

**Bewertung der lokoregionalen Radioimmuntherapie
disseminierter Tumorzellen des diffusen Magenkarzinoms
mit einem ^{213}Bi gekoppelten tumorspezifischen Antikörper
im Mausmodell**

Roswitha Huber

Aus der Nuklearmedizinischen Klinik und Poliklinik
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
Direktor: Prof. Dr. M. Schwaiger

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. med. Dr. phil. Reingard Senekowitsch-Schmidtke

Vorgelegt über Prof. Dr. med. vet. K. Tempel:
Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig - Maximilians - Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. vet. R. Schulz

**Bewertung der lokoregionalen Radioimmuntherapie disseminierter
Tumorzellen des diffusen Magenkarzinoms mit einem ^{213}Bi gekoppelten
tumorspezifischen Antikörper im Mausmodell**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig - Maximilians - Universität München

von
Roswitha Huber
aus Traunstein / Bayern

München 2003

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. R. Stolla
1. Referent:	Univ.-Prof. Dr. K. Tempel
2. Referent:	Prof. Dr. J. Wittmann
1. Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. B. Aigner
2. Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. R. Wanke
3. Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. R. T. Korb

Tag der Promotion: 18. Juli 2003

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1	Radioimmuntherapie	3
2.1.1	Geschichte der Radioimmuntherapie	3
2.1.2	Auswahl des Radionuklids für die Radioimmuntherapie	4
2.1.3	Wismut-213-Immuntherapie	6
2.1.4	Toxizität	8
2.1.5	Carrier	10
2.1.6	Koppelung des Radionuklids an den Antikörper	13
2.2	Das diffuse Magenkarzinom	15
2.2.1	Status quo – Therapieformen	15
2.2.2	Spezifische Antikörper für die Radioimmuntherapie des diffusen Magenkarzinoms	17
2.3	Tiermodell für die α-Radioimmuntherapie	18
3	MATERIAL UND METHODEN	20
3.1	Chemikalien und Medikamente	20
3.2	Lösungen	22
3.2.1	Anästhesie	22
3.2.2	Zellkultur	23
3.2.3	Chromosomenpräparation	23
3.3	Geräte	24
3.4	Antikörper für die Therapie	24
3.4.1	Anti-delta 9-E-Cadherin	24
3.4.2	Anti-delta 8-E-Cadherin	25
3.4.3	Anti-delta 9-E-Cadherin Fab'-Fragmente	25
3.5	Radionuklide	25
3.5.1	Wismut-213	25
3.5.1.1	Ac-225/Bi-213-Generator	27
3.5.1.2	Chelatierung der Antikörper	28
3.5.1.3	Radionuklidmarkierung der chelatierten Antikörper und Fragmente	29
3.5.2	Indium-111	29
3.5.3	Jod-125	30
3.5.4	Radiojodmarkierung	30

3.6 Zelllinien und Zellkultur.....	30
3.6.1 Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-435S.....	30
3.6.2 Magenkarzinomzelllinie HSC45-M2.....	31
3.6.3 Kultivierung der Zellen.....	31
3.6.4 Immunfluoreszenz.....	32
3.7 Immunreaktivität der Radioimmunkonjugate.....	32
3.8 Tierexperimente.....	33
3.8.1 Versuchstiere und Haltung.....	33
3.8.2 Anästhesie und Tötung.....	33
3.8.3 Tumormodelle.....	34
3.8.3.1 Peritonealkarzinose.....	34
3.8.3.2 Darstellung der Karzinose.....	35
3.8.3.2.1 Histologie.....	35
3.8.3.2.2 Sonographie.....	35
3.8.3.2.3 In-vivo-Kernspintomographie.....	36
3.8.3.2.4 In-vivo-Fluoreszenzanalyse „Optical Imaging“.....	37
3.8.3.3 Erzeugung solider, subkutaner Tumoren.....	37
3.8.4 Verteilung der Radioimmunkonjugate im murinen Organismus.....	37
3.8.4.1 Beobachtung der Kinetik mittels Szintigraphie.....	37
3.8.4.2 Biodistribution.....	38
3.8.5 Therapiestudie.....	39
3.8.6 Untersuchungen zur Toxizität der Radioimmunkonjugate.....	40
3.8.6.1 Zählung peripherer Leukozyten.....	40
3.8.6.2 Präparation des Knochenmarks zur Analyse chromosomaler Aberrationen.....	41
3.8.6.3 Blutharnstoff- und Kreatininwerte von ausgewählten Tieren.....	43
3.9 Zytologie und Histologie.....	43
3.9.1 Quantifizierung der HSC45-M2-Zellen im Aszites.....	43
3.9.2 Herstellung von Kryostat-Gewebeschnitten.....	44
3.9.3 Immunhistochemie.....	44
3.9.4 Mikroautoradiographie.....	46
3.10 Statistische Auswertung der Überlebensdaten.....	47
4 ERGEBNISSE	48
4.1 Kopplung der Radionuklide an den Antikörper.....	48
4.2 Charakteristika der verwendeten Tumorzelllinien.....	49
4.2.1 Verdopplungszeit der Zellen in vitro.....	49
4.2.2 Überprüfung der d9-E-Cad-Antigenexpression mittels Immunfluoreszenz.....	49

