\text{obs}} * ([\text{M}]_0 - [\text{MC}]_t) \text{ oder } \frac{d[\text{MC}]_t}{[\text{M}]_0 - [\text{MC}]_t} = -k_{\text{obs}} * dt \quad (7)$$

Durch Integration über die Zeit erhält man:

$$\int_0^t \frac{d[\text{MC}]_t}{[\text{M}]_0 - [\text{MC}]_t} = -\int_0^t k_{\text{obs}} * dt \text{ bzw. } \ln\left(\frac{[\text{M}]_0 - [\text{MC}]_t}{[\text{M}]_0}\right) = -k_{\text{obs}} * t,$$

ausgedrückt in exponentieller Form  $\frac{[\text{M}]_0 - [\text{MC}]_t}{[\text{M}]_0} = e^{-k_{\text{obs}} * t} \rightarrow 1 - \frac{[\text{MC}]_t}{[\text{M}]_0} = e^{-k_{\text{obs}} * t}$  bzw.

$$[\text{MC}]_t = [\text{M}]_0 * (1 - e^{-k_{\text{obs}} * t}) \quad (8)$$

Durch die experimentell erhobenen Daten wird eine Gleichung der Form (8) angepasst und so die beobachtete Geschwindigkeitskonstante  $k_{\text{obs}}$  ( $M^{-1} * s^{-1}$ ) erhalten, welche durch Anwendung der Formel  $k_{\text{obs}} = k * [\text{C}]_0$  umgeformt werden kann in die Geschwindigkeitskonstante  $k$  ( $s^{-1}$ ).

Wird die Chelatorkonzentration zu Beginn der Inkubation identisch mit der Metallionenkonzentration gewählt, so führt die Integration des Geschwindigkeitsgesetzes (5) zu

$$\frac{1}{[A]} - \frac{1}{[A]_0} = k_{\text{obs}} * t \quad (9)$$

Die grafische Darstellung von  $\frac{1}{[A]}$  gegen  $t$  muss eine Gerade mit der Neigung  $k_{obs}$  und dem Achsenabschnitt  $\frac{1}{[A]_0}$  ergeben. Da aber  $[A]_0$  bekannt ist, kann somit die Geschwindigkeitskonstante  $k_{obs}$  berechnet werden.

### **4.3.3 Komplexbildungskinetik**

#### **4.3.3.1 *Komplexbildungskinetik nach einem Geschwindigkeitsgesetz pseudoerster Ordnung***

Zur Ermittlung der Komplexbildungskinetik nach einem Geschwindigkeitsgesetz pseudoerster Ordnung wurden Inkubationen bei Metallkonzentration von jeweils 1  $\mu\text{M}$  und Chelatorkonzentrationen von 100  $\mu\text{M}$  durchgeführt. Diese Komplexierungen erfolgten bei verschiedenen pH Werten, um dadurch den Einfluss des pH Wertes auf die Komplexbildungskonstante zu untersuchen.

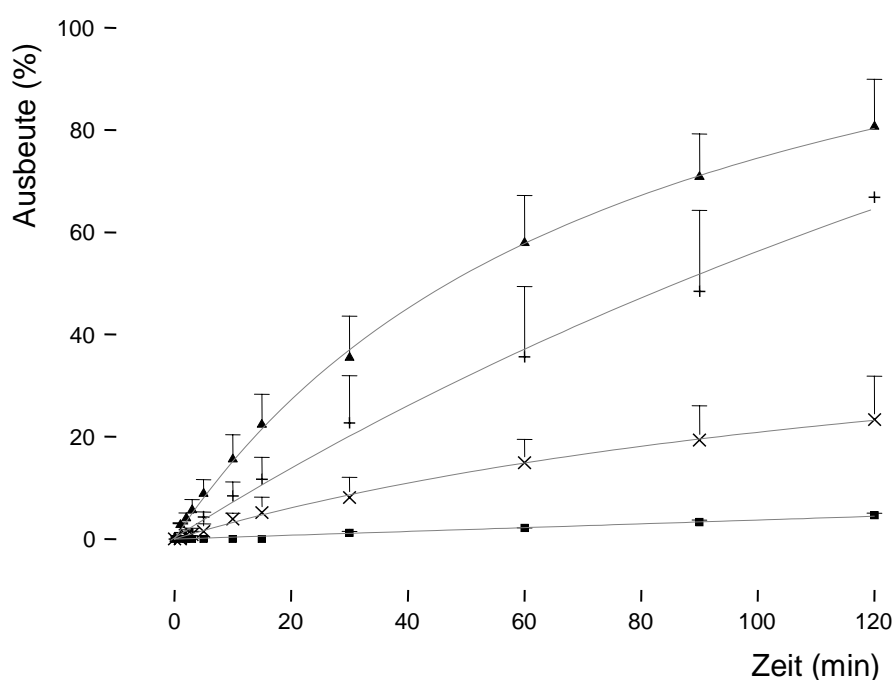
Als Modell für ein Chelator-Peptid-Konjugat wurden die Chelatoren jeweils an D-Phe-NH<sub>2</sub> gebunden und so die Bindung an ein Peptid simuliert (15).

---

Zur Untersuchung der Komplexbildung mit dem Metallion  $Y^{3+}$  wurde die Metalllösung mit  $^{90}Y$  versetzt, um so die Komplexbildung durch Verwendung eines Radioaktivitätsdetektors und HPLC (**S1**, **G1**) zu verfolgen (siehe Kap. 3.5.1).

Die Markierausbeuten für die Verwendung des Chelators DOTA-D-Phe-NH<sub>2</sub> (**Abbildung 41**) und DOTAGA-D-Phe-NH<sub>2</sub> (**Abbildung 42**) wurden graphisch dargestellt.

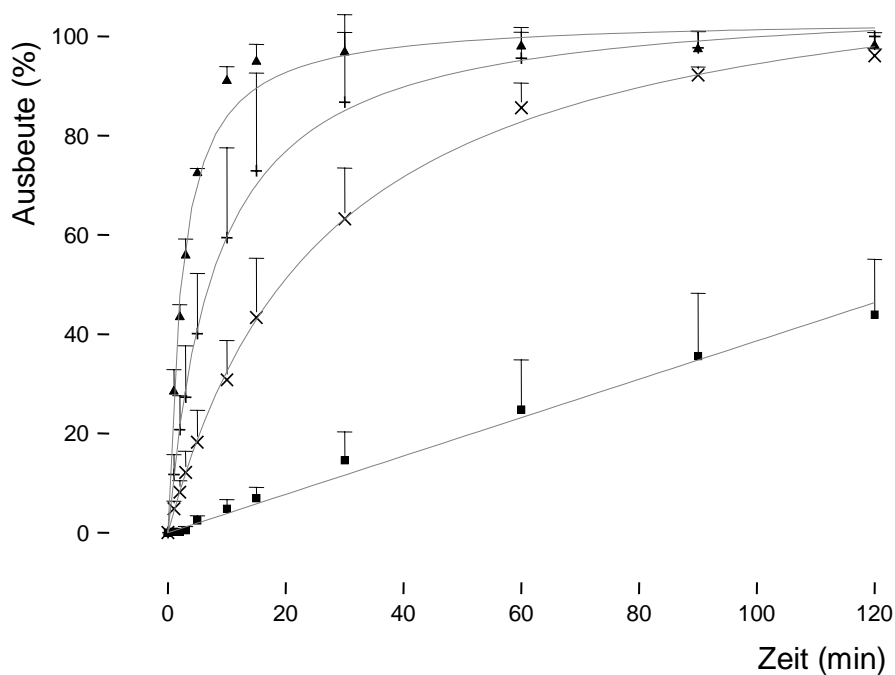
**Abbildung 41:** Komplexbildung von DOTA-D-Phe-NH<sub>2</sub> mit  $Y^{3+}$  bei 37 °C



1  $\mu M$   $Y^{3+}$ , 100  $\mu M$  DOTA-D-Phe-NH<sub>2</sub>, 0.8 M Na-Acetatpuffer; ■ = pH 4.5, × = pH 5.0, + = pH 5.5, ▲ = pH 6.0

Dieselbe Versuchsanordnung wurde auch für die Untersuchung der Komplexbildungskinetik mit  $Lu^{3+}$  verwendet. Dazu wurde eine titrierte Lutetiumchloridlösung mit  $^{177}Lu$  angereichert, um auch hier einen Radioaktivitätsdetektor verwenden zu können.

**Abbildung 42:** Komplexbildung von DOTAGA-D-Phe-NH<sub>2</sub> mit Y<sup>3+</sup> bei 37 °C



1  $\mu\text{M}$  Y<sup>3+</sup>, 100  $\mu\text{M}$  DOTAGA-D-Phe-NH<sub>2</sub>, 0.8 M Na-Acetatpuffer; ■ = pH 4.5, × = pH 5.0, + = pH 5.5, ▲ = pH 6.0

Die durch diese Versuche ermittelten  $k_{\text{obs}}$ -Werte wurden durch Anwendung der Formel

$$k = \frac{k_{\text{obs}}}{[C]_0}$$

umgerechnet. Die dadurch erhaltenen Komplexbildungskonstanten sind im

Folgenden aufgelistet (**Tabelle 20**). Die Komplexierungen mit Lu<sup>3+</sup> verliefen dabei bei allen gewählten pH-Werten deutlich rascher als mit Y<sup>3+</sup>.

**Tabelle 20:** Komplexbildungskonstanten  $k$  ( $s^{-1}$ )

Chelator	Metall	pH	k
DOTA-D-Phe-NH <sub>2</sub>	Y <sup>3+</sup>	4.5	$6.31 \cdot 10^{-2} \pm 3.25 \cdot 10^{-3}$
DOTA-D-Phe-NH <sub>2</sub>	Y <sup>3+</sup>	5.0	$0.407 \pm 0.119$
DOTA-D-Phe-NH <sub>2</sub>	Y <sup>3+</sup>	5.5	$1.27 \pm 0.393$
DOTA-D-Phe-NH <sub>2</sub>	Y <sup>3+</sup>	6.0	$2.46 \pm 0.495$
DOTAGA-D-Phe-NH <sub>2</sub>	Y <sup>3+</sup>	4.5	$0.826 \pm 0.235$
DOTAGA-D-Phe-NH <sub>2</sub>	Y <sup>3+</sup>	5.0	$6.13 \pm 1.45$
DOTAGA-D-Phe-NH <sub>2</sub>	Y <sup>3+</sup>	5.5	$16.2 \pm 6.39$
DOTAGA-D-Phe-NH <sub>2</sub>	Y <sup>3+</sup>	6.0	$45.9 \pm 2.10$
DOTA-D-Phe-NH <sub>2</sub>	Lu <sup>3+</sup>	4.5	$6.97 \cdot 10^{-2}$
DOTA-D-Phe-NH <sub>2</sub>	Lu <sup>3+</sup>	5.0	0.647
DOTA-D-Phe-NH <sub>2</sub>	Lu <sup>3+</sup>	5.5	1.07
DOTA-D-Phe-NH <sub>2</sub>	Lu <sup>3+</sup>	6.0	2.29
DOTAGA-D-Phe-NH <sub>2</sub>	Lu <sup>3+</sup>	4.5	0.706
DOTAGA-D-Phe-NH <sub>2</sub>	Lu <sup>3+</sup>	5.0	9.47
DOTAGA-D-Phe-NH <sub>2</sub>	Lu <sup>3+</sup>	5.5	28.8
DOTAGA-D-Phe-NH <sub>2</sub>	Lu <sup>3+</sup>	6.0	61.9

[C]<sub>0</sub> = 100 μM, [M]<sub>0</sub> = 1 μM; 37 °C; 0.8 M Na-Acetatpuffer

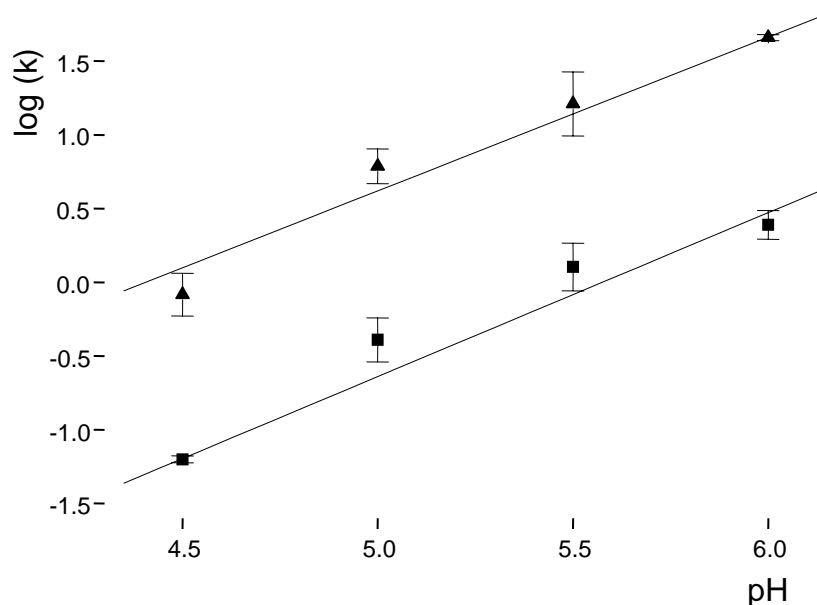
Beim Vergleich der Komplexbildungskonstanten fällt auf, dass eine Erhöhung des pH-Wertes jeweils auch zu einer beschleunigten Komplexbildung führte. Auch ist die Komplexbildungskonstante bei Verwendung des Chelators DOTAGA-D-Phe-NH<sub>2</sub> gegenüber DOTA-D-Phe-NH<sub>2</sub> jeweils um einen Faktor von mindestens 10 höher; die Komplexierung mit DOTAGA-D-Phe-NH<sub>2</sub> läuft also deutlich rascher ab.



Der Einfluss des pH-Wertes auf die Komplexbildungskonstante wurde nun untersucht, indem von den erhaltenen Werten jeweils  $\log(k)$  gegen den pH-Wert aufgetragen wurde.

Für die Komplexierung der beiden Chelatoren mit den  $Y^{3+}$ -Lösungen ergab sich daraus folgendes Bild (**Abbildung 43**):

**Abbildung 43:** Komplexbildungskinetik pseudoerster Ordnung;  $\log k$  gegen pH



Komplexierung von DOTA-D-Phe-NH<sub>2</sub> (■) und DOTAGA-D-Phe-NH<sub>2</sub> (▲) mit  $Y^{3+}$  bei 37 °C.