4.3 Tierexperimente.....	51
4.3.1 Manifestierung der Peritonealkarzinose.....	51
4.3.2 Techniken zur In-vivo-Darstellung der Peritonealkarzinose.....	54
4.3.2.1 Sonographie.....	54
4.3.2.2 Kernspintomographie.....	55
4.3.2.3 Optical Imaging.....	58
4.3.3 Verteilung der Radioimmunkonjugate im murinen Organismus.....	59
4.3.3.1 Szintigraphie.....	60
4.3.3.2 Biodistribution und Biokinetik.....	62
4.3.4 Therapeutische Effizienz.....	69
4.3.4.1 Überlebenszeit nach HSC-Inokulation.....	69
4.3.4.2 Überlebenszeit nach MDA-Zellinokulation.....	74
4.3.5 Toxizität von ²¹³ Bi-d9MAk.....	75
4.3.5.1 Entwicklung des Gewichts der Mäuse nach Radioimmuntherapie.....	75
4.3.5.2 Verlauf der Leukozytenzahlen.....	76
4.3.5.3 Chromosomale Aberrationen.....	77
4.3.5.4 Überleben nach Applikation von ²¹³ Bi-d9MAk ohne vorherige Tumorzellinokulation.....	81
4.3.5.5 Veränderungen von Nierenfunktionsparametern nach Applikation von ²¹³ Bi-d9MAk.....	82
4.4 Histologie und Zytologie.....	83
4.4.1 Histopathologie von Nieren ausgewählter Tiere.....	83
4.4.2 Zahl der HSC45-M2-Zellen im Aszites.....	84
4.4.3 Expression von d9-E-Cad im xenotransplantierten, soliden Tumor	85
4.4.4 Penetrationstiefe von intaktem d9MAk und Fab'-Fragmenten in den Tumor.....	86
5 DISKUSSION	88
6 ZUSAMMENFASSUNG	106
7 SUMMARY	108
8 LITERATURVERZEICHNIS	110

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
Ci	Curie, alte Einheit für Radioaktivität: $1 \text{ Ci} = 3,7 \times 10^{10} \text{ Zerfälle / sec}$
Con A	Concanavalin A
cpm	counts per minute
d	Tag
Da	Dalton (g/Mol)
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
d9MAk	monoklonaler Antikörper gegen d9-Mutation des E-Cadherins
d9-E-Cad	Mutation des Exon 9 für die Expression des E-Cadherins
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eV	Elektronenvolt
FACS	Fluorescence assorted cell sorting
FCS	Fetal Calf Serum
h	Stunde
HAMA	humane Anti-Maus-Antikörper
HSC	Human Signetringcell Carcinoma
HWZ	physikalische Halbwertszeit
i.p.	intraperitoneal
ITLC	Instant Thin Layer Chromatography als Papierchromatographie
i.v.	intravenös
LD ₅₀	Dosis, bei der 50% der Versuchstiere sterben (Letaldosis)
LET	linearer Energietransfer
MAk	monoklonaler Antikörper
MRT	Magnetresonanztomographie

Abkürzungsverzeichnis

MTA	maximal tolerierte Aktivität
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Meßpunkte (Tiere oder Zellen)
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphatpuffer)
p. i.	post injectionem
RIK	Radioimmunkonjugat
RIT	Radioimmuntherapie
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
s.c.	subkutan
% ID/g	Prozent der injizierten Aktivität pro Gramm Gewebe

1 Einleitung

Jährlich erkranken 18 von 100 000 Deutschen an Magenkarzinom. In Japan sind 126 von 100 000 Menschen betroffen. Dies bedeutet ca. 156 000 Neuerkrankungen pro Jahr allein in Japan. Dort wie in China, Taiwan und Korea ist Magenkrebs eine der häufigsten, tumorbedingten Todesursachen. Alljährlich werden daher in Japan 6 Millionen Menschen vorsorglich untersucht [Kasakura et al., 2002]. Bei Diagnose einer Peritonealkarzinose, der Folge diffuser Tumorzellausbreitung in der Bauchhöhle, beträgt die Lebenserwartung eines Patienten derzeit etwa 12 Monate. Selbst bei resektablen, also noch nicht disseminierten Magenkarzinomen mit negativen Lymphknotenbefunden liegt die rezidivfreie Drei-Jahres-Überlebensrate bei nur etwa 45%.

Chirurgisch ist eine Peritonealkarzinose nicht behandelbar. Die Vielfalt an Therapieansätzen und -modalitäten, die zur Problematik der Peritonealkarzinose veröffentlicht wurden, - von intraoperativer Bestrahlung [Dulce et al., 1991] über präoperative Chemotherapie [Morant, 2001] bis hin zur Applikation von Radionuklid-Liposomen-Konstrukten [Emfietzoglou et al., 2001] - indiziert, dass ein optimales Therapieverfahren noch nicht gefunden ist. Noch am aussichtsreichsten scheint der Einsatz von Zytostatika, welcher sich das prominenteste, maligne Charakteristikum von Tumorzellen zu Nutze macht, nämlich die rasche, ungehemmte Teilungsfähigkeit. Substanzen, die in die Zellteilung eingreifen, werden appliziert und führen zum reproduktiven Zelltod aller sich teilender Zellen. Die Nebenwirkungen erstrecken sich daher von Immunsuppression über Gerinnungsstörung, metabolischen Sauerstoffmangel, Mukositis und Hyperurikämie bis zur Gefahr zytostatika-induzierter Sekundärkarzinome. Besonders betroffen sind die schnell proliferierenden Gewebe wie Knochenmark und Epithelien des Magendarmtrakts.

Die Radioimmuntherapie dagegen bedient sich membranständiger Proteinstrukturen, die von Tumorzellen exprimiert werden, um zytotoxische Wirkstoffe mittels Carrier daran zu binden. Meistens steht eine Überexpression des Bindungsmoleküls an den Tumorzellen im Zentrum einer Radioimmuntherapie. Das Zielmolekül für die „tumorassoziierten“ Antikörper wird also auch an physiologischen Zellen des Organismus in geringerem Ausmaß exprimiert. Das impliziert, dass an diese Zellen das Radiotherapeutikum ebenfalls bindet. Das Kernstück der vorliegenden Studie ist dagegen ein tumorspezifischer Antikörper - einer von weltweit zwei beschriebenen. Es

war gelungen, eine Zielstruktur auf Magenkarzinomzellen zu finden, die auf einer charakteristischen Mutation der Zellen beruht, welche dadurch modifiziertes E-Cadherin exprimieren [Handschuh et al., 1999]. Unter Einsatz moderner Techniken der monoklonalen Antikörperherstellung konnte ein spezifischer Ligand für diese Proteinmutante entwickelt werden [Becker et al., 1999]. An diesen monoklonalen Antikörper wurde ein Radionuklid mittels bifunktionellem Chelator gekoppelt. Als zytotoxische Agentien scheinen α -Emitter besonders geeignet, da sie auf kurze Distanz im Gewebe viel Energie deponieren. Einer der wenigen α -Emitter, die sich für den klinischen Einsatz am Patienten eignen, ist ^{213}Bi mit der Halbwertszeit von 45,6 min. Jedes ^{213}Bi -Atom gibt beim Zerfall seine Energie von 8,4 MeV im Gewebe innerhalb einer Wegstrecke von 80 μm ab und tötet somit effektiv Zellen in unmittelbarer Umgebung.

Die lokoregionale Applikation ermöglicht eine rasche Bindung des ^{213}Bi gekoppelten tumorspezifischen Antikörpers an die Tumorantigene mit maximalem therapeutischem Erfolg und minimaler Toxizität, die in der vorliegenden Studie im Tiermodell an Hand von Biodistributionsstudien und Überlebenszeiten in Abhängigkeit von der applizierten Aktivität in verschiedenen Peritonealkarzinosestadien erfasst wurden. Die Bewertung der Toxizität erfolgte an Veränderungen der Körpermasse der Tiere, des Weißen Blutbildes, Chromosomenaberrationen im Knochenmark und an Nierenfunktionswerten, sowie histologisch an makroskopisch veränderten Nieren. Darüber hinaus wurden Techniken zur Visualisierung der Peritonealkarzinose in vivo getestet. Sonographie, Kernspintomographie und „Optical Imaging“ kamen zur Anwendung. Szintigraphie wurde genutzt, um die Verteilung und Retention der Radioimmunkonjugate in vivo darzustellen.

Im Gegensatz zu einem kurativen Ansatz, bei dem alle teilungsfähigen Tumorzellen im Körper abgetötet werden, zielt die Strategie der vorliegenden Studie auf eine adjuvante Therapie ab, bei der Einzelzellen, welche Tumorrezidive und Peritonealkarzinose auslösen, perioperativ bei der Resektion des Primärtumors abgetötet werden. Dieser Therapieansatz ist über seine spezielle Bedeutung für die Eindämmung des diffusen Magenkarzinoms hinaus als „proof of concept“ für den lokoregionalen Einsatz bei jeder Peritonealkarzinose anzusehen, sei sie die Folge eines Colon-, Ovarial-, oder Pankreaskarzinoms oder seltener anderer disseminierter Tumorzellausaat.

2 Literaturübersicht

2.1 Radioimmuntherapie

2.1.1 Geschichte der Radioimmuntherapie

Die Nuklearmedizin befasst sich mit der Inkorporation von Radionukliden als Tracer, um biologische Stoffwechselfvorgänge zu untersuchen und um Krankheiten zu diagnostizieren und zu therapieren. Ein Spezialgebiet ist die Radioimmuntherapie (RIT), bei der an Antikörper gekoppelte Radionuklide eingesetzt werden.

Im Jahr 1923 nutzte George Hevesy eine geringe Menge eines natürlich vorkommenden radioaktiven Bleiisotops, um den Kalziumstoffwechsel in Pflanzen zu studieren. Schon ein Jahr später wurde sein Prinzip zu Diagnosezwecken auf Untersuchungen an herzkranken Patienten übertragen. Für die „Tracer-Methode“ erhielt Hevesy im Jahr 1943 den Nobelpreis für Chemie.

Den nächsten Meilenstein setzten F. und I. Joliot-Curie, denen es im Jahr 1934 gelang, Radionuklide künstlich herzustellen. Dies eröffnete beachtliche Möglichkeiten für die Diagnostik und Therapie. M. Ter-Pogossian, der Vater der Positronen-Emissions-Tomographie (PET), brachte in den 50er Jahren des vorigen Jahrhunderts Dynamik in die apparative Entwicklung der Nuklearmedizin: Kurzlebige, positronen-emittierende Radionuklide integriert in Tracer mit definierter Stoffwechselfunktion verlangten nach empfindlichen, externen, möglichst beweglichen Detektoren [Syrota, 1996]. Die erste Generation von geeigneten Apparaturen in Form von PET-Scannern und der γ -Kameras war um 1957 geboren.

Anfänge therapeutischer Verwendungen von Radionukliden in der Nuklearmedizin reichen ebenfalls in die 50er Jahre zurück. Lange Zeit wurde mit Radionuklidtherapie jedoch fast ausschließlich die Radiojod-Therapie assoziiert. Noch 1991 betrug der Anteil der Therapien, die nicht die Schilddrüse betrafen, lediglich 7,6% aller in Deutschland durchgeführten nuklearmedizinischen Therapien (insgesamt 30.526 Fälle) [Bruckberger, 1992].

Nur langsam setzte sich das Bewusstsein über die Vielfalt der von Ehrlich 1904 postulierten „Magic Bullets“ durch. Hiernach sollen definierte Zielstrukturen als spezifische Bindungsstellen für Carrier von zytotoxischen Substanzen wie

Radionuklide gegen Tumore dienen. Es lag daher nahe, sich der Spezifität von Antigen-Antikörperbindung zu bedienen. Die Radioimmuntherapie orientierte sich zunächst an den Erfahrungen mit den Nukliden aus der Radiojod-Therapie. Primus u. Mitarb. markierten 1973 einen polyklonalen Ak gegen das erste tumorassoziierte Antigen, das Carcinoembryonale Antigen (CEA), mit Jod-131 (^{131}I) oder Jod-125 (^{125}I) und erreichten damit einen vierfach höheren Tumor/Blut-Quotienten im Xenotransplantat-Modell mit hoher CEA-Expression als mit irrelevantem Immunglobulin G (IgG) [Primus et al., 1973].

Mit der Hybridomatechnik eröffnete sich die Möglichkeit, monoklonale Antikörper (MAk) mit stets gleich hoher Spezifität und Affinität zum Antigen in größerer Menge herzustellen [Köhler und Milstein, 1975]. Mit anti-CEA MAk haben bis in neuerer Zeit die ^{131}I -Konjugate nicht an Attraktivität bei Therapie gastrointestinaler Karzinome eingebüßt [Kamigaki et al., 1995; Storto et al., 2001]. So zeigte sich in ersten Phase-I/II-Studien die RIT mit ^{131}I -anti-CEA gegenüber der konventionellen Chemotherapie bei Lebermetastasen eines kolorektalen Karzinoms vor allem wegen der geringeren Nebenwirkungen überlegen [Behr et al., 1999c].