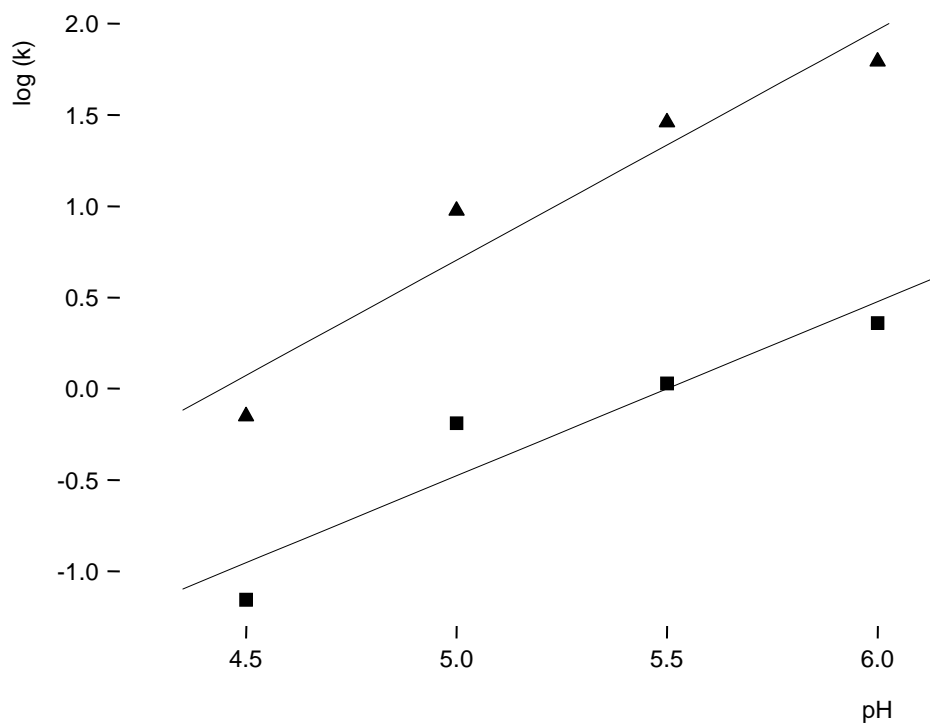
Durch die Messwerte (**Abbildung 43**) wurde jeweils eine Gerade der Form  $\log(k) = A * pH + B$  angepasst. Die bei dieser Anpassung erhaltenen Werte waren wie folgt (**Tabelle 21**):

**Tabelle 21:** Parameter der Geraden aus **Abbildung 43**

Chelator	A	B	R <sup>2</sup>
DOTA-D-Phe-NH <sub>2</sub>	1.131 ± 0.149	-5.045 ± 0.784	0.967
DOTAGA-D-Phe-NH <sub>2</sub>	0.954 ± 0.235	-5.246 ± 1.243	0.953

Fitting der Gleichung  $\log(k) = A * pH + B$

Dieselbe Vorgehensweise wie für die Komplexbildung mit Y<sup>3+</sup> wurde auch für die Komplexierung mit Lu<sup>3+</sup> gewählt (**Abbildung 44**).

**Abbildung 44:** Komplexbildungskinetik pseudoerster Ordnung; log k gegen pH

Komplexierung von DOTA-D-Phe-NH<sub>2</sub> (■) und DOTAGA-D-Phe-NH<sub>2</sub> (▲) mit Lu<sup>3+</sup> bei 37 °C.

Die Anpassung einer linearen Gleichung der Form  $\log(k) = A * pH + B$  ergab für die Komplexierung von  $\text{Lu}^{3+}$  folgende Werte (**Tabelle 22**):

---

**Tabelle 22:** Parameter der Geraden aus **Abbildung 44**

---

<b>Chelator</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
DOTA-D-Phe-NH <sub>2</sub>	0.954 ± 0.235	-5.245 ± 1.243	0.944
DOTAGA-D-Phe-NH <sub>2</sub>	1.262 ± 0.261	-5.608 ± 1.378	0.960

---

Fitting der Gleichung  $\log(k) = A * pH + B$

---

Es bleibt festzuhalten, dass bei der Anpassung der Geraden die Steigungen A jeweils einen Wert von etwa 1 ergaben. Dies kann so interpretiert werden, dass die beiden Spezies HDOTA-D-Phe-NH<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>DOTA-D-Phe-NH<sub>2</sub> respektive HDOTAGA-D-Phe-NH<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>DOTAGA-D-Phe-NH<sub>2</sub> in einem schnellen Gleichgewicht zu einander stehen. Die Spezies, welche schliesslich mit dem Metallion reagiert, wird dabei die reaktivere der beiden Formen sein, also HDOTA-D-Phe-NH<sub>2</sub> respektive HDOTAGA-D-Phe-NH<sub>2</sub> (120).

#### **4.3.3.2 Komplexbildungskinetik nach einem Geschwindigkeitsgesetz zweiter Ordnung**

Die Komplexbildungskinetik wurde auch unter Anfangsbedingungen untersucht, bei welchen die Konzentration an Metallionen identisch mit der Chelatorkonzentration war. Daraus folgt, dass ein Reaktionsgeschwindigkeitsgesetz zweiter Ordnung herrschen muss (siehe Kap. 4.3.2).

Die Auswertung dieser Komplexbildungsreaktionen zweiter Ordnung zwischen den Chelatoren DOTA-D-Phe-NH<sub>2</sub> und DOTAGA-D-Phe-NH<sub>2</sub> und Lu<sup>3+</sup> führte zu den in **Tabelle 23** aufgelisteten Werten.

**Tabelle 23:** Komplexbildungskonstanten  $k_{\text{obs}}$  ( $\text{M}^{-1} * \text{s}^{-1}$ ) für die Komplexierung von Lu<sup>3+</sup> nach einem Reaktionsgeschwindigkeitsgesetz zweiter Ordnung

Chelator	Temperatur	pH	$k_{\text{obs}}$ ( $\text{M}^{-1} * \text{s}^{-1}$ )
DOTA-D-Phe-NH <sub>2</sub>	37 °C	4.0	1.17
DOTA-D-Phe-NH <sub>2</sub>	37 °C	4.5	4.33
DOTA-D-Phe-NH <sub>2</sub>	37 °C	5.0	14.3
DOTA-D-Phe-NH <sub>2</sub>	37 °C	5.5	34.9
DOTA-D-Phe-NH <sub>2</sub>	37 °C	6.0	219
DOTA-D-Phe-NH <sub>2</sub>	50 °C	5.0	69.0
DOTA-D-Phe-NH <sub>2</sub>	25 °C	5.0	1.48
DOTAGA-D-Phe-NH <sub>2</sub>	37 °C	4.0	16.8
DOTAGA-D-Phe-NH <sub>2</sub>	37 °C	4.5	84.7
DOTAGA-D-Phe-NH <sub>2</sub>	37 °C	5.0	795
DOTAGA-D-Phe-NH <sub>2</sub>	37 °C	5.5	1505
DOTAGA-D-Phe-NH <sub>2</sub>	37 °C	6.0	$\sim 10^4$
DOTAGA-D-Phe-NH <sub>2</sub>	50 °C	5.0	4500
DOTAGA-D-Phe-NH <sub>2</sub>	25 °C	5.0	46.8

[C]<sub>0</sub> = 10 μM, [M]<sub>0</sub> = 10 μM; 0.8 M Na-Acetatpuffer

Die beobachteten Komplexbildungskonstanten  $k_{\text{obs}}$  waren für die Reaktionen des Chelators DOTAGA-D-Phe-NH<sub>2</sub> wiederum deutlich grösser als für jene der Reaktionen mit DOTA-D-Phe-NH<sub>2</sub>. Der Unterschied in den  $k_{\text{obs}}$ -Werten betrug jeweils mehr als ein Faktor 10.

Die Komplexbildungsreaktionen sind auch stark von der gewählten Reaktionstemperatur abhängig, wie man bei den Inkubationen bei 25, 37 und 50 °C bei pH 5.0 erkennen konnte. Die Temperaturabhängigkeit der Komplexbildungskonstanten kann durch die Arrheniusgleichung ausgedrückt werden:

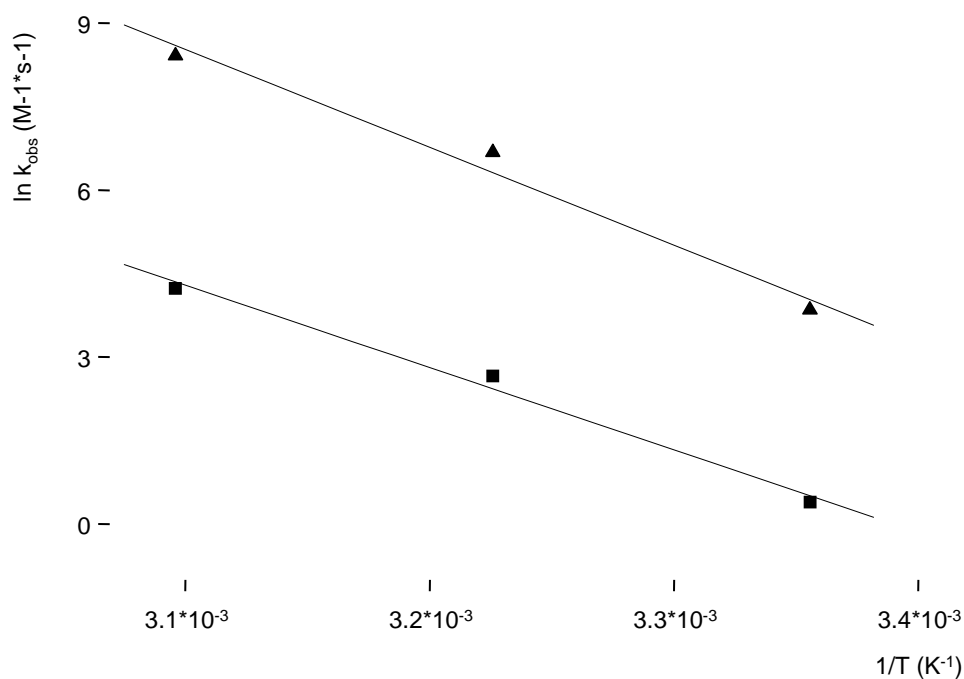
$$k = A * e^{-\frac{E_a}{R*T}} \quad (10)$$

$E_a$  = Aktivierungsenergie

$R$  = Boltzmann-Konstante,  $8.314 \text{ J} * \text{K}^{-1} * \text{mol}^{-1}$

$T$  = Temperatur

**Abbildung 45:** Arrhenius Plot für die Komplexierung von  $\text{Lu}^{3+}$  bei unterschiedlichen Temperaturen



▲ = DOTAGA-D-Phe-NH<sub>2</sub>, ■ = DOTA-D-Phe-NH<sub>2</sub>

Nimmt man nun unsere experimentellen Daten und trägt  $\ln(k_{\text{obs}})$  gegen  $1/T$  auf, so können durch die ermittelten Werte Geraden gelegt werden (**Abbildung 45**).

Die Steigung der Geraden entspricht dabei  $-\frac{E_a}{R}$  und der Achsenabschnitt entspricht  $\ln(A)$

Die ermittelten Geradengleichungen haben folgende Parameter (**Tabelle 24**):

**Tabelle 24:** Parameter der Geraden aus **Abbildung 45**

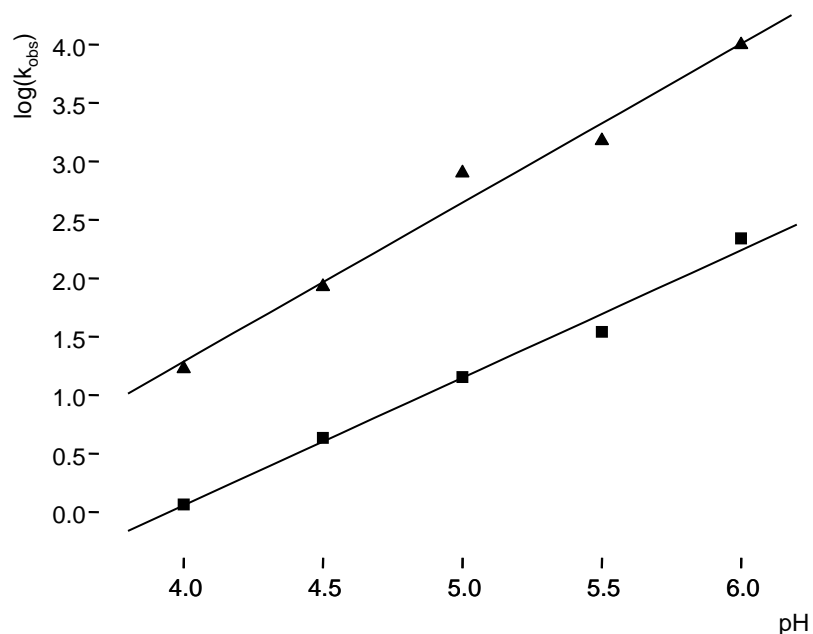
<b>Chelator</b>	<b>Achsenabschnitt</b>	<b>Steigung</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
DOTAGA-D-Phe-NH <sub>2</sub>	63.02 ± 7.88	-17580 ± 2440	0.981
DOTA-D-Phe-NH <sub>2</sub>	50.15 ± 4.97	-14792 ± 1541	0.989

Die berechneten Geraden haben ein hohes Bestimmtheitsmass mit R<sup>2</sup> über 0.98.

Die Steigungen der Geraden können in Aktivierungsenergien umgerechnet werden. Für den Chelator DOTA-D-Phe-NH<sub>2</sub> erhält man so einen Wert  $E_a = 123.0 \pm 12.8 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  und für DOTAGA-D-Phe-NH<sub>2</sub> einen Wert von  $E_a = 146.2 \pm 20.3 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ . Der höhere Wert für die Komplexierung von Lu<sup>3+</sup> mit DOTAGA-D-Phe-NH<sub>2</sub> widerspiegelt die grössere beobachtete Abhängigkeit der Reaktions-Geschwindigkeitskonstanten  $k_{\text{obs}}$  von der Temperatur. Die berechneten Werte sollten aber nur mit grosser Vorsicht interpretiert werden, sind doch die Anpassung der Geraden mit einer recht grossen Standardabweichung behaftet.

Wie bei den Reaktionen, welche nach einem Reaktionsmechanismus pseudoerster Ordnung durchgeführt wurden, so wurde auch hier die Abhängigkeit von  $k_{\text{obs}}$  vom pH-Wert untersucht. Dazu wurde graphisch  $\log(k_{\text{obs}})$  gegen pH aufgetragen (**Abbildung 46**).

**Abbildung 46:** Komplexbildungskinetik zweiter Ordnung;  $\log k_{\text{obs}}$  gegen pH



Komplexierung von DOTA-D-Phe-NH<sub>2</sub> (■) und DOTAGA-D-Phe-NH<sub>2</sub> (▲) mit Lu<sup>3+</sup> bei 37 °C.