2.1.2 Auswahl des Radionuklids für die RIT

Das Repertoire an einsetzbaren Nukliden für RIT erweiterte sich rasch über ^{131}I und ^{125}I hinaus um die β -Emitter Phosphor-32 (^{32}P), Yttrium-90 (^{90}Y), Rhenium-188 und Kupfer-67 [Bloomer et al., 1985].

Erst Ende der 80er Jahre wurden die α -Emitter Wismut-212 (^{212}Bi) und Astat-211 (^{211}At) für die RIT entdeckt. Fand sich im Lehrbuch „Nuklearmedizin - Basiswissen und klinische Anwendung“ 1997 noch zu lesen: „*Der lineare Energietransfer (LET) ist bei α -Strahlen so groß, daß die Wahrscheinlichkeit für die Erzeugung von Strahlenschäden größer ist als ein therapeutischer Effekt. Aus diesem Grunde werden Nuklide, die α -Strahlen emittieren, in der Nuklearmedizin...nicht eingesetzt.*“ [Schicha und Schober, 1997], so spricht die jüngere Entwicklung für eine doch deutlich positivere Beurteilung des Einsatzes von α -Emittern.

Tatsächlich ist der lineare Energietransfer (LET) (ca. 100 keV/ μm Gewebe) von α -Emittern erheblich höher als bei β -Emittern (0,2 keV/ μm), weil sowohl die Masse

des emittierten Teilchens, als auch dessen Wechselwirkungsquerschnitt deutlich über dem jeweiligen Pendant von β -Emittlern liegen. Dieser Unterschied wirkt sich auf die Quantität und Qualität der Zellschädigung aus. Das klonogene Überleben von Lymphomzellen kann mit drei bis fünf α -Teilchen, die den Zellkern treffen, auf 10% reduziert werden [Macklis et al., 1992]. Das entspräche bei der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinie etwa 25 α -Teilchen, die an die Zellen gebunden sind. Für den gleichen Effekt müssten sich bei der Verwendung des β -Emitters ^{90}Y ca. 1200-mal mehr Zerfälle an der Zellmembran ereignen [Humm, 1987]. Die dicht ionisierende α -Strahlung verursacht mehr DNS-Doppelstrangbrüche als locker ionisierende Strahlung. Sie ist somit in der Zytotoxizität weit weniger abhängig von der Strahlensensitivität der Zielzelle sowie von deren Zellzyklus und Sauerstoffpartialdruck [Hall, 1994]. Supiot beobachtete an Myelomazellen nach Inkubation mit ^{213}Bi oder ^{131}I -markiertem Antikörper, dass im ersten Fall eine Arretierung des Zellzyklus zwischen G_2 und M-Phase eintrat, mit ^{131}I jedoch nicht [Supiot et al., 2002].

Die klinische Anwendung der β -Emitter ist charakterisiert von der Reichweite der frei werdenden Elektronen. Diese liegt im Bereich von 0,6 bis 4 mm und ist somit um ca. zwei Zehnerpotenzen höher als der Durchmesser des Ziels, der Tumorzelle. Selbst bei einer spezifischen Bindung der RIK tritt folglich eine Streuung über das eigentliche Ziel hinaus auf, wodurch die umgebenden Tumorzellen, die den Ak selbst nicht binden, ebenfalls bestrahlt werden („Kreuzfeuer-Effekt“). Doch auch physiologische Nachbarzellen werden gleichermaßen geschädigt.

In einem Lungenmetastasenmodell bei Mäusen zeigte der Vergleich der Wirkung des β -Emitters ^{90}Y und des α -Emitters ^{213}Bi jeweils an den gleichen Antikörper gekoppelt und i.v. appliziert den gleichen therapeutischen Erfolg bis Zellverbandsgrößen von 2000 Zellen. Bei größeren Metastasen war der β -Emitter ^{90}Y dem α -Emitter ^{213}Bi im Therapieergebnis überlegen. Die mit ^{90}Y behandelten Tiere erlagen jedoch aktivitätsabhängig innerhalb von 20 d ihren Lungenhämorrhagien oder zeigten ca. 60 d nach Applikation von bis zu 10 MBq Langzeitschäden in Form von Lungenfibrose [Kennel et al., 1999a]. Bei der Therapie von kleineren Metastasen, disseminierten Einzelzellen oder „flüssigen Tumoren“ kann hingegen das Bestrahlungsverhältnis von Tumor zu Ganzkörper mit α -Emittlern etwa 1000-mal höher sein als mit β -Emittlern [Sgouros et al., 1999].

Die Größe des Tumors ist somit eines der wichtigsten Kriterien bei der Wahl des Radionuklids. Als „potente Einzelzellzerstörer“ sind α -Emitter prädestiniert für die Bekämpfung einer disseminierten, abdominalen Tumorzellaussaat, dem Beginn der Peritonealkarzinose.

Von den über einhundert verfügbaren α -Emittlern sind die meisten bereits aus praktischer Erwägung vom In-vivo-Einsatz auszuschließen. Sie müssen Ansprüchen genügen wie hinreichender chemischer und physikalischer Reinheit, ökonomischer Verfügbarkeit und adäquater Halbwertszeit (HWZ). Letztere muss lang genug sein für das Kopplungsverfahren an den Ak und die Bioverteilung und kurz genug, um den Patienten nicht durch eine übermäßige Strahlenexposition zu gefährden.

Einer der wenigen α -Emitter, die diese Kriterien erfüllen, ist ^{213}Bi mit einer HWZ von 45,6 min. Seine Photonenemission mit 440 keV ermöglicht In-vivo-Szintigraphie am Patienten und eine einfache Aktivitätsmessung im γ -Counter [Sgouros et al., 1996]. Überdies kommt der einfachen Detektierbarkeit eine große Bedeutung im Strahlenschutz zu. ^{213}Bi kann aus einem $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generator eluiert werden, wobei auch ^{225}Ac α -Teilchen emittiert. Um radiochemisch reine ^{213}Bi -Eluate zu gewährleisten, waren Trägerharze zu entwickeln, die der hochenergetischen Strahlung lange genug standhalten [Gangwer et al., 1977]. Die Lösung boten anorganische Harze auf Siliziumbasis [Mirzadeh und Kennel, 1996]. Spuren weiterer Tochternuklide von ^{225}Ac wie beispielsweise ^{221}Fr oder ^{209}Pb können durch neue Meßmethoden erfasst und neben der Qualitätskontrolle auch in die Dosimetrie einbezogen werden [Ma et al., 2001a]. Mit Hilfe eines neu entwickelten Prozesses konnte das Eluierungsverfahren um die Hälfte auf 10 min beschleunigt werden [Ma et al., 2001 b].

2.1.3 Wismut-213-Immuntherapie

Durch diese Verbesserungen in der Technik der Generatorherstellung ist ^{213}Bi mittlerweile gut verfügbar. Dieses Radionuklid wird daher seit wenigen Jahren [Buchsbaum, 2000] intensiv zur Entwicklung von RIT genutzt, obwohl es noch im Jahr 1996 weder durch Zweit noch durch Wilder in ihren Review-Artikeln zur RIT überhaupt Erwähnung fand [Zweit, 1996; Wilder et al., 1996].

Für präklinische Studien wurden verschiedene Tumormodelle vor allem in Mäusen entwickelt. So wurde beispielsweise ^{213}Bi gekoppelt an HuM195, einem humanisierten Anti-CD33 MAk gegen myeloische Leukämie, gesunden Balb/c über 10 Wochen mit Aktivitäten von 37 bis 222 MBq/kg i.v. appliziert, ohne dass toxische Wirkungen auf deren Gewicht oder Lebenserwartung auftraten [Jurcic et al., 1995]. Weiterhin wurden s.c. Xenotransplantate eines Kolonkarzinoms in Nacktmäusen verwendet, um die maximale tolerierte Aktivität (MTA) eines ^{213}Bi -markierten Fab'-Fragments von CO17-1A festzustellen. Der Ak bindet in diesem Fall an ein Glykoprotein, das in gastrointestinalen Karzinomen überexprimiert wird. Die MTA betrug 26 MBq (700 μCi), wobei das dosislimitierende Organ die Niere war [Behr et al., 1999a].

Menschliche Ovarialkarzinomzellen SK-OV-3 überexprimieren ein Antigen, das der MAk C6.5-A und seine scFv-Fragmente erkennen. Adams u. Mitarb. [2000] schlossen aus dem ähnlichen Therapieerfolg des spezifischen und eines unspezifischen ^{213}Bi -Immunkonjugates bei s.c. Xenotransplantaten, dass die HWZ von ^{213}Bi für die systemische Applikation vermutlich zu kurz sei. Ähnlich argumentieren Kennel u. Mitarb.. In ihrem Ansatz verwenden sie i.v. applizierten ^{213}Bi -markierten MAk, der an murines Thrombomodulin andockt, und so eine Zerstörung der Tumorgefäße von Lungenkarzinomen bewirkt [2002]. Der prinzipielle Vorteil dabei liegt in der geringeren Abhängigkeit des Therapieerfolges von der Größe der Tumoren [Link und Carpenter, 1990]. In einem Hundemodell wurde ^{213}Bi erfolgreich eingesetzt, um durch Kombination von externer Bestrahlung und Radionuklidapplikation bei Leukämie die jeweiligen Nebenwirkungen zu verringern [Sandmaier et al., 2002].

Die ersten klinischen Phase-I-Studien mit ^{213}Bi -HuM195 wurden am Memorial Sloan-Kettering Cancer Center in New York an Leukämie-Patienten durchgeführt. Auch Aktivität bis zu 50 MBq/kg lag noch unterhalb der MTA [Sgouros et al., 1999]. Die nach Applikation von Aktivitäten zwischen 10,4 und 37 MBq/kg gemessenen Knochenmarksdepressionen erholten sich innerhalb von 22 d [Jurcic et al., 2002]. Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen wurden in Heidelberg mit bis zu 1,7 GBq (45 mCi) ^{213}Bi -anti-CD20-Ak therapiert. Hier trat ebenfalls keine akute Toxizität auf. Es waren lediglich zwei Fälle geringgradiger Leukopenie zu beobachten [Heeger et al., 2002].

Bei Melanomen wurde von Allen u. Mitarb. [2002] bis zu 13 MBq (350 μCi) eines murinen ^{213}Bi -MAk intraläsional verabreicht. Die Histologie zeigte schon ab einer

applizierten Aktivität von 4,3 MBq (150 μ Ci) eine Abtötung nahezu aller Tumorzellen. Einer von zehn Patienten bildete Ak gegen die murinen Proteine des RIK.

2.1.4 Toxizität

Untersuchungen zur Zytotoxizität von ^{213}Bi ergaben eine Abhängigkeit von Größe und Form sowohl der Zelle als auch des Zellkerns [Stinchcomb und Roeske, 1995]. Die Erklärung dafür ist zum einen die stereometrische Anordnung des Kerns in der Zelle und zum anderen die Expression der Antigene. Es überrascht daher nicht, dass drei- bis sechsmal mehr ^{213}Bi -Zerfälle notwendig sind, um gleiche Fraktionen von Monolayer-Zellen zu töten wie von gleichen Zellen in Sphäroiden [Kennel et al., 1999b]. In-vitro konnte an den MDA-Zellen, die auch in der vorliegenden Studie verwendet werden, bei spezifischer Bindung des ^{213}Bi -Immunkonjugates an Monolayer-Zellen eine LD_{50} von 333 kBq/ml festgestellt werden. In Suspension betrug die LD_{50} dagegen 130 kBq/ml. Unspezifisches RIK tötete in Suspension bei 444 kBq/ml 50 % der Zellen. Die selektive Zytotoxizität war bei 222 kBq/ml am deutlichsten [Miederer et al., 2003].