Durch die Messwerte wurde wiederum eine Gerade der Form  $\log(k) = A * \text{pH} + B$  angepasst (Tabelle 25).

**Tabelle 25:** Parameter der Geraden aus **Abbildung 46**

Chelator	A	B	R <sup>2</sup>
DOTA-D-Phe-NH <sub>2</sub>	1.091 ± 0.068	-4.305 ± 0.343	0.994
DOTAGA-D-Phe-NH <sub>2</sub>	1.359 ± 0.111	-4.148 ± 0.559	0.990

Fitting der Gleichung  $\log(k) = A * \text{pH} + B$

---

Auch hier scheint wiederum als reaktive Spezies HDOTA-D-Phe-NH<sub>2</sub> respektive HDOTAGA-D-Phe-NH<sub>2</sub> mit einem Metallion zum Zwischenprodukt zu reagieren.

Sowohl bei der Komplexierung bei identischen Konzentrationen zwischen Metall und Chelator (Reaktionsgeschwindigkeitsgesetz zweiter Ordnung) als auch bei einem Überschuss an Chelator (Reaktionsgeschwindigkeitsgesetz pseudoerster Ordnung) verläuft die Komplexierung mit DOTAGA-D-Phe-NH<sub>2</sub> deutlich rascher als mit DOTA-D-Phe-NH<sub>2</sub>. Geht man davon aus, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion die Deprotonierung der Aminofunktionen des Zwischenprodukts [MHL]<sup>n+1</sup> zum Produkt [ML]<sup>n</sup> ist, und nimmt man an, dass diese unter Beteiligung der Carbonsäurefunktionen des selben Chelators abläuft (114), so weist der Chelator DOTAGA gegenüber DOTA einen Vorteil auf. Die zusätzliche Carboxylgruppe kann sich ebenfalls an der Deprotonierung der Aminofunktion beteiligen und dadurch verantwortlich sein für die resultierende raschere Komplexbildung.

#### 4.3.4 Unterschiedliche spezifische Aktivitäten mit <sup>177</sup>Lu

Die verfügbaren Radiometalllösungen enthalten nebst dem gewünschten Isotop oft auch eine unterschiedlich hohe Konzentration an anderen Metallen (30). Diese können sich bei der Komplexierung ähnlich verhalten wie das gewünschte Radiometall, und kompetitieren dadurch um die zur Verfügung stehenden Chelatoren. Solche Fremdmetalle können zum Beispiel aus dem Produktionsweg des Radiometalls stammen oder Zerfallsprodukte des Radiometalls sein.

<sup>177</sup>Lu wird einerseits durch Neutronenbestrahlung von <sup>176</sup>Lu hergestellt, wobei dem Neutroneneinfang die Emission eines  $\gamma$ -Quantens folgt; die Kurzschreibweise dieses Prozesses

---

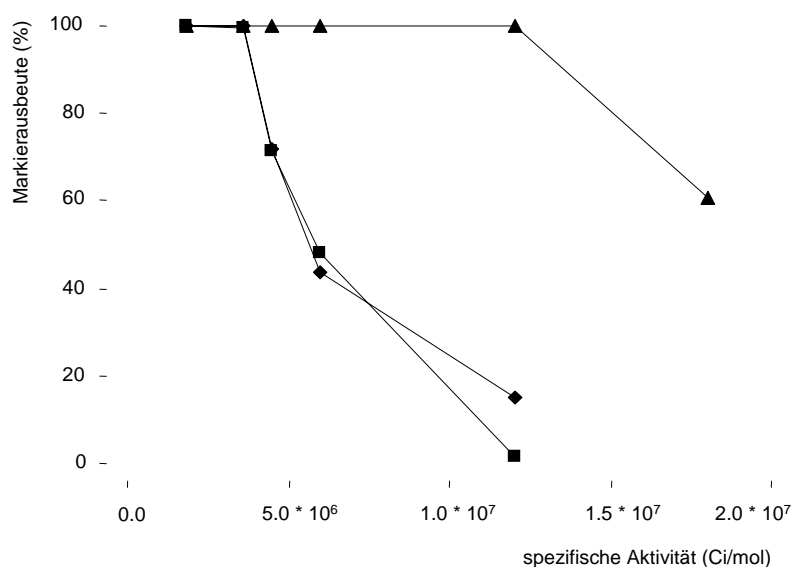


lautet  $^{176}\text{Lu} (n, \gamma) ^{177}\text{Lu}$ . Auf diesem Weg wird z.B. von der Firma IDB-Holland BV eine spezifische Aktivität von rund  $0.2 \mu\text{mol } ^{177}\text{Lu} / \mu\text{mol Lu}$  erreicht. Alternativ hat die Firma MDS-Nordion einen neuen Produktionsweg beschritten, wobei von  $^{176}\text{Yb}$  ausgegangen wird (159). Die Reaktion wird wie folgt beschrieben:  $^{176}\text{Yb} (n, \gamma) ^{177}\text{Yb} (\beta^-) ^{177}\text{Lu}$ .

Diese unterschiedlichen, kommerziell erhältlichen  $^{177}\text{Lu}(\text{Cl}_3)$  Lösungen wurden durch Markierung von DOTAGA-Substanz P bei unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten beurteilt. Es wurde dabei je ein Batch von MDS Nordion (Lot 3477005) und IDB Holland (Lot Lu985138A) getestet, welche beide auf dem Weg  $^{176}\text{Lu} (n, \gamma) ^{177}\text{Lu}$  produziert wurden.

Bei beiden dieser Ansätze wurden für die Komplexierung von 10 mCi (370 MBq) zwischen 4 und 5  $\mu\text{g}$  DOTAGA-Substanz P (2.21 nmol bis 2.77 nmol) benötigt, damit eine Markierausbeute über 99 % erreicht wurde (**Abbildung 47**).

**Abbildung 47:** Markierausbeute bei der Komplexierung von DOTAGA-Substanz P mit  $^{177}\text{Lu}$  bei unterschiedlicher spezifischer Aktivität



▲ = MDS Nordion Lot 3477005; ■ = IDB-Holland Lot Lu985138A; ◆ = MDS-Nordion Lot 3477001

Die auf dem Weg  $^{176}\text{Yb} (n, \gamma) ^{177}\text{Yb} (\beta^-) ^{177}\text{Lu}$  produzierte  $^{177}\text{LuCl}_3$  Lösung erreicht im Vergleich dazu eine deutlich höhere spezifische Aktivität. Die benötigte Peptidmenge für die Komplexierung von 10 mCi (370 MBq)  $^{177}\text{Lu}$  lag zwischen 1.5  $\mu\text{g}$  (0.83 nmol) und 1.0  $\mu\text{g}$  (0.55 nmol) DOTAGA-Substanz P. Die theoretisch erreichbare Grenze für die Markierung mit 10 mCi (370 MBq)  $^{177}\text{Lu}$  liegt bei 0.92  $\mu\text{g}$  (0.51 nmol) DOTAGA-Substanz P. Die durchgeführten Versuche kommen dieser theoretischen Grenze recht nahe.

---

---

## 4.4 $^{213}\text{Bi}$

### 4.4.1 $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generator

Die beiden durch das Institut für Transurium Elemente ITU zur Verfügung gestellten Generatoren waren mit einer  $^{225}\text{Ac}$ -Menge von 11.1 mCi (AcShBas7) bzw. 14.0 mCi (AcShBas8) beladen. Die total eluierte Aktivität an  $^{213}\text{Bi}$  für den Generator AcShBas 7 betrug 204.35 mCi (7.56 GBq) in insgesamt 50 Elutionen über einen Zeitraum von 11 Wochen. Der Generator AcShBas 8 wurde während 7 Wochen 37 Mal eluiert und lieferte total 218.73 mCi (8.09 GBq)  $^{213}\text{Bi}$ .

Gemäss der in der Einleitung erwähnten Bateman-Gleichung (**Kapitel 1.5.2**) kann ein  $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generator mit einer genügenden Effizienz in einem zeitlichen Abstand von 3 h zur vorherigen Elution eluiert werden. Die Effizienz beschreibt dabei, welcher Anteil der theoretisch erreichbaren, maximalen Aktivität an  $^{213}\text{Bi}$  erreicht wird.

Die über den gesamten Gebrauch des jeweiligen Generators erzielte Effizienz betrug in unserem Fall für den ersten Generator (AcShBas 7)  $86.15\% \pm 3.05\%$ , und für den zweiten Generator (AcShBas8)  $88.29\% \pm 8.18\%$  (**Abbildung 48**). Dabei wurden nur Elutionen berücksichtigt, welche auch tatsächlich mindestens 3 h nach der vorhergehenden Elution erfolgten.

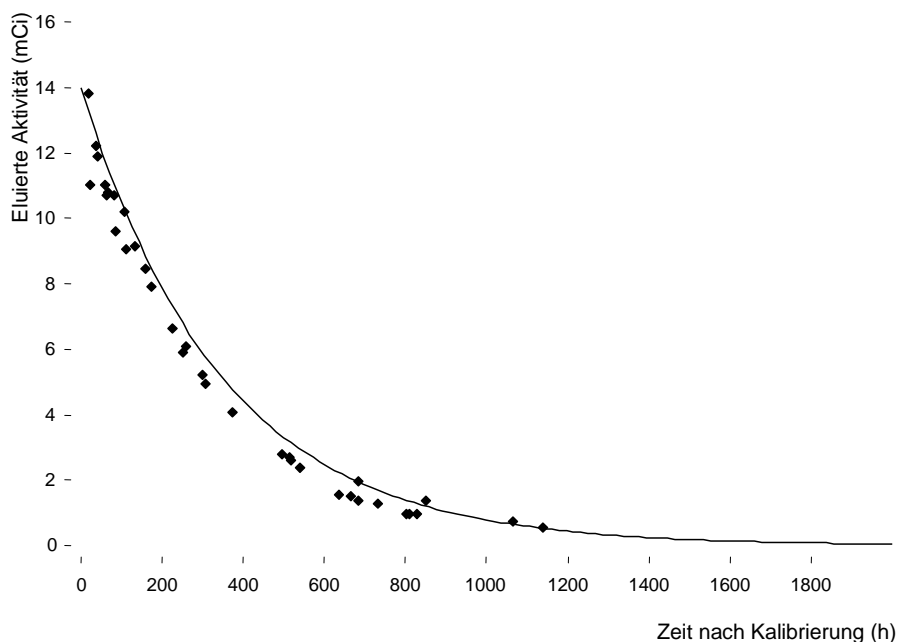
Es wurden für verschiedene Tierversuche insgesamt 12 Markierungen von DOTA-Exendin 4 und 17 Markierungen mit  $^{213}\text{Bi}$  durchgeführt, wobei jeweils Markierausbeuten  $> 95\%$  erzielt wurden. Ebenfalls wurden 33 Markierungen von DOTA-[Thi<sup>8</sup>, Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]-Substanz P durchgeführt, wobei zur Ermittlung der maximal erreichbaren spezifischen Aktivität auch Versuche mit unterschiedlichen Radiometall-zu-Chelatorverhältnissen ausgetestet wurden.

---

---

**Abbildung 48:** Effizienz des  $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generators AcShBas8: Eluierte Aktivitäten

---



---

Nur Elutionen mit mind. 3 h Wartezeit nach der vorhergehenden Elution sind aufgeführt. Die dargestellte Linie entspricht der theoretischen Aktivität gemäss Kalibration des Generators.

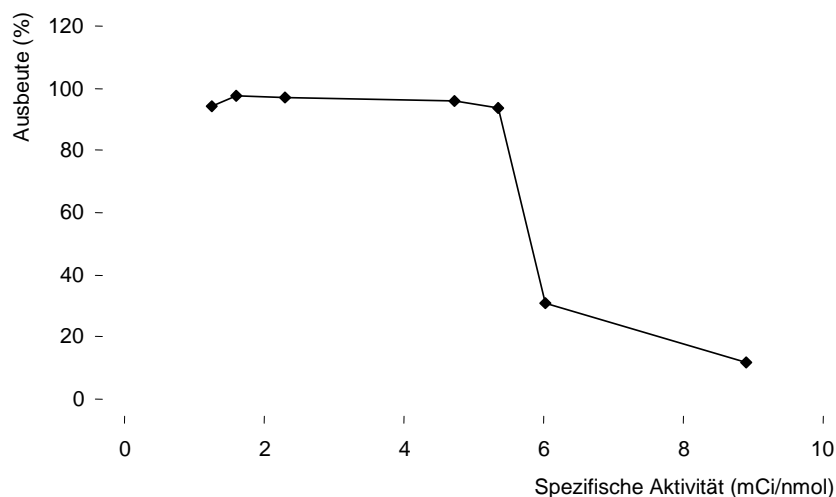
---

Eine hohe Markierausbeute (> 95 %) wurde erreicht mit einer spezifischen Aktivität von bis zu 5.3 mCi (196.1 MBq)  $^{213}\text{Bi}$  pro nmol Chelator-Peptid-Konjugat (**Abbildung 49**). Im Fall von DOTA-[Thi<sup>8</sup>, Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]-Substanz P bedeutet dies, dass pro µg maximal 3 mCi (111 MBq)  $^{213}\text{Bi}$  eingesetzt werden können.

Im Vergleich dazu wird in unserer Abteilung bei einer Anwendung von [<sup>90</sup>Y]-DOTATOC im Patienten in unserer Abteilung pro µg des eingesetzten Chelator-Peptid-Konjugats jeweils 1 mCi (37 MBq)  $^{90}\text{Y}$  eingesetzt. Wir erreichen also mit  $^{213}\text{Bi}$  eine höhere spezifische Aktivität.

---

**Abbildung 49:** Spezifische Aktivität bei der Markierung von DOTA-[Thi<sup>8</sup>, Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]-Substanz P mit <sup>213</sup>Bi



Markierung mit unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten, Inkubation jeweils für 15 min bei 95 °C unter Verwendung eines Heizblockes; Analyse mit Radio-HPLC (S1, G2)

Nebst dem gewünschten Radiometall <sup>213</sup>Bi werden bei einer Elution auch die Zerfallsprodukte davon, also namentlich <sup>209</sup>Pb und <sup>209</sup>Bi, in der Elutionslösung vorhanden sein. Der Anteil dieser Zerfallsprodukte ist umso höher, je länger zurück die letzte Elution des Generators liegt. Diese Metalle werden bei einer Markierung ebenfalls durch den Chelator komplexiert und reduzieren die Anzahl der für <sup>213</sup>Bi zur Verfügung stehenden Chelatoren.