Die Reichweite des α -Teilchens, in der Ionisationsereignisse stattfinden, beträgt etwa 80 μm und somit mehr als der Durchmesser einer Zelle. Dennoch konnten Miederer u. Mitarb. [2003] keinen Kreuzfeuer-Effekt in Zellen, die zu einem Pellet geformt waren im Unterschied zu Zellen in Suspension nachweisen. Die Ursache hierfür liegt anscheinend in einem RIK-Überschuss in der Zellsuspension. Durch unspezifische Bestrahlung der Zellen durch freies RIK wurde die Zelltoxizität in beiden Systemen äquilibriert. Insbesondere bei α -Emittern, die ihre Strahlungsenergie lokal deponieren, ist die Wirkung von einer homogene Antigenverteilung oder kompensatorisch entsprechend höherer Antigendichte abhängig [Goddu et al., 1994; Schmid et al., 1996]. Die Dosimetrie wird sowohl durch eine mikroskopische Heterogenität der RIK-Verteilung als auch durch eine makroskopische Heterogenität erschwert [Kvinnsland et al., 2001]. Letztere tritt regelmäßig in Tumoren mit nekrotischen Arealen und in der Niere durch unterschiedliche Gewebsstruktur in Rinde und Mark auf [Flynn et al., 2001].

Erste Langzeitbeobachtungen der Toxizität von α -Emittern liegen durch die Applikation von Thorotrast in der Zeit von 1930 bis 1955 vor. Thorotrast war ein Thorium-232

(²³²Th)-haltiges Röntgenkontrastmittel, das vom Körper kaum ausgeschieden wurde [van Kaick et al., 1986]. Das Radionuklid ²³²Th mit einer HWZ von $1,405 \times 10^{10}$ Jahren induzierte vorwiegend Leberkarzinome sowie Blutneoplasien. Untersuchungen an den Patienten erbrachten Hinweise darauf, dass den durch Thorotrast induzierten Karzinomen nicht direkte Effekte der Bestrahlung zu Grunde liegen, sondern vielmehr erst verzögert auftretende Mutationen [Ishikawa et al., 2001].

Je höher der Anteil an überlebenden geschädigten Zellen aus einer Population bestrahlter Zellen ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit für neoplastische Entartungen. Ein Vergleich zwischen fraktionierter und einmaliger Applikation von gleichen Dosen ²²⁴Ra in Mäusen ergab folgende Inzidenzen an Lymphomen und Osteosarkomen: Nach fraktionierter Injektion entwickelten 13,5 % der Tiere in der ersten Lebenshälfte Lymphome und 7 % der Tiere in der zweiten Lebenshälfte Osteosarkome. Hingegen entstanden nach einmaliger Applikation nur bei 5,8 % der Tiere Osteosarkome in der zweiten Lebenshälfte und keine Lymphome [Müller et al., 1990].

Obwohl die α -Strahlung erheblich effizienter Zellen inaktiviert als Photonenemitter, treten auch nach Anwendung von hochenergetischen α -Emittern onkogene Transformationen auf [Yang et al., 2000]. Auch Bystander-Effekt wurde mit α -Emittern in vitro nachgewiesen [Mothersill und Seymour, 1998; Sawant et al., 2002]. Hierbei handelt es sich um einen noch nicht geklärten biologischen Effekt, bei dem Zellen, die nicht selbst bestrahlt wurden, sich jedoch in Nachbarschaft von bestrahlten Zellen befinden, dennoch geschädigt werden. Darüber hinaus treten dabei an Zellen, bei denen lediglich das Zellplasma, jedoch nicht der Zellkern von einem α -Teilchen passiert wurde, Mutationen auf [Hall, 2000].

So genannte „stabile chromosomale Translokationen“, im engeren Sinn Inversionen und reziproke Translokationen, eignen sich mit gewissen Einschränkungen für retrospektive biologische Dosimetrie. Während Lucas u. Mitarb. [1996] eine direkte Korrelation zwischen Strahlendosis und stabilen Translokationen über einen Zeitraum von 28 Jahren hin feststellen, schränken Bauchinger u. Mitarb. [2001] die Verlässlichkeit dieser Technik der Dosimetrie ein. Sie kommen zu dem Schluss, dass die stabilen Translokationen ihrem Namen insbesondere bei Kombination aus Ganzkörperbestrahlung und Teilkörperbestrahlung nicht gerecht werden. Andererseits

findet beim Menschen eine altersabhängige Anreicherung stabiler Translokationen statt ohne exzeptionell hohe Strahlenexposition [Tucker et al., 1994].

Histopathologisch zeigt sich die somatische Toxizität von ^{213}Bi -Immunkonjugaten, wie bereits angesprochen, in der Regel an der Niere als dem dosislimitierenden Organ. Bei der Ermittlung der MTA müssen chronische Nephrose und akute Nephritis unterschieden werden. Eine zweimalige Injektion im Abstand von 24 - 48 h von 100% der jeweiligen Einzelbolus-MTA an ^{213}Bi -markierten Fab' wurde von Mäusen ohne gesteigerte Letalität verkraftet [Behr et al., 1999b]. Von ^{90}Y dagegen wurden bei der zweiten Injektion nur 80 % der MTA für einmalige Applikation toleriert. In einem Therapieansatz von Kennel u. Mitarb. [2002] wurden RIK eingesetzt, die an murines Thrombomodulin in Gefäßen der Lunge binden. Die applizierten Aktivitäten von 0,74 MBq ^{211}At -MAK oder 3,7 MBq ^{213}Bi -MAK lagen jenseits der MTA und schlugen sich in Lungenfibrose drei bis vier Monate nach i.v. Applikation nieder.

2.1.5 Carrier

Eine rasche Anreicherung des RIK im Tumor ist der Schlüssel zu einem guten Therapieerfolg verbunden mit einer geringen Ganzkörpertoxizität. Carrier dienen dazu, das betreffende Radionuklid möglichst schnell an seine Zielstruktur zu transportieren. Hierfür kommen monoklonale Antikörper zum Einsatz, die bestimmten Anforderungen genügen müssen. Faktoren, welche die Biokinetik der monoklonalen Antikörper beeinflussen, ergeben sich u.a. aus dem Molekulargewicht des Ak abhängig von Immunklasse und Fragmentierungsstufe, aus der Antikörperverfügbarkeit und vor allem aus der Tumorstruktur. So weisen beispielsweise solide Tumoren, bedingt durch fehlende Lymphbahnen und unkontrollierte Zellteilung, einen erhöhten interstitiellen Druck auf [Jain, 1989]. Der hohe interstitielle Druck soll an Bedeutung für die Bioverteilung des Ak sogar dessen Affinität zum Antigen übertreffen [Zhu et al., 1997].