#### 4.4.2 Markierungen mit Mikrowellentechnik

Der Zeitbedarf für eine Markierung unter Verwendung eines konventionellen Heizblockes inklusive Qualitätskontrolle mit ITLC betrug rund 30 min ab dem Zeitpunkt der Elution des  $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generators (**Abbildung 51A**). Die kurze Halbwertszeit von  $^{213}\text{Bi}$  (45.6 min) hat zur Folge, dass nach dieser halben Stunde nur noch rund 65 % der ursprünglichen Aktivität für eine Applikation am Patienten zur Verfügung stehen würden. Eine schnellere Markiertechnik würde eine höhere applizierbare Dosis für einen Patienten ermöglichen.

Für offenkettige Chelatoren konnten bereits Markierungen innerhalb 10 min erreicht werden (131); makrozyklische Chelatoren hingegen, welche erhöhte Temperaturen für die Komplexierungsreaktionen benötigen, konnten bisher noch nicht so rasch mit  $^{213}\text{Bi}$  umgesetzt werden.

Für die Markierung von DOTATOC mit  $^{68}\text{Ga}$ , welches ebenfalls eine kurze Halbwertszeit von 68 min aufweist, konnte durch Anwendung von Mikrowellentechnik kürzlich der Zeitbedarf für den gesamten Prozess inkl. HPLC-Qualitätskontrolle auf 20 - 22 min gebracht werden (136).

Auf Grund dieser Resultate wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit versucht, mit Hilfe eines konventionellen Haushalt-Mikrowellengeräts (Satrap Micro-601, 1100 W Leistung) die Inkubationszeit für die Markierung von Konjugaten mit makrozyklischen Chelatoren zu reduzieren. Verwendet wurden zuerst Plastikgefäße, welche allerdings schon bei Vorversuchen, welche noch ohne Radiometalle durchgeführt wurden, den auftretenden Drücken und Temperaturen nicht standhielten (**Abbildung 50**). Nächste Versuche wurden mit Glasgefäßen durchgeführt, welche mit einem Septum verschlossen waren. Das Septum

---

---

gestattete eine gewisse Volumenausdehnung, allerdings trat bei einer Markierung mit  $^{213}\text{Bi}$  eine zu hohe Volumenausdehnung auf, wodurch das Septum weggeschleudert wurde.

Das für diese Versuche verwendete Haushalts-Mikrowellengerät ermöglichte eine kaum zu kontrollierende Energieeinstrahlung in das Reaktionsgefäß. Die auftretenden Temperaturen und Druckverhältnisse konnten nicht überwacht werden und stellten daher für eine regelmässige Anwendung ein nicht zu überwindendes Hindernis dar.

---

**Abbildung 50:** Versuche mit Haushaltsmikrowelle

---



---

Links und Mitte: explodierte Gefässe; Rechts: durchgeschmolzener Deckel

---

Das später eingesetzte Mikrowellengerät „Initiator“ der Firma Biotage besitzt eine Temperaturkontrolle, indem ein Infrarotsensor die Temperatur im Innern des Reaktionsgefäßes erfasst. Weiter wird über das Septum des Reaktionsgefäßes durch einen zusätzlichen Sensor der Druck im Innern erfasst. Diese Massnahmen erlauben, zusammen mit einem homogenen Mikrowellenfeld über das gesamte Reaktionsvolumen, eine sichere Anwendung auch mit radioaktiven Substanzen.

---

Hohe Markierausbeuten (> 95 %) bei spezifischen Aktivitäten von bis gegen 5 mCi (185 MBq)  $^{213}\text{Bi}$  pro nmol Chelator-Peptid-Konjugat wurden bereits nach 1 min Inkubationszeit im Mikrowellengerät bei 95 °C erzielt.

Die verwendeten Glasgefäße konnten nach Gebrauch mit Wasser ausgespült und nach zweimaliger Einwirkung von 3 N HCl während je eines Tages erneut verwendet werden. Die Markierausbeuten mit solchen rezyklierten Vials lag noch immer über 95 %.

Um den Zeitvorteil, welcher durch die Mikrowelle erzielt wurde, nicht durch eine langsame Qualitätskontrolle zu reduzieren, wurde eine HPLC-Analytik mit Verwendung einer kurzen HPLC-Säule (**S3**) eingeführt (2.1 \* 50 mm, Agilent Eclipse 1.8  $\mu\text{m}$ ). Mit dieser Säule konnte ein Gradientensystem mit einer Dauer von nur noch 6 min entwickelt werden (**G3**).

Der gesamte Zeitbedarf für eine Markierung, gemessen von der Elution bis zur Zubereitung der Applikationsspritze inklusive Qualitätskontrolle, konnte so auf nur noch 15 min reduziert werden (**Abbildung 51**).

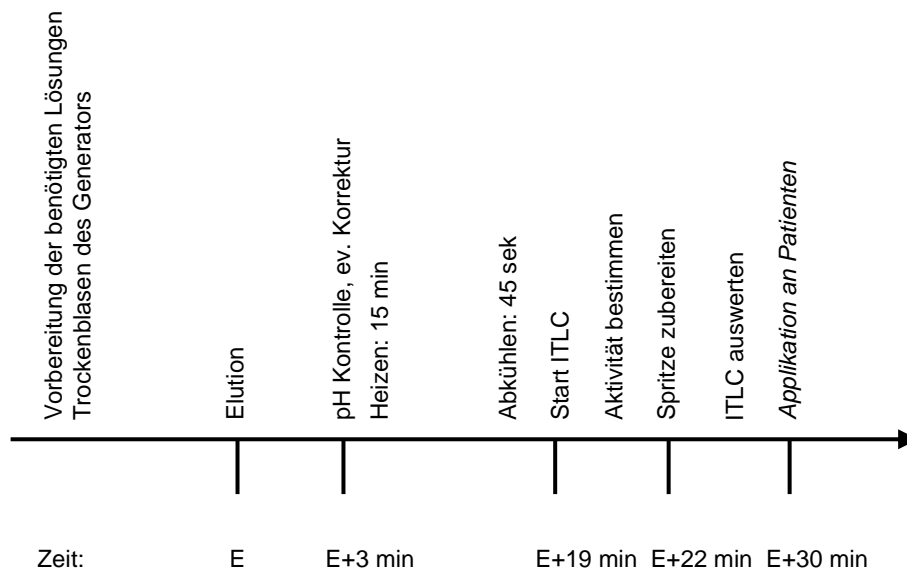
Nach diesen 15 min verbleiben von der ursprünglich eluierten  $^{213}\text{Bi}$ -Aktivität rund 80 % übrig. Im Vergleich mit dem Markierprotokoll, welches eine Erhitzung mit einem Heizblock und ITLC-Qualitätskontrolle verwendet, konnte somit eine Steigerung der einem Patienten applizierbaren spezifischen Aktivität von rund 23 % erreicht werden.

---

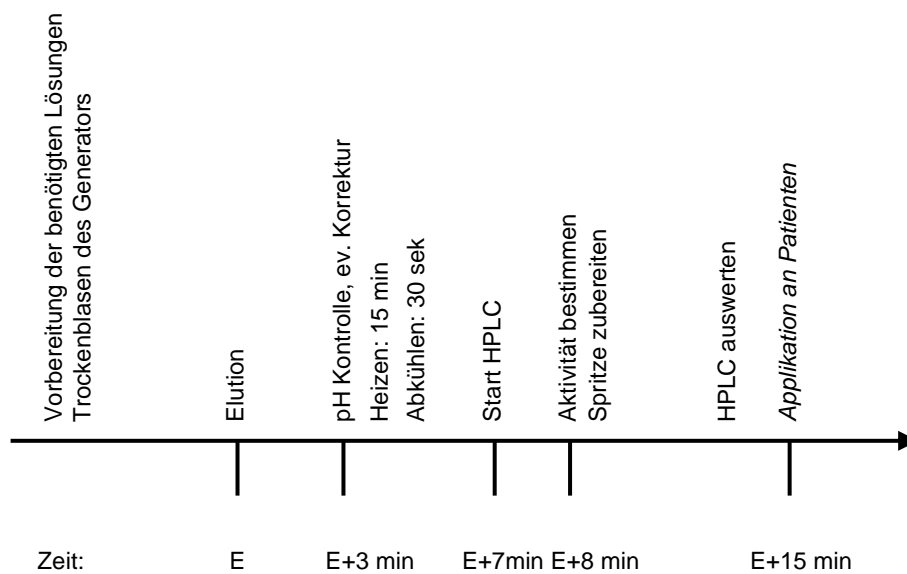


**Abbildung 51:** Zeitbedarf einer Markierung mit  $^{213}\text{Bi}$  mit konventioneller Heiztechnik und ITLC (A) und mit Mikrowellentechnik und kurzer HPLC-Säule (S3) (B)

**A**



**B**



---

Die Stabilität des [ $^{213}\text{Bi}$ -DOTA]-Peptid Komplexes wurde durch Inkubation bei Raumtemperatur in einer Lösung mit einem 250-fachen Überschuss Ca-DTPA durchgeführt. Die Analyse nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit HPLC (**S2**, **G1**) zeigte unterschiedliche Ergebnisse auf, je nach Wahl der durch den Radioaktivitätsdetektor erfassten Strahlungsenergie.

So scheint bei offenem Energiefenster (20 – 2000 keV, **Abbildung 52A**) das Radiometall relativ rasch zu dekomplexieren, mit einer berechneten Halbwertszeit von etwa 6.7 h. Dieser Wert liegt allerdings noch immer deutlich über der physikalischen Halbwertszeit von  $^{213}\text{Bi}$  (45.6 min).

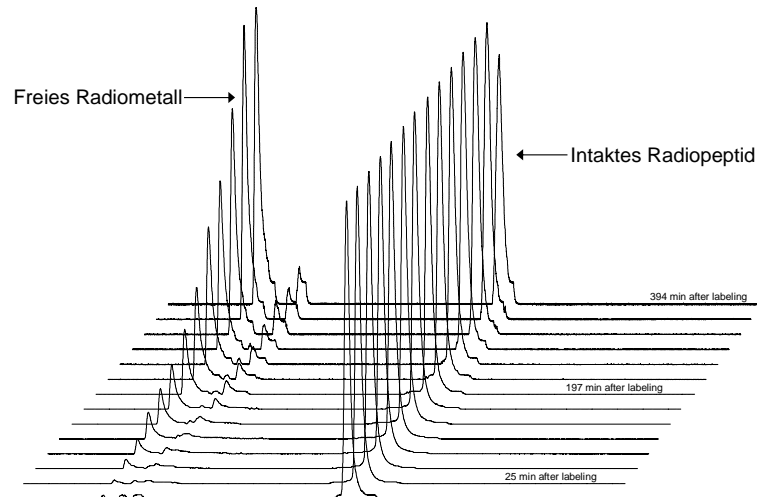
Beschränkt man sich bei der Aufnahme des Radiochromatogramms auf die Emissionslinie von  $^{213}\text{Bi}$  durch die Wahl eines Energiefensters von 420 – 460 keV, **Abbildung 52B**), so scheint die Dekomplexierung deutlich langsamer zu verlaufen, mit einer berechneten Halbwertszeit von 185.3 h.

Der Unterschied der Ergebnisse bei den gewählten Messmethoden muss im Zerfall von  $^{213}\text{Bi}$  gesucht werden. Der  $\alpha$ -Zerfall von  $^{213}\text{Bi}$  bzw. der Zerfall seines durch  $\beta^-$ -Zerfall entstehenden Tochternuklids  $^{213}\text{Po}$  sind derart energiereich, dass die Tochternuklide beim Zerfall aus dem Chelator herausgeschleudert werden (134). Da aber diese Tochternuklide selber wiederum radioaktiv sind, können sie ebenfalls durch den Radioaktivitätsdetektor erfasst werden. Wird ein „offenes“ Energiefenster gewählt, so werden diese dekomplexierten Tochternuklide als DTPA-komplexierte Metalle im Chromatogramm dargestellt. Die chromatographischen Peakverhältnisse darf man dabei nicht direkt als die radiochemische Reinheit der Substanz betrachten, da die Effizienz des Radioaktivitätsdetektors für unterschiedliche Strahlungsarten und –energien nicht identisch ist. Erschwerend kommt hinzu, dass bei offenem Energiefenster auch die in die Substanz eingebauten Tochternuklide dargestellt werden. Solche Tochternuklide von  $^{213}\text{Bi}$  sind bereits im Eluat des  $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generators enthalten und werden bei der Markierung ebenfalls in das Chelator-Peptid-Konjugat eingebaut.

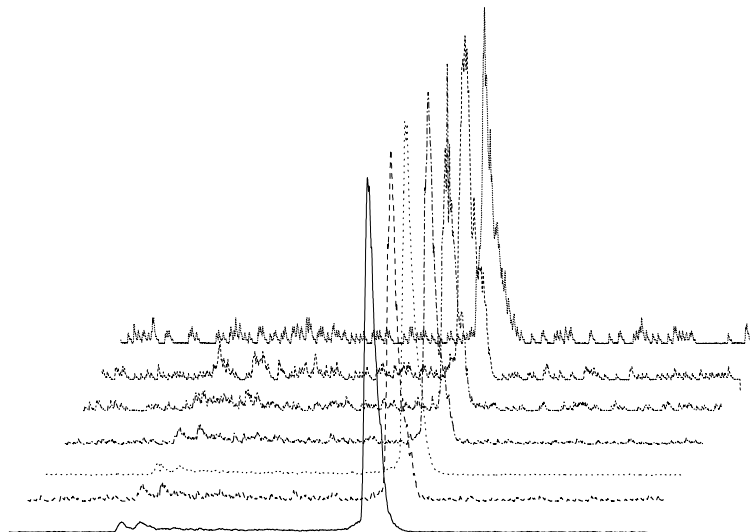
---

**Abbildung 52:** Zeitliche Entwicklung der HPLC-Radiochromatogramme von [ $^{213}\text{Bi}$ -DOTA]-[Thi $^8$ , Met(O $_2$ ) $^{11}$ ]-Substanz P; abhängig vom gewählten Energiefenster

**A**



**B**



**A** = Energiefenster 20 – 2000 keV, Zeitliche Entwicklung (von vorne nach hinten) bis 6.5 h; **B** = Energiefenster 420 – 460 keV, Zeitliche Entwicklung (von vorne nach hinten) bis 6 h.

Beschränkt man sich bei der Untersuchung der Stabilität der Substanz auf ein Energiefenster des Radioaktivitätsdetektors, welches nur  $^{213}\text{Bi}$  darstellt, so kann man Tochternuklide nicht erkennen.

Man kann also festhalten, dass die Verbindung  $[\text{}^{213}\text{Bi-DOTA}]\text{-}[\text{Thi}^8, \text{Met}(\text{O}_2)^{11}]$ -Substanz P eine hohe Stabilität in Bezug auf die Dekomplexierung von  $^{213}\text{Bi}$  aufweist, mit einer berechneten Halbwertszeit von über 185 h.

Allerdings werden die durch  $\alpha$ -Zerfall entstehenden Tochternuklide nicht mehr durch den makrozyklischen Chelator komplexiert sein. Dies spielt für die Tochternuklide  $^{213}\text{Po}$  und  $^{209}\text{Tl}$  keine grosse Rolle, da die Halbwertszeiten dieser Radiometalle selber sehr kurz sind (**Abbildung 16**). Während dieser kurzen Zeit werden diese freigesetzten Radiometalle im Patienten nicht an andere Organe dislozieren können.

Bei  $^{209}\text{Pb}$  hingegen könnte die Halbwertszeit von 3.25 h dazu führen, dass dieses sich in nicht-Zielorganen akkumuliert. Allerdings berichten bestehende Arbeiten nicht von entsprechenden Problemen mit freigesetztem  $^{209}\text{Pb}$ ; es wird im Gegenteil gar berichtet, dass die entstandenen Tochternuklide das Zellinnere nicht verlassen (*133, 134*).

Im Falle des Tochternuklids  $^{209}\text{Bi}$  spielt eine Freisetzung dieses Radiometalls keine Rolle, da die Halbwertszeit von diesem Metall so lange ist ( $1.9 * 10^{19}$  a), dass keine relevanten Strahlendosen an nicht-Zielorganen entstehen können.

---

---

## 5. Zusammenfassung

Das für eine rezeptorgesteuerte Therapie von Patienten mit hochgradigen Hirntumoren entwickelte Chelator-Peptid-Konjugat DOTAGA-Substanz P erwies sich zwar als therapeutisch wirksam, zeigte jedoch auch gewisse Nachteile. So führt die Oxidation von Methionin während der Komplexierung des Radiometalls zum Met(O)-Derivat, welches deutlich schlechtere Bindungseigenschaften zum NK-1-Rezeptor aufweist. Ausserdem wird die native Sequenz von Substanz P in Blutserum rasch enzymatisch abgebaut.

Durch Synthese verschiedener Variationen der Ausgangssubstanz gelangte man schliesslich zur Substanz DOTA-[Thi<sup>8</sup>, Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]-Substanz P. Von allen entwickelten Substanzen zeigt das mit In<sup>3+</sup> komplexierte Derivat dieser Substanz die höchste Affinität zum NK-1-Rezeptor. Diese neue Substanz zeichnet sich auch durch eine verbesserte Stabilität aus: sie unterliegt einerseits nicht mehr den radiolytisch-oxidativen Prozessen während der Markierung und besitzt des Weiteren auch eine deutlich erhöhte Stabilität gegenüber enzymatischem Abbau. Der in dieser Arbeit entwickelte Test zur Untersuchung der Internalisierungseigenschaften von radioaktiv markierten Chelator-Peptid-Konjugaten auf NK-1-Rezeptor-positiven Tumorzellen bewies, dass eine rezeptorspezifische Aufnahme in die Zellen erfolgt. Das neue Substanz P-Derivat wurde patentiert und wird derzeit in einer Patientenstudie am Universitätsspital Basel in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Nuklearmedizin und der Neurochirurgischen Abteilung angewendet. Zu diesem Zweck wird es je nach Problemstellung mit <sup>111</sup>In (Diagnostik), oder mit <sup>90</sup>Y bzw. <sup>177</sup>Lu (Therapie) markiert.

Im Bereich der CCK<sub>2</sub>-gesteuerten Radiopharmazeutika zur Diagnose und Therapie von medullären Schilddrüsenkarzinomen existiert bereits eine Reihe an Substanzen. Oft besitzen diese aber auf Grund der Verwendung des Chelators DTPA eine zu geringe Stabilität mit dem therapeutisch wirksamen Radiometall <sup>90</sup>Y. Ein weiteres Problem ist auch die meist schlechte

---

Verteilung des Radiopharmazeutikums in vivo, mit einer im Vergleich zum Tumor zu hohen Akkumulation in den Nieren. Bei Applikation von therapeutischen Dosen kann dies zu nierentoxischen Effekten führen.

Basierend auf dem Peptid Minigastrin wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Substanzen entwickelt, bei welchen die makrozyklischen Chelatoren DOTA bzw. DOTAGA verwendet wurden. Diese makrozyklischen Chelatoren weisen im Vergleich zu offenkettigen Chelatoren eine höhere Stabilität mit therapeutischen Radiometallen auf, womit die Gefahr der Dekomplexierung von Radiometallen und Bestrahlung von nicht-Ziel-Organen von Patienten reduziert werden kann. Modifikationen in der Peptidsequenz, insbesondere durch Reduktion der Anzahl der in der Sequenz enthaltenen Glutamate, führten zu einer Reihe neuer Substanzen. Diese binden selektiv am CCK<sub>2</sub>-Rezeptor, nicht aber am CCK<sub>1</sub>-Rezeptor. Die neuen Substanzen internalisieren spezifisch über CCK<sub>2</sub>-Rezeptoren in Tumorzellen. Gegenüber der Referenzverbindung [<sup>111</sup>In-DTPA]-Minigastrin 0 weisen die neuen Substanzen zwar eine schlechtere Stabilität in Blutserum und eine etwas geringere Internalisierungsrate in AR4-2J Tumorzellen auf, trotzdem wurde das Tumor-zu-Nieren-uptakeverhältnis bei Bioverteilungen in tumortragenden Ratten signifikant verbessert. Das in dieser Arbeit entwickelte Chelator-Peptid-Konjugat DOTA-Minigastrin 11 steht auf Grund der verbesserten Eigenschaften kurz vor der Anwendung in ersten Patientenstudien als <sup>177</sup>Lu-tragendes Radiopharmazeutikum.

Der in unserer Abteilung entwickelte Chelator DOTAGA wurde als DOTAGA-D-Phe-NH<sub>2</sub> unter verschiedenen Bedingungen in Bezug auf die Komplexierungsgeschwindigkeit von Y<sup>3+</sup> und Lu<sup>3+</sup> getestet und mit DOTA-D-Phe-NH<sub>2</sub> verglichen.

Es hat sich herausgestellt, dass, bei gleich bleibenden Stabilitäten der Metallkomplexe der beiden Chelatoren, DOTAGA-D-Phe-NH<sub>2</sub> deutlich rascher die beiden Metalle komplexiert als DOTA-D-Phe-NH<sub>2</sub>. Der Unterschied der Komplexbildungskonstanten beträgt jeweils einen

---

Faktor von 10 und mehr. Radiopharmazeutika, welche DOTAGA als Chelator aufweisen, können dadurch bei milderer Bedingungen ein Radiometall komplexieren als DOTA-tragende Analoga. Andererseits kann die Reaktionszeit durch Verwendung von DOTAGA verkürzt oder eine höhere spezifische Aktivität bei gleichbleibender Reaktionszeit erreicht werden. Dies ist insbesondere bei Radiopharmazeutika interessant, bei welchen die pharmakologische Aktivität des Vektormoleküls eine Injektion grösserer Substanzmengen einschränkt.

Der  $\alpha$ -Emitter  $^{213}\text{Bi}$  stellt auf Grund seines hohen linearen Energietransfers ein interessantes Radiometall für die Nuklearmedizin dar und ist in Form eines  $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generators gut verfügbar. Bei der Verwendung des kurzlebigen  $^{213}\text{Bi}$  stellt allerdings die benötigte Zeit für die Herstellung eines Radiopharmazeutikums einen limitierenden Faktor für die Erreichung hoher spezifischer Aktivitäten dar.

Unter Verwendung von Mikrowellentechnik wurde ein Protokoll entwickelt, mit welchem Chelator-Peptid-Konjugate in einem Zeitraum von nur 15 min nach Elution des  $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generators mit  $^{213}\text{Bi}$  markiert werden können, inklusive einer Qualitätskontrolle mit HPLC. Durch diese Verkürzung der benötigten Reaktionszeit steht für eine Applikation im Patienten eine deutlich höhere Dosis und spezifische Aktivität des Radiopharmazeutikums zur Verfügung. Dies sollte zu einem höheren therapeutischen Effekt bei der Bekämpfung von Tumoren führen. Auf Grund dieser neuen Entwicklung wurde in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Nuklearmedizin und der Neurochirurgie unseres Spitals bei den zuständigen Behörden ein Antrag für die Anwendung von  $^{213}\text{Bi}$ -DOTA-[Thi<sup>8</sup>, Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]-Substanz P bei Hirntumor-Patienten eingereicht.

---

## 6. Ausblick

Die Entwicklung der Derivate von Substanz P hat zu einem Patent geführt (149). Eine neu gegründete Firma (nexatio pharmaceuticals) beschäftigt sich mit der Kommerzialisierung dieser neuen Substanzen. Eine erste Entwicklungsstufe wird gerade nach GMP-Richtlinien synthetisiert und soll danach erste Tests durchlaufen.

Weitere Entwicklungen können einerseits auf eine weitere Stabilisierung der Peptidsequenz hinzielen, um so eine längere Verfügbarkeit des Radiopharmazeutikums im Patienten zu gewährleisten. Eine Applikation am Patienten, bei welcher das Radiopeptid intravenös verabreicht wird, erscheint allerdings auch mit weiteren Stabilisierungen eher unwahrscheinlich, da die Blut-Hirn-Schranke derzeit ein zu hohes Hindernis darstellt. Dies kann dazu führen, dass die Anwendung dieser Substanzen auf wenige, hochspezialisierte Kliniken beschränkt bleiben wird.

Die Verwendung von Linkern, an welche mehrere Chelatoren gebunden werden, kann zu höherer spezifischer Aktivität des resultierenden Radiopeptids führen. Ebenfalls könnten neue Entwicklungsstufen durch Strukturen erweitert werden, welche eine Lokalisierung von internalisiertem Radiopeptid im Nukleus der Tumorzelle hervorrufen.

Die Entwicklung eines Markierungsprotokolls von DOTA-tragenden Peptiden mit  $^{213}\text{Bi}$  wurde im Hinblick auf eine Anwendung mit DOTA-[Thi<sup>8</sup>, Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]-Substanz P durchgeführt. Da nun eine rasche Markierung inklusive Qualitätskontrolle zur Verfügung steht, wurde ein Antrag zur Anwendung des  $^{213}\text{Bi}$ -markierten Substanz P-Derivates eingereicht und wird aktuell von den zuständigen Behörden beurteilt. Sobald die Bewilligung erteilt wird, sollen erste Patienten mit dieser neuen Substanz behandelt werden.  $^{213}\text{Bi}$  kann aber auch mit anderen Chelator-Peptid-Konjugaten eingesetzt werden.

---



Auf dem Gebiet der CCK<sub>2</sub>-Rezeptor tragenden Tumoren wurde ein Antrag zur Verwendung von [<sup>177</sup>Lu-DOTA]-Minigastrin 11 im Patienten an die zuständigen Behörden gestellt. Patienten mit medullären Schilddrüsenkarzinomen sollen mit dieser neuen Substanz behandelt werden, und dabei soll auch die Verteilung des Radiopharmazeutikums im Patienten durch szintigraphische Methoden dargestellt werden. In späteren Schritten ist auch die Anwendung anderer Radiometalle wie z.B. <sup>90</sup>Y, <sup>213</sup>Bi oder <sup>68</sup>Ga möglich. Eine neue Möglichkeit im Bereich der Peptide stellt die Verwendung von Antagonisten dar. Es wird vermutet, dass diese gar noch grössere Internalisierungsraten und Tumoruptakes als die vorhandenen Substanzen aufweisen könnten.

Eine Kopplung der neuen Minigastrin-Derivate an Chelatoren, welche sich für die Komplexierung mit <sup>99m</sup>Tc eignen, würde schliesslich eine verbreiterte Anwendung der Szintigraphie von medullären Schilddrüsenkarzinomen ermöglichen, sind doch Markierungen mit diesem Radionuklid in deutlich mehr nuklearmedizinischen Abteilungen möglich als Markierungen mit anderen Radiometallen.

Die makrozyklischen Chelatoren fanden bisher gerade wegen der meist benötigten drastischen Markierbedingungen im nuklearmedizinischen Alltag eine begrenzte Verwendung. Mit der deutlich rascheren Komplexierungskinetik von DOTAGA gegenüber DOTA wurde ein Schritt zu mildereren Markierbedingungen gemacht. Dies sollte zu einer grösseren Anwendung von makrozyklischen Chelatoren führen. Wichtig wäre dazu die kommerzielle Verfügbarkeit von DOTAGA(<sup>t</sup>Bu)<sub>4</sub>-OH; DOTA(<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub>-OH ist heute bereits käuflich erwerbbar und wird deshalb in den meisten Anwendungen makrozyklischer Chelatoren in Radiopharmazeutika noch bevorzugt.

---

Komplexierungen unter Anwendung von Mikrowellentechnik haben einen entscheidenden zeitlichen Vorteil gegenüber Verwendung eines konventionellen Heizblockes. Dieser zeitliche Vorteil sollte im nuklearmedizinischen Labor genutzt werden.

Momentan sind die käuflichen Radiopharmazeutika, welche in Form von Kits vorliegen, nicht geeignet, um direkt in den kommerziellen Mikrowellengeräten verwendet zu werden. Die verwendeten Gefäße sind mit den Bestrahlungskammern des Mikrowellengerätes nicht kompatibel, ein Transferieren der Reaktanden aus dem gekauften Kit-gefäß in ein Mikrowellen-gängiges Gefäß ist zu umständlich. Ist diese Lücke aber einmal geschlossen, so wird sich die Mikrowellentechnik auch im nuklearmedizinischen Labor weit verbreiten.