Ein Lösungsansatz besteht darin, durch Fragmentierung der Antikörper die Diffusion entgegen dem Diffusionsgradienten im Gewebe zu erhöhen. Yokota u. Mitarb. [1992] konnten die Überlegenheit von „single-chain-Antikörperfragmenten“ (scFv) gegenüber

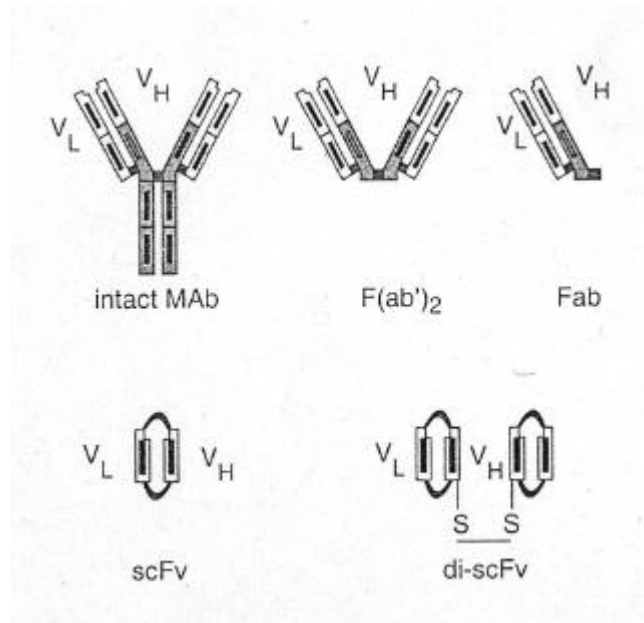


Abb. 1: verschieden Fragmentierungsstufen eines IgG-Ak [Senekowitsch, 2000]

intakten IgG-Ak im Mausmodell mit Ak gegen humanes Pancarcinoma-Antigen TAG demonstrieren. Während die maximale Tumorpenetration des scFv bereits 0,5 h p.i. erreicht war, bedurfte es 48 bis 96 h bis ein vergleichbarer Penetrationsgrad mit intaktem Ak erzielt werden konnte. Je kleiner die Ak-Fragmente sind, desto schneller werden sie aus dem Organismus eliminiert [Nicol und Khaw, 1991]. Für die RIT bedeutet das eine unmittelbare Auswirkung auf die verabreichte Strahlendosis und somit auf die maximal tolerierten Aktivitäten (MTA). Mit ^{131}I -markierten anti-CEA-Ak bzw. anti-CEA-Fragmenten betragen die MTA im Mausmodell 9,62 MBq (260 μCi) für den intakten Ak, 44,4 MBq (1200 μCi) für $\text{F}(\text{ab})_2$ und 111 MBq (3 mCi) für Fab' [Behr et al., 1999b]. Die Verteilung von Fragmenten ist in soliden Tumoren homogener als die von intakten Ak, wie Behr u. Mitarb. [2000] mittels Mikroautoradiographie zeigen konnten, da intakte IgG-Ak nicht so tief in Tumorknötchen eindringen wie beispielsweise Fab' .

Andererseits weisen Fragmente eine verstärkte Nierentoxizität auf. Eine absolut höhere Aktivität sowie eine homogenere Verteilung - auch in der Niere - führen zu Limitationen in der RIT mit Radiometallen. Ausschlaggebend dafür ist allerdings die Reabsorption und Retinierung von kleinen Proteinen aus dem Primärharn durch die Tubuluszellen [Behr et al., 1995a]. Dieser Mechanismus wird durch kationischen Aminosäuren wie z. B. D-Lysin gehemmt, was zu einer Erhöhung der MTA führt. So wurde bei einer i.v. Applikation von ^{90}Y -markiertem Fab' eine Zunahme der MTA um

25 % beobachtet [Behr et al., 1997]. Dennoch werden aufgrund der raschen Clearance der Fragmente damit nie so hohe Konzentrationen des RIK im Tumor erreicht wie mit intakten Antikörpern.

Die Antikörperverfügbarkeit wird auch wesentlich durch die Reaktion des Organismus auf die Fremdproteine bestimmt. Humane IgG-Ak weisen bei einmaliger Applikation im Menschen eine biologische HWZ von 21 d auf [Morell et al., 1970]. Murine Ak zeigen dagegen im Menschen eine HWZ von etwa 8 h [Khaw et al., 1987]. Diffiziler ist die Reaktion auf wiederholte Applikation muriner Ak. Außer bei Patienten mit einem Lymphom, bei denen die Immunantwort reduziert ist, entwickeln nach einmaliger i.v. Applikation von murinen Ak 50% bis 80% der Patienten humane anti-Maus-Antikörper (HAMA) [Kuus-Racherl et al., 1994; Khazaeli et al., 1994]. Eine weitere Applikation des gleichen Ak führt zu einem raschen Binden der RIK durch körpereigene Immunglobuline mit Ablagerung der Immunkomplexe in Leber und Milz, so dass eine günstige Anreicherung des RIK im Tumor nicht mehr möglich erscheint. Obwohl man annehmen muss, dass bei i.p. Applikation von murinen Antikörpern die menschliche Immunantwort geringer ausfallen wird als bei systemischer Applikation, produzierten in einer Phase-II-Studie mit ^{131}I -markiertem MAK gegen Ovarialkarzinom sogar 100% (6 aus 6) der Patientinnen HAMA [Mahe et al., 1999].

Die Überlegenheit einer wiederholten sog. fraktionierten RIT im Vergleich zur Einzelbolus-Therapie wurde allerdings im Tiermodell eines Ovarialkarzinoms mit lokoregionaler Injektion von ^{90}Y -Immunkonjugat deutlich: untherapierte Mäuse überlebten 20 d. Mäuse, denen das RIK mit einer Aktivität von 7,4 MBq (200 μCi) einmal appliziert wurde, überlebten 46 d, nach einer zweimaligen Applikation von je 200 μCi im Abstand von 21 d dagegen 69 d. Eine Aktivität von 14,8 MBq (400 μCi) in einem einzigen Bolus lag jenseits der MTA und verkürzte das Überleben auf 14 d [Borchardt et al., 2000].