---

---

## Literaturverzeichnis

1. Jurisson S, Berning D, Jia W, Ma D. Coordination Compounds in Nuclear Medicine. *Chem Rev.* 1993; 93: 1137-1158.
  2. ICRP: *Radionuclide Transformations*. Oxford: Pergamon Press; 1983.
  3. Volkert WA, Hoffman TJ. Therapeutic radiopharmaceuticals. *Chem Rev.* 1999; 99 (9): 2269-2292.
  4. O'Donoghue JA, Wheldon TE. Targeted radiotherapy using Auger electron emitters. *Phys Med Biol.* 1996; 41 (10): 1973-1992.
  5. Ginj M, Hinni K, Tschumi S, Schulz S, Maecke HR. Trifunctional somatostatin-based derivatives designed for targeted radiotherapy using auger electron emitters. *J Nucl Med.* 2005; 46 (12): 2097-2103.
  6. McCarthy KE, Woltering EA, Anthony LB. In situ radiotherapy with  $^{111}\text{In}$ -pentetreotide. State of the art and perspectives. *Q J Nucl Med.* 2000; 44 (1): 88-95.
  7. Howell RW, Rao DV, Hou DY, Narra VR, Sastry KS. The question of relative biological effectiveness and quality factor for auger emitters incorporated into proliferating mammalian cells. *Radiat Res.* 1991; 128 (3): 282-292.
  8. Mäcke HR, Good S. Recent Advances in the Use of Radiometals for Therapeutic Application. In: Nicolini M, Mazzi U, eds. *Technetium, Rhenium and Other Metals in Chemistry and Nuclear Medicine*. Vol 6; 2002:35-41.
  9. Forrer F, Uusijärvi H, Storch D, Maecke HR, Mueller-Brand J. Treatment with  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC of patients with relapse of neuroendocrine tumors after treatment with  $^{90}\text{Y}$ -DOTATOC. *J Nucl Med.* 2005; 46 (8): 1310-1316.
  10. Anderson CJ, Welch MJ. Radiometal-labeled agents (non-technetium) for diagnostic imaging. *Chem Rev.* 1999; 99 (9): 2219-2234.
  11. Schubiger PA, Alberto R, Smith A. Vehicles, chelators, and radionuclides: choosing the "building blocks" of an effective therapeutic radioimmunoconjugate. *Bioconjug Chem.* 1996; 7 (2): 165-179.
  12. Locher JT. *Radioisotopen in der Medizin*. Aarau; 1995.
  13. Fichna J, Janecka A. Synthesis of target-specific radiolabeled peptides for diagnostic imaging. *Bioconjug Chem.* 2003; 14 (1): 3-17.
  14. Reubi JC. Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. *Endocr Rev.* 2003; 24 (4): 389-427.
-

15. Heppeler A, Froidevaux S, Eberle AN, Maecke HR. Receptor targeting for tumor localisation and therapy with radiopeptides. *Curr Med Chem*. 2000; 7 (9): 971-994.
16. Schally AV, Nagy A. Cancer chemotherapy based on targeting of cytotoxic peptide conjugates to their receptors on tumors. *Eur J Endocrinol*. 1999; 141 (1): 1-14.
17. Nagy A, Schally AV, Halmos G, Armatis P, Cai RZ, Csernus V, Kovacs M, Koppan M, Szepeshazi K, Kahan Z. 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): 1794-1799.
18. Schottelius M, Wester HJ, Reubi JC, Senekowitsch-Schmidtke R, Schwaiger M. Improvement of pharmacokinetics of radioiodinated Tyr<sup>(3)</sup>-octreotide by conjugation with carbohydrates. *Bioconjug Chem*. 2002; 13 (5): 1021-1030.
19. Wester HJ, Schottelius M, Scheidhauer K, Reubi JC, Wolf I, Schwaiger M. Comparison of radioiodinated TOC, TOCA and Mtr-TOCA: the effect of carbohydrate on the pharmacokinetics. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2002; 29 (1): 28-38.
20. Storch D. *Neue, radioaktiv markierte und Magnet-Resonanz-aktive Somatostatin-analoga zur besseren Diagnose und zielgerichteten Radionuklidtherapie von neuroendokrinen Tumoren*. Basel: Naturwissenschaftlich-philosophische Fakultät, Universität Basel; 2005.
21. Mier W, Graham KAN, Wang Q, Krämer S, Hoffend J, Eisenhut M, Haberkorn U. Synthesis of peptide conjugated chelator oligomers for endoradiotherapy and MRT imaging. *Tetrahedron Letters*. 2004; 45: 5453-5455.
22. Virgolini I, Raderer M, Kurtaran A, Angelberger P, Banyai S, Yang Q, Li S, Banyai M, Pidlich J, Niederle B, Scheithauer W, Valent P. Vasoactive intestinal peptide-receptor imaging for the localization of intestinal adenocarcinomas and endocrine tumors. *N Engl J Med*. 1994; 331 (17): 1116-1121.
23. van Hagen PM, Breeman WA, Reubi JC, Postema PT, van den Anker-Lugtenburg PJ, Kwekkeboom DJ, Laissue J, Waser B, Lamberts SW, Visser TJ, Krenning EP. Visualization of the thymus by substance P receptor scintigraphy in man. *Eur J Nucl Med*. 1996; 23 (11): 1508-1513.
24. Jansen JB, Jebbink MC, Douglas BR, Lamers CB. Effect of loxiglumide (CR-1505) on bombesin- and meal-stimulated plasma cholecystokinin in man. *Eur J Clin Pharmacol*. 1990; 38 (4): 367-370.
25. Gillis JC, Noble S, Goa KL. Octreotide long-acting release (LAR). A review of its pharmacological properties and therapeutic use in the management of acromegaly. *Drugs*. 1997; 53 (4): 681-699.
26. Jamar F, Barone R, Mathieu I, Walrand S, Labar D, Carlier P, de Camps J, Schran H, Chen T, Smith MC, Bouterfa H, Valkema R, Krenning EP, Kvols LK, Pauwels S. <sup>86</sup>Y-DOTA0)-D-Phe1-Tyr<sup>3</sup>-octreotide (SMT487)-a phase 1 clinical study: pharmacokinetics, biodistribution and renal protective effect of different regimens of amino acid co-infusion. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2003; 30 (4): 510-518.

- 
27. Mäcke HR, Good S. Radiometals (non-Tc, non-Re) and bifunctional labeling chemistry. In: Vértes A, Nagy S, Klencsár Z, eds. *Handbook on Nuclear Chemistry*. Vol 4: Kluwer Academic; 2003:279-314.
  28. Liu S, Edwards DS. Bifunctional chelators for therapeutic lanthanide radiopharmaceuticals. *Bioconjug Chem*. 2001; 12 (1): 7-34.
  29. Volkert WA, Goeckeler WF, Ehrhardt GJ, Ketring AR. Therapeutic radionuclides: production and decay property considerations. *J Nucl Med*. 1991; 32 (1): 174-185.
  30. Breeman WA, De Jong M, Visser TJ, Erion JL, Krenning EP. Optimising conditions for radiolabelling of DOTA-peptides with  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{111}\text{In}$  and  $^{177}\text{Lu}$  at high specific activities. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2003; 30 (6): 917-920.
  31. Liu S, Edwards DS.  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Labeled Small Peptides as Diagnostic Radiopharmaceuticals. *Chem Rev*. 1999; 99 (9): 2235-2268.
  32. Liu S, Edwards DS, Barrett JA.  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  labeling of highly potent small peptides. *Bioconjug Chem*. 1997; 8 (5): 621-636.
  33. Storch D, Behe M, Walter MA, Chen J, Powell P, Mikolajczak R, Mäcke HR. Evaluation of [ $^{99\text{m}}\text{Tc}/\text{EDDA}/\text{HYNIC}^0$ ]Octreotide Derivatives Compared with [ $^{111}\text{In}$ -DOTA $_0$ ,Tyr $^3$ , Thr $^8$ ]Octreotide and [ $^{111}\text{In}$ -DTPA $_0$ ]Octreotide: Does Tumor or Pancreas Uptake Correlate with the Rate of Internalization? *J Nucl Med*. 2005; 46 (9): 1561-1569.
  34. Liu S, Edwards DS, Looby RJ, Harris AR, Poirier MJ, Barrett JA, Heminway SJ, Carroll TR. Labeling a hydrazino nicotinamide-modified cyclic IIb/IIIa receptor antagonist with  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  using aminocarboxylates as coligands. *Bioconjug Chem*. 1996; 7 (1): 63-71.
  35. Babich JW, Fischman AJ. Effect of "co-ligand" on the biodistribution of  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled hydrazino nicotinic acid derivatized chemotactic peptides. *Nucl Med Biol*. 1995; 22 (1): 25-30.
  36. Sundberg MW, Meares CF, Goodwin DA, Diamanti CI. Selective binding of metal ions to macromolecules using bifunctional analogs of EDTA. *J Med Chem*. 1974; 17 (12): 1304-1307.
  37. Sundberg MW, Meares CF, Goodwin DA, Diamanti CI. Chelating agents for the binding of metal ions to macromolecules. *Nature*. 1974; 250 (467): 587-588.
  38. Bruns C, Stolz B, Albert R, Marbach P, Pless J. OctreoScan 111 for imaging of a somatostatin receptor-positive islet cell tumor in rat. *Horm Metab Res Suppl*. 1993; 27: 5-11.
  39. Maecke HR, Riesen A, Ritter W. The molecular structure of indium-DTPA. *J Nucl Med*. 1989; 30 (7): 1235-1239.
-

- 
40. Harrison A, Walker CA, Parker D, Jankowski KJ, Cox JP, Craig AS, Sansom JM, Beeley NR, Boyce RA, Chaplin L, et al. The in vivo release of  $^{90}\text{Y}$  from cyclic and acyclic ligand-antibody conjugates. *Int J Rad Appl Instrum B*. 1991; 18 (5): 469-476.
  41. Otte A, Jermann E, Behe M, Goetze M, Bucher HC, Roser HW, Heppeler A, Mueller-Brand J, Maecke HR. DOTATOC: a powerful new tool for receptor-mediated radionuclide therapy. *Eur J Nucl Med*. 1997; 24 (7): 792-795.
  42. Brechbiel MW, Gansow OA. Backbone-substituted DTPA ligands for  $^{90}\text{Y}$  radioimmunotherapy. *Bioconjug Chem*. 1991; 2 (3): 187-194.
  43. McMurry TJ, Pippin CG, Wu C, Deal KA, Brechbiel MW, Mirzadeh S, Gansow OA. Physical parameters and biological stability of yttrium(III) diethylenetriaminepentaacetic acid derivative conjugates. *J Med Chem*. 1998; 41 (18): 3546-3549.
  44. Cummins CH, Rutter EW, Jr., Fordyce WA. A convenient synthesis of bifunctional chelating agents based on diethylenetriaminepentaacetic acid and their coordination chemistry with yttrium(III). *Bioconjug Chem*. 1991; 2 (3): 180-186.
  45. Chinn PC, Leonard JE, Rosenberg J, Hanna N, Anderson DR. Preclinical evaluation of  $^{90}\text{Y}$ -labeled anti-CD20 monoclonal antibody for treatment of non-Hodgkin's lymphoma. *Int J Oncol*. 1999; 15 (5): 1017-1025.
  46. Alexander V. Design and Synthesis of Macrocyclic Ligands and Their Complexes of Lanthanides and Actinides. *Chem Rev*. 1995; 95: 273-342.
  47. Kodama M, Koike T, Mahatma AB, Kimura E. Thermodynamic 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; 31: 1270-1273.
  48. Desreux JF. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Lanthanide Complexes with a Tetraacetic Tetraaza Macrocycle. Unusual Conformation Properties. *Inorg Chem*. 1980; 19 (5): 1319-1324.
  49. Heppeler A, Friodevaux S, Mäcke HR, Jermann E, Béhé M, Powell P, Hennig M. Radiometal-Labelled Macrocyclic Chelator-Derivatised Somatostatin Analogue with Superb Tumour-Targeting Properties and Potential for Receptor-Mediated Internal Radiotherapy. *Chem Eur J*. 1999; 5 (7): 1974-1981.
  50. Eisenwiener KP, Powell P, Mäcke HR. A convenient synthesis of novel bifunctional prochelators for coupling to bioactive peptides for radiometal labelling. *Bioorg Med Chem Lett*. 2000; 10 (18): 2133-2135.
  51. Eisenwiener KP, Prata MI, Buschmann I, Zhang HW, Santos AC, Wenger S, Reubi JC, Mäcke HR. NODAGATOC, a new chelator-coupled somatostatin analogue labeled with [ $^{67/68}\text{Ga}$ ] and [ $^{111}\text{In}$ ] for SPECT, PET, and targeted therapeutic applications of somatostatin receptor (hsst2) expressing tumors. *Bioconjug Chem*. 2002; 13 (3): 530-541.
-

- 
52. André JP, Maecke HR, Zehnder M, Macko L, Akyel KG. 1,4,7-Triazacyclononane-1-succinic acid-4,7-diacetic acid (NODASA): a new bifunctional chelator for radio gallium-labelling of biomolecules. *Chem Commun.* 1998; (12): 1301-1302.
  53. Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW. The new WHO classification of brain tumours. *Brain Pathol.* 1993; 3 (3): 255-268.
  54. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005; 352 (10): 987-996.
  55. Stupp R, Dietrich PY, Ostermann Kraljevic S, Pica A, Maillard I, Maeder P, Meuli R, Janzer R, Pizzolato G, Miralbell R, Porchet F, Regli L, de Tribolet N, Mirimanoff RO, Leyvraz S. Promising survival for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme treated with concomitant radiation plus temozolomide followed by adjuvant temozolomide. *J Clin Oncol.* 2002; 20 (5): 1375-1382.
  56. Durmaz R, Erken S, Arslantas A, Atasoy MA, Bal C, Tel E. Management of glioblastoma multiforme: with special reference to recurrence. *Clin Neurol Neurosurg.* 1997; 99 (2): 117-123.
  57. Stewart LA. Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. *Lancet.* 2002; 359 (9311): 1011-1018.
  58. Hennig IM, Laissue JA, Horisberger U, Reubi JC. Substance-P receptors in human primary neoplasms: tumoral and vascular localization. *Int J Cancer.* 1995; 61 (6): 786-792.
  59. Schumacher T, Hofer S, Eichhorn K, Wasner M, Zimmerer S, Freitag P, Probst A, Gratzl O, Reubi JC, Maecke R, Mueller-Brand J, Merlo A. Local injection of the <sup>90</sup>Y-labelled peptidic vector DOTATOC to control gliomas of WHO grades II and III: an extended pilot study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2002; 29 (4): 486-493.
  60. Merlo A, Hausmann O, Wasner M, Steiner P, Otte A, Jermann E, Freitag P, Reubi JC, Muller-Brand J, Gratzl O, Maecke HR. Locoregional regulatory peptide receptor targeting with the diffusible somatostatin analogue <sup>90</sup>Y-labeled DOTA<sup>0</sup>-D-Phe<sup>1</sup>-Tyr<sup>3</sup>-octreotide (DOTATOC): a pilot study in human gliomas. *Clin Cancer Res.* 1999; 5 (5): 1025-1033.
  61. Fruhwald MC, O'Dorisio MS, Cottingham SL, Qualman SJ, O'Dorisio TM. Neuropeptides in developmental tumors of the central and peripheral nervous system. *Ann N Y Acad Sci.* 1998; 865: 420-426.
  62. von Euler US, Gaddum JH. An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J Physiol.* 1931; (72): 74 - 87.
  63. Chang MM, Leeman SE, Niall HD. Amino-acid sequence of substance P. *Nat New Biol.* 1971; 232 (29): 86-87.
-

- 
64. Tregear GW, Niall HD, Potts JT, Jr., Leeman SE, Chang MM. Synthesis of substance P. *Nat New Biol.* 1971; 232 (29): 87-89.
  65. Leeman SE, Ferguson SL. Substance P: an historical perspective. *Neuropeptides.* 2000; 34 (5): 249-254.
  66. Regoli D, D'Orleans-Juste P, Rouissi N, Rhaleb NE. Vasoactive peptides and characterization of their receptors. *Regul Pept.* 1993; 45 (3): 323-340.
  67. Mantyh PW. Neurobiology of substance P and the NK1 receptor. *J Clin Psychiatry.* 2002; 63 Suppl 11: 6-10.
  68. Frossard N, Advenier C. Tachykinin receptors and the airways. *Life Sci.* 1991; 49 (26): 1941-1953.
  69. Payan DG, Brewster DR, Goetzl EJ. Specific stimulation of human T lymphocytes by substance P. *J Immunol.* 1983; 131 (4): 1613-1615.
  70. Ziche M, Morbidelli L, Pacini M, Geppetti P, Alessandri G, Maggi CA. Substance P stimulates neovascularization in vivo and proliferation of cultured endothelial cells. *Microvasc Res.* 1990; 40 (2): 264-278.
  71. Breeman WA, VanHagen MP, Visser-Wisselaar HA, van der Pluijm ME, Koper JW, Setyono-Han B, Bakker WH, Kwekkeboom DJ, Hazenberg MP, Lamberts SW, Visser TJ, Krenning EP. In vitro and in vivo studies of substance P receptor expression in rats with the new analog [indium-111-DTPA-Arg<sup>1</sup>]substance P. *J Nucl Med.* 1996; 37 (1): 108-117.
  72. Eisenwiener KP. *Synthese von makrozyklischen Prochelatoren und ihre Evaluation im Tumortargeting mit regulatorischen Peptiden und im Bereich der Entwicklung neuer auf GdIII-basierender MRI-Kontrastmittel.* Basel: Naturwissenschaftlich-philosophische Fakultät, Universität Basel; 2001.
  73. Kneifel S, Bernhardt P, Uusijärvi H, Good S, Plasswilm L, Buitrago-Téllez C, Mäcke HR, Müller-Brand J, Merlo A. Individual Voxelwise Dosimetry of Targeted <sup>90</sup>Y-Substance P Radiotherapy for Malignant Gliomas. *Eur J Nucl Med.* 2007: in press.
  74. Schumacher T, Eichhorn K, Hofer S, Good S, Eisenwiener KP, Mäcke HR, Nitzsche E, Müller-Brand J, Merlo A. Diffusible Brachytherapy (DBT) with radiolabelled Substance P in high grade Gliomas: First observations. *Eur J Nucl Med.* 2001; 28 (8): 1040.
  75. Reardon DA, Akabani G, Coleman RE, Friedman AH, Friedman HS, Herndon JE, Cokgor I, McLendon RE, Pegram CN, Provenzale JM, Quinn JA, Rich JN, Regalado LV, Sampson JH, Shafman TD, Wikstrand CJ, Wong TZ, Zhao X-G, Zalutsky MR, Bigner DD. Phase II Trial of Murine <sup>131</sup>I-Labeled Antitenascin Monoclonal Antibody 81C6 Administered Into Surgically Created Resection Cavities of Patients With Newly Diagnosed Malignant Gliomas. *J Clin Oncol.* 2002; 20: 1389-1397.
-



- 
76. Merlo A, Mueller-Brand J, Maecke HR. Comparing monoclonal antibodies and small peptidic hormones for local targeting of malignant gliomas. *Acta Neurochir Suppl.* 2003; 88: 83-91.
  77. Kneifel S, Cordier D, Good S, Ionescu MC, Ghaffari A, Hofer S, Kretzschmar M, Tolnay M, Apostolidis C, Waser B, Arnold M, Mueller-Brand J, Maecke HR, Reubi JC, Merlo A. Local Targeting of Malignant Gliomas by the Diffusible Peptidic Vector 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1-Glutaric Acid-4,7,10-Triacetic Acid-Substance P. *Clin Cancer Res.* 2006; 12 (12): 3843-3850.
  78. Gimm O, Dralle H. Diagnostik und Therapie sporadischer und familiärer medullärer Schilddrüsenkarzinome. *Onkologe.* 1997; 3: 32-37.
  79. Williams ED. Histogenesis of medullary carcinoma of the thyroid. *J Clin Pathol.* 1966; 19 (2): 114-118.
  80. Dottorini ME, Assi A, Sironi M, Sangalli G, Spreafico G, Colombo L. Multivariate analysis of patients with medullary thyroid carcinoma. Prognostic significance and impact on treatment of clinical and pathologic variables. *Cancer.* 1996; 77 (8): 1556-1565.
  81. Melvin KE, Tashjian AH, Jr. The syndrome of excessive thyrocalcitonin produced by medullary carcinoma of the thyroid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1968; 59 (4): 1216-1222.
  82. Frank-Raue K, Bihl H, Dorr U, Buhr H, Ziegler R, Raue F. Somatostatin receptor imaging in persistent medullary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1995; 42 (1): 31-37.
  83. Berna L, Cabezas R, Mora J, Torres G, Estorch M, Carrio I. <sup>111</sup>In-octreotide and <sup>99m</sup>Tc(V)-dimercaptosuccinic acid studies in the imaging of recurrent medullary thyroid carcinoma. *J Endocrinol.* 1995; 144 (2): 339-345.
  84. Reubi JC, Waser B. Unexpected high incidence of cholecystokinin-B/gastrin receptors in human medullary thyroid carcinomas. *Int J Cancer.* 1996; 67 (5): 644-647.
  85. Reubi JC, Schaer JC, Waser B. Cholecystokinin(CCK)-A and CCK-B/gastrin receptors in human tumors. *Cancer Res.* 1997; 57 (7): 1377-1386.
  86. Noble F, Wank SA, Crawley JN, Bradwejn J, Seroogy KB, Hamon M, Roques BP. International Union of Pharmacology. XXI. Structure, distribution, and functions of cholecystokinin receptors. *Pharmacol Rev.* 1999; 51 (4): 745-781.
  87. Reubi JC, Waser B, Gugger M, Friess H, Kleeff J, Kaye H, Buchler MW, Laissue JA. Distribution of CCK<sub>1</sub> and CCK<sub>2</sub> receptors in normal and diseased human pancreatic tissue. *Gastroenterology.* 2003; 125 (1): 98-106.
  88. Reubi JC, Waser B, Laderach U, Stettler C, Friess H, Halter F, Schmassmann A. Localization of cholecystokinin A and cholecystokinin B-gastrin receptors in the human stomach. *Gastroenterology.* 1997; 112 (4): 1197-1205.
  89. Reubi J-C. Bern; 2006.
-

- 
90. Otte A, Herrmann R, Heppeler A, Behe M, Jermann E, Powell P, Maecke HR, Muller J. Yttrium-90 DOTATOC: first clinical results. *Eur J Nucl Med.* 1999; 26 (11): 1439-1447.
  91. Behr TM, Jenner N, Radetzky S, Behe M, Gratz S, Yucekent S, Raue F, Becker W. Targeting of cholecystokinin-B/gastrin receptors in vivo: preclinical and initial clinical evaluation of the diagnostic and therapeutic potential of radiolabelled gastrin. *Eur J Nucl Med.* 1998; 25 (4): 424-430.
  92. de Jong M, Bakker WH, Bernard BF, Valkema R, Kwekkeboom DJ, Reubi JC, Srinivasan A, Schmidt M, Krenning EP. Preclinical and initial clinical evaluation of <sup>111</sup>In-labeled nonsulfated CCK<sub>8</sub> analog: a peptide for CCK-B receptor-targeted scintigraphy and radionuclide therapy. *J Nucl Med.* 1999; 40 (12): 2081-2087.
  93. Behr TM, Jenner N, Behe M, Angerstein C, Gratz S, Raue F, Becker W. Radiolabeled peptides for targeting cholecystokinin-B/gastrin receptor-expressing tumors. *J Nucl Med.* 1999; 40 (6): 1029-1044.
  94. Reubi JC. CCK receptors in human neuroendocrine tumors: clinical implications. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 2001; 234: 101-104.
  95. Reubi JC, Waser B, Schaer JC, Laederach U, Erion J, Srinivasan A, Schmidt MA, Bugaj JE. Unsulfated DTPA- and DOTA-CCK analogs as specific high-affinity ligands for CCK-B receptor-expressing human and rat tissues in vitro and in vivo. *Eur J Nucl Med.* 1998; 25 (5): 481-490.
  96. Aloj L, Caraco C, Panico M, Zannetti A, Del Vecchio S, Tesauro D, De Luca S, Arra C, Pedone C, Morelli G, Salvatore M. In vitro and in vivo evaluation of <sup>111</sup>In-DTPAGlu-G-CCK8 for cholecystokinin-B receptor imaging. *J Nucl Med.* 2004; 45 (3): 485-494.
  97. Kwekkeboom DJ, Bakker WH, Kooij PP, Erion J, Srinivasan A, de Jong M, Reubi JC, Krenning EP. Cholecystokinin receptor imaging using an octapeptide DTPA-CCK analogue in patients with medullary thyroid carcinoma. *Eur J Nucl Med.* 2000; 27 (9): 1312-1317.
  98. Laverman P, Behe M, Oyen WJ, Willems PH, Corstens FH, Behr TM, Boerman OC. Two technetium-99m-labeled cholecystokinin-8 (CCK8) peptides for scintigraphic imaging of CCK receptors. *Bioconjug Chem.* 2004; 15 (3): 561-568.
  99. Duncan JR, Behr TM, DeNardo SJ. Intracellular fate of radiometals. *J Nucl Med.* 1997; 38 (5): 829.
  100. Nock BA, Maina T, Behe M, Nikolopoulou A, Gotthardt M, Schmitt JS, Behr TM, Mäcke HR. CCK-2/Gastrin Receptor-Targeted Tumor Imaging with <sup>99m</sup>Tc-Labeled Minigastrin Analogs. *J Nucl Med.* 2005; 46 (10): 1727-1736.
  101. Kamioki H, Mirzadeh S, Lambrecht RM. 188-W/188-Re generator for biomedical applications. *Radiochimica Acta.* 1994; 65: 2355-2360.
-

- 
102. von Guggenberg E, Behe M, Behr TM, Saurer M, Seppi T, Decristoforo C.  $^{99m}\text{Tc}$ -labeling and in vitro and in vivo evaluation of HYNIC- and (Nalpha-His)acetic acid-modified [D-Glu1]-minigastrin. *Bioconjug Chem.* 2004; 15 (4): 864-871.
  103. von Guggenberg E, Rupprich M, Virgolini I, Decristoforo C.  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-Minigastrin: Improved in vitro and in vivo properties of a short chain analogue. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2005; 32 (Suppl 1): S35.
  104. Reubi JC, Mäcke HR, Krenning EP. Candidates for peptide receptor radiotherapy today and in the future. *J Nucl Med.* 2005; 46 Suppl 1: 67S-75S.
  105. Béhé M, Becker W, Gotthardt M, Angerstein C, Behr TM. Improved kinetic stability of DTPA- dGlu as compared with conventional monofunctional DTPA in chelating indium and yttrium: preclinical and initial clinical evaluation of radiometal labelled minigastrin derivatives. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2003; 30 (8): 1140-1146.
  106. Béhé M, Behr TM. Cholecystokinin-B (CCK-B)/gastrin receptor targeting peptides for staging and therapy of medullary thyroid cancer and other CCK-B receptor expressing malignancies. *Biopolymers.* 2002; 66: 399-418.
  107. Behr TM, Behe MP. Cholecystokinin-B/Gastrin receptor-targeting peptides for staging and therapy of medullary thyroid cancer and other cholecystokinin-B receptor-expressing malignancies. *Semin Nucl Med.* 2002; 32 (2): 97-109.
  108. Pearson RG. Hard and Soft Acids and Bases. *J Am Chem Soc.* 1963; 85 (22): 3533-3539.
  109. Parker D, Pulukkody K, Smith FC, Batsanov A, Howard JAK. Structures of the Yttrium Complexes of 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid (H4dota) and N,N''-Bis(benzylcarbamoylmethyl)diethylene-triamine-N,N',N''-triacetic acid and the Solution Structure of a Zirconium Complex of H4dota. *J Chem Soc, Dalton Trans.* 1994; (5): 689-693.
  110. Chang CA, Francesconi LC, Malley MF, Kumar K, Gougoutas JZ, Tweedle MF. Synthesis, Characterization and Crystal Structures of M(DO3A) (M = Fe, Gd) and Na[M(DOTA)] (M = Fe, Y, Gd). *Inorg Chem.* 1993; 32: 3501-3508.
  111. Loncin MF, Desreux JF, Merciny E. Coordination of Lanthanides by Two Polyamino Polycarboxylic Macrocycles: Formation of Highly Stable Lanthanide Complexes. *Inorg Chem.* 1986; 25 (15): 2646-2648.
  112. Cacheris WP, Nickle SK, Sherry AD. Thermodynamic Study of Lanthanide Complexes of 1,4,7-Triazacyclononane-N,N',N''-triacetic Acid and 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic Acid. *Inorg Chem.* 1987; 26 (6): 958-960.
  113. Zhu X, Lever SZ. Formation kinetics and stability studies on the lanthanide complexes of 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid by capillary electrophoresis. *Electrophoresis.* 2002; 23 (9): 1348-1356.
  114. Jang YH, Blanco M, Dasgupta S, Keire DA, Shively JE, Goddard WA. Mechanism and Energetics for Complexation of  $^{90}\text{Y}$  with 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-
-

- 
- tetraacetic Acid (DOTA), a Model for Cancer Radioimmunotherapy. *J Am Chem Soc.* 1999; 121 (26): 6142-6151.
- 115.** Lewis MR, Raubitschek A, Shively JE. 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. *Bioconjug Chem.* 1994; 5 (6): 565-576.
- 116.** Balogh E, Tripiier R, Ruloff R, Toth E. Kinetics of formation and dissociation of lanthanide(III) complexes with the 13-membered macrocyclic ligand TRITA4. *Dalton Trans.* 2005; (6): 1058-1065.
- 117.** Szilágyi E, Tóth É, Kovács Z, Platzek J, Radüchel B, Brücher E. Equilibria and formation kinetics of some cyclen derivative complexes of lanthanides. *Inorg Chim Acta.* 2000; 298: 226-234.
- 118.** Tóth É, Brücher E, Lázár I, Tóth I. Kinetics of Formation and Dissociation of Lanthanide(III)-DOTA Complexes. *Inorg Chem.* 1994; 33 (18): 4070-4076.
- 119.** Wu SL, Horrocks WD. Kinetics of Complex Formation by Macrocyclic Polyaza Polycarboxylate Ligands: Detection and Characterization of an Intermediate in the  $\text{Eu}^{3+}$ -dota System by Laser-excited Luminescence. *Inorg Chem.* 1995; 34 (14): 3724-3732.
- 120.** Wang XY, Jin TZ, Comblin V, Lopezmut A, Merciny E, Desreux JF. A Kinetic Investigation of the Lanthanide DOTA Chelates. Stability and Rates of Formation and Dissociation of a Macrocyclic Gadolinium(III) Polyaza Polycarboxylic MRI Contrast Agent. *Inorg Chem.* 1992; 31 (6): 1095-1099.
- 121.** Kumar K, Tweedle MF. Ligand Basicity and Rigidity Control Formation of Macrocyclic Polyamino Carboxylate Complexes of Gadolinium (III). *Inorg Chem.* 1993; 32: 4193-4199.
- 122.** Buckingham DA, Clark CR, Rogers AJ. Proton Exchange and Inversion at Coordinated sec-Amine Centers. Particularly Rapid Inversion at Sterically Strained "Planar" N in Some  $[\text{Co}(\text{cyclen})(\text{S-AlaO})]^{2+}$  and  $[\text{Co}(\text{Mecyclen})(\text{S-AlaO})]^{2+}$  Complexes. *J Am Chem Soc.* 1997; 119: 4050-4058.
- 123.** Burai L, Fabian I, Kiraly R, Szilagy E, Brucher E. Equilibrium and kinetic studies on the formation of the lanthanide(III) complexes,  $[\text{Ce}(\text{dota})]^-$  and  $[\text{Yb}(\text{dota})]^-$  ( $\text{H}_4\text{dota} = 1,4,7,10\text{-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid}$ ). *J Chem Soc, Dalton Trans.* 1998; (2): 243-248.
- 124.** de Marcillac P, Coron N, Dambier G, Leblanc J, Moalic JP. Experimental detection of alpha-particles from the radioactive decay of natural bismuth. *Nature.* 2003; 422 (6934): 876-878.
- 125.** Macklis RM, Lin JY, Beresford B, Atcher RW, Hines JJ, Humm JL. Cellular kinetics, dosimetry, and radiobiology of alpha-particle radioimmunotherapy: induction of apoptosis. *Radiat Res.* 1992; 130 (2): 220-226.
-

- 
126. Apostolidis C, Molinet R, McGinley J, Abbas K, Mollenbeck J, Morgenstern A. Cyclotron production of Ac-225 for targeted alpha therapy. *Appl Radiat Isot.* 2005; 62 (3): 383-387.
127. Apostolidis C, Molinet R, Rasmussen G, Morgenstern A. Production of Ac-225 from Th-229 for targeted alpha therapy. *Anal Chem.* 2005; 77 (19): 6288-6291.
128. McDevitt MR, Finn RD, Sgouros G, Ma D, Scheinberg DA. An  $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$  generator system for therapeutic clinical applications: construction and operation. *Appl Radiat Isot.* 1999; 50 (5): 895-904.
129. Ma D, McDevitt MR, Finn RD, Scheinberg DA. Breakthrough of  $^{225}\text{Ac}$  and its radionuclide daughters from an  $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$  generator: development of new methods, quantitative characterization, and implications for clinical use. *Appl Radiat Isot.* 2001; 55 (5): 667-678.
130. Nikula TK, McDevitt MR, Finn RD, Wu C, Kozak RW, Garmestani K, Brechbiel MW, Curcio MJ, Pippin CG, Tiffany-Jones L, Geerlings MW, Sr., Apostolidis C, Molinet R, Geerlings MW, Jr., Gansow OA, Scheinberg DA. Alpha-emitting bismuth cyclohexylbenzyl DTPA constructs of recombinant humanized anti-CD33 antibodies: pharmacokinetics, bioactivity, toxicity and chemistry. *J Nucl Med.* 1999; 40 (1): 166-176.
131. Ma D, McDevitt MR, Finn RD, Scheinberg DA. Rapid preparation of short-lived alpha particle emitting radioimmunopharmaceuticals. *Appl Radiat Isot.* 2001; 55 (4): 463-470.
132. Ballangrud AM, Yang WH, Charlton DE, McDevitt MR, Hamacher KA, Panageas KS, Ma D, Bander NH, Scheinberg DA, Sgouros G. Response of LNCaP spheroids after treatment with an alpha-particle emitter ( $^{213}\text{Bi}$ )-labeled anti-prostate-specific membrane antigen antibody (J591). *Cancer Res.* 2001; 61 (5): 2008-2014.
133. McDevitt MR, Ma D, Lai LT, Simon J, Borchardt P, Frank RK, Wu K, Pellegrini V, Curcio MJ, Miederer M, Bander NH, Scheinberg DA. Tumor therapy with targeted atomic nanogenerators. *Science.* 2001; 294 (5546): 1537-1540.
134. Ballangrud AM, Yang WH, Palm S, Enmon R, Borchardt PE, Pellegrini VA, McDevitt MR, Scheinberg DA, Sgouros G. Alpha-particle emitting atomic generator (Actinium-225)-labeled trastuzumab (herceptin) targeting of breast cancer spheroids: efficacy versus HER2/neu expression. *Clin Cancer Res.* 2004; 10 (13): 4489-4497.
135. Elander N, Jones JR, Shui-Yu L, Stone-Elander S. Microwave-enhanced radiochemistry. *Chem Soc Rev.* 2000; 29: 239-249.
136. Velikyan I, Beyer GJ, Langstrom B. Microwave-supported preparation of  $(68)\text{Ga}$  bioconjugates with high specific radioactivity. *Bioconjug Chem.* 2004; 15 (3): 554-560.
137. Carpino LA, Han GY. The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Function, a New Base-Sensitive Amino-Protecting Group. *J Am Chem Soc.* 1970; 92: 5748-5749.
138. Heppeler A. *Auswirkungen von Metallkomplexgeometrien verschiedener makrozyklischer Polyaminopolycarboxylat Chelatoren auf Biologie und Pharmakologie*
-

---

von *Metall-Peptid Konjugaten*. Basel: Naturwissenschaftlich-philosophische Fakultät, Universität Basel; 2000.

139. Reubi JC, Schar JC, Waser B, Wenger S, Heppeler A, Schmitt JS, Macke HR. Affinity profiles for human somatostatin receptor subtypes SST<sub>1</sub>-SST<sub>5</sub> of somatostatin radiotracers selected for scintigraphic and radiotherapeutic use. *Eur J Nucl Med*. 2000; 27 (3): 273-282.
  140. Wild D, Schmitt JS, Ginj M, Mäcke HR, Bernard BF, Krenning E, De Jong M, Wenger S, Reubi JC. DOTA-NOC, a high-affinity ligand of somatostatin receptor subtypes 2, 3 and 5 for labelling with various radiometals. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2003; 30 (10): 1338-1347.
  141. Powell P. Basel; 2000.
  142. Taylor MD, Amidon GL. *Peptide based drug design*: Am. Chem. Soc.; 1995.
  143. Reubi JC, Zimmermann A, Jonas S, Waser B, Neuhaus P, Laderach U, Wiedenmann B. Regulatory peptide receptors in human hepatocellular carcinomas. *Gut*. 1999; 45 (5): 766-774.
  144. Schmassmann A, Waser B, Flogerzi B, Reubi J-C. Expression of functional neurokinin-1 receptors in regenerative glands during gastric wound healing in rodents. *Gastroenterology*. 2004; 126 (3): 784-795.
  145. Reubi JC, Kvols LK, Waser B, Nagorney DM, Heitz PU, Charboneau JW, Reading CC, Moertel C. Detection of somatostatin receptors in surgical and percutaneous needle biopsy samples of carcinoids and islet cell carcinomas. *Cancer Res*. 1990; 50 (18): 5969-5977.
  146. Sagan S, Quancard J, Lequin O, Karoyan P, Chassaing G, Lavielle S. Conformational Analysis of the C-Terminal Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub> Tripeptide of Substance P Bound to the NK-1 Receptor. *Chem Biol*. 2005; 12: 555-565.
  147. Hagan RM, Ireland SJ, Jordan CC, Beresford IJ, Deal MJ, Ward P. Receptor-selective, peptidase-resistant agonists at neurokinin NK-1 and NK-2 receptors: new tools for investigating neurokinin function. *Neuropeptides*. 1991; 19 (2): 127-135.
  148. Vassout A, Veenstra S, Hauser K, Ofner S, Brugger F, Schilling W, Gentsch C. NKP608: a selective NK-1 receptor antagonist with anxiolytic-like effects in the social interaction and social exploration test in rats. *Regul Pept*. 2000; 96 (1-2): 7-16.
  149. Merlo A, Mäcke HR, Reubi J-C, Good S; Int Patent, assignee. Radiopharmaceuticals for Cancer Diagnosis and Treatment, 2004.
  150. Eberle AN, Mild G, Froidevaux S. Receptor-mediated tumor targeting with radiopeptides. Part 1. General concepts and methods: applications to somatostatin receptor-expressing tumors. *J Recept Signal Transduct Res*. 2004; 24 (4): 319-455.
-

- 
151. Ginja M, Chen J, Walter MA, Eltschinger V, Reubi JC, Maecke HR. Preclinical evaluation of new and highly potent analogues of octreotide for predictive imaging and targeted radiotherapy. *Clin Cancer Res.* 2005; 11 (3): 1136-1145.
  152. Liu S, Edwards DS. Stabilization of <sup>90</sup>Y-labeled DOTA-biomolecule conjugates using gentisic acid and ascorbic acid. *Bioconjug Chem.* 2001; 12 (4): 554-558.
  153. Hiller KO, Asmus KD. Oxidation of methionine by X<sub>2</sub><sup>-</sup> in aqueous solution and characterization of some S therefore X three-electron bonded intermediates. A pulse radiolysis study. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* 1981; 40 (6): 583-595.
  154. Mentlein R, Lucius R. Methods for the investigation of neuropeptide catabolism and stability in vitro. *Brain Res Prot.* 1996; 1 (3): 237-246.
  155. Roettger BF, Rentsch RU, Pinon D, Holicky E, Hadac E, Larkin JM, Miller LJ. Dual pathways of internalization of the cholecystokinin receptor. *J Cell Biol.* 1995; 128 (6): 1029-1041.
  156. Roettger BF, Ghanekar D, Rao R, Toledo C, Yingling J, Pinon D, Miller LJ. Antagonist-stimulated internalization of the G protein-coupled cholecystokinin receptor. *Mol Pharmacol.* 1997; 51 (3): 357-362.
  157. Christophe J. Pancreatic tumoral cell line AR4-2J: an amphicrine model. *Am J Physiol.* 1994; 266 (6 Pt 1): G963-971.
  158. Li WP, Ma DS, Higginbotham C, Hoffman T, Ketring AR, Cutler CS, Jurisson SS. Development of an in vitro model for assessing the in vivo stability of lanthanide chelates. *Nucl Med Biol.* 2001; 28 (2): 145-154.
  159. Bensimon C, Oelsner S, Danks P, Chan A, Maecke HR, Good S. A comparison of High and Low Specific Activity Lutetium-177 for Radiolabeling Peptides and Proteins. *Eur J Nucl Med.* 2004; (31/2): S391.
-

---

## ***Index***

$^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generator 155  
2-Hydrazinnikotinsäure (HYNIC) 27  
 $^{99\text{m}}\text{Tc}$  25  
Agonist 98, 123  
Annihilation 15  
Antagonist 98, 123  
Apoptose 51  
AR4-2J 78, 101, 123, 127  
Bifunktioneller Chelator BFC 23  
Bindungsaffinität 96, 116  
Blockierung 78, 102, 124  
Calcitonin 41  
Cerebrospinale Flüssigkeit CSF 91  
Cholecystokinin 42  
Cross-Fire-Effekt 18  
Direct-labeling Approach 25  
DOTAGA 38, 97  
DOTAGA( $^t\text{Bu}$ )<sub>4</sub>-OH 68  
Externalisierung 104  
Festphasensynthese 32  
Gammakamera 13  
Gastrin 42  
Hirntumor 35  
IC<sub>50</sub> 117  
Internalisierung 77, 101, 123, 127, 134  
Kaisertest 63  
Kitformulierung 26  
Koinzidenz 15  
Komplexierung 48, 139  
Konzentrationsbestimmung 66, 67  
linearer Energietransfer (LET) 50

---



Linker 20  
LN319 77, 102  
Medulläre Schilddrüsenkarzinome 41  
Minigastrin 45  
Nebenwirkungen 22  
Nuklearmedizin 13  
Oxidation 87, 94  
Pentagastrin 41  
Peptidrezeptoren 21  
Peptidsynthese 62  
Positronen-Emissionstomographie (PET) 15  
Postlabeling Approach 26, 54  
Prelabeling Approach 25, 54  
Prochelator 64  
Radiojodtherapie 42  
Radionuklid 24  
Rezeptorautoradiographie 96, 116  
Rezeptorgesteuerte Radiopharmazeutika 19  
Routineuntersuchungen 18  
Serumstabilität 77, 94, 119  
Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS) 32, 62  
Spacer 20  
SPECT 14  
SPECT/CT 134  
Spezifische Aktivität 22, 152  
Stabilität 91, 94, 137  
Substanz P 36  
Szintigraphie 134  
Tachykinine 36  
Trifunktionelle Peptide 21  
Zyklotron 51

---

---

## Curriculum Vitae

Stephan Good

Geboren am 17. Juni 1973 in Basel (CH)

Bürger von Aesch BL (CH)

Neueneichweg 17

4153 Reinach

Verheiratet mit Corinne Good

Schulen und Studium:

1980 – 1985 Primarschule Aesch

1985 – 1989 Progymnasiale Abteilung der Sekundarschule Aesch

1989 – 1992 Gymnasium Münchenstein, Typus C, naturwissenschaftlich-mathematisch

1993 – 2000 Chemiestudium Universität Basel, Nebenfach Betriebswirtschaft,  
Kostenrechnung, Finanzbuchhaltung

1998 Diplomarbeit bei Prof. Dr. E. C. Constable, Universität Basel

2000 – 2006 Dissertation bei Prof. Dr. H. R. Mäcke, Abteilung Radiologische Chemie  
Universitätsspital Basel

Lehrveranstaltungen folgender Dozenten wurden besucht:

M. Bruhn, E. C. Constable, H. Gampp, B. Giese, P. Hauser, A. Herrmann, C. L. Housecroft,  
H. Huber, H.-C. Im Hof, M. Jungen, T. A. Kaden, H. R. Mäcke, J. P. Maier, W. P. Meier, W.  
R. Müller, M. Neuburger - Zehnder, M. Oehme, A. Pfaltz, U. Séquin, H. Schierenbeck, P.  
Schiess, I. Sick, H. Sigel, T. Studer, L. Tauscher, A. Vedani, H. Wennemers, H.-J. Wirz, W.-  
D. Woggon, A. D. Zuberbühler

---