Dieser und ähnliche Erfolge der fraktionierten RIT motivierten zu Lösungsansätzen für das immunologische Problem der HAMA-Bildung. Intakte Ak sind beispielsweise stärker immunogen als F(ab)_2 und diese wiederum stärker als Fab [Khaw et al., 1993]. Ein weiterer Versuch, die HAMA-Produktion zu verzögern, ist die Medikation mit Cyclosporin A [Ledermann et al., 1991]. Alternativ bieten sich chimäre Ak und humanisierte Ak an. Bei chimären Ak ist die konstante Region des murinen Ak durch die konstante Region eines menschlichen Ak ersetzt. Bei humanisierten Ak ist die

murine Antigenbindungsstelle an einen humanen Ak gekoppelt [Buchsbaum, 1997]. Beide Ak-Konstrukte sind im Menschen erheblich weniger immunogen als murine Ak. Dass humanisierte Ak sogar eine höhere Affinität aufweisen können als ihre murinen Vorläufer zeigten Studien am Memorial Sloan-Kettering Cancer Center in New York [Co et al., 1992; Caron et al., 1992]. Humane Ak haben überdies den Vorteil der antikörperabhängigen, zellvermittelten Zytotoxizität.

2.1.6 Koppelung des Radionuklids an den Antikörper

Neben der Spezifität des Carriers ist die In-vivo-Stabilität des RIK das wichtigste Kriterium, um das kurative Potential von ^{213}Bi mit minimaler Toxizität optimal auszunutzen, denn eine Instabilität des Konjugats käme einer Applikation freier Radionuklide gleich. Exemplarisch hierür steht die unerwünschte Dehalogenierung von Jod- oder Astat-Immunkonjugaten. Dabei werden nach Internalisierung die RIK in Lysosomen proteolytisch abgebaut und die Halogene aus der Zelle geschleust [Press et al., 1996].

Freies Wismut reichert sich in den Nieren an. In einem Versuch von Nikula u. Mitarb. [1999] fanden sich innerhalb einer Stunde nach i.v. Applikation von freiem $^{205/206}\text{Bi}$ in Balb/c Mäusen etwa 120% der injizierten Aktivität pro g Gewebe (% ID/g) in den Nieren. Diese Werte lassen sich auch auf ^{213}Bi anwenden, da im Stoffwechsel Isotope nicht voneinander unterschieden werden. Die ^{213}Bi -Aktivitätsakkumulation in den Nieren nach Applikation von ^{213}Bi -Immunkonjugaten kann folglich zur Bewertung der Stabilität der Bindung des Radionuklids an den Ak herangezogen werden.

Anders als bei Jod, das direkt an Tyrosinreste des Ak gekoppelt werden kann, sind für die Markierung der Immunglobuline mit Metallradionukliden bifunktionelle Chelate erforderlich. Diese wurden bereits in Studien mit den Radiometallen ^{90}Y und ^{111}In getestet. Am stabilsten zeigten sich dabei Konjugate mit dem Chelator DOTA. Nach i.v. Applikation in tumorfreie Nacktmäuse wurde die Serumstabilität von ^{88}Y -Immunkonjugaten mit den Chelaten DOTA und CHX-B-DTPA bis 7 d p.i. verglichen [Camera et al., 1994], sowie die Isomere CHX-A'-DTPA und CHX-A''-DTPA einander gegenübergestellt [Kobayashi et al., 1998]. Bei den beiden Isomeren fanden sich 4,6 % ID/g bzw. 4,0 % ID/g ^{88}Y im Knochen wieder. Da sich Y im Knochen anreichert, entsprechen diese Werte in etwa dem gesamten aus dem RIK entlassenen

Radionuklid. CHX-A"-DTPA wurde dabei rascher aus dem Blutkreislauf eliminiert. Bei CHX-B-DTPA wurden 20% des Radionuklids bis zum siebten Tag freigesetzt, wohingegen bei DOTA keine ungebundene Aktivität gemessen werden konnte. Dies spricht vordergründig für den Einsatz von DOTA. Das Handicap der DOTA-Chelatierung liegt jedoch in der aufwendigen Markierungstechnik, die mit einer Temperaturerhöhung verbunden ist, welche größere Peptide und Antikörper nicht unbeschadet überstehen würden. Bei so kurzlebigen Radionukliden wie ^{213}Bi kann allerdings die Serumstabilität des CHX-A-DTPA von 2 d als ausreichend angesehen werden [Nikula et al., 1999]. DTPA-Derivate benötigen überdies nur wenige Minuten Reaktionszeit zur effizienten Bindung von Metallen. Die Immunreaktivität des Ak wird durch die Markierung mit CHX-A-DTPA erwiesenermaßen nicht beeinträchtigt [Milenic et al., 2001; Fischer, 2001].

Es ist anzunehmen, dass eine solche chemische Kopplung zwischen Radionuklid und Ak mittels Chelat dem Rückstoß bei einem α -Zerfall nicht standhält [Hamacher et al., 2001]. Für ^{213}Bi spielt das jedoch keine große Rolle, da die aus dem hochenergetischen Zerfall resultierenden Tochternuklide entweder eine nur kurze HWZ haben wie ^{209}Tl mit 2,2 min, und in dieser Zeit ohnehin nicht weit vom Ziel abdriften können oder, wie im Fall von ^{209}Pb , nur noch einen niederenergetischen β -Zerfall mit 0,6 MeV aufweisen. Die Gesamtdosis der β -Strahlung der ^{213}Bi -Tochternuklide macht etwa nur 1% der α -Strahlendosis aus [Kennel et al., 1999b]. Als schwer überwindbares Hindernis hat sich die Schwäche des Chelats allerdings für den Versuch erwiesen, die vier α -Zerfälle des ^{225}Ac als In-vivo-Generator zu nutzen [Quadi et al., 2002].

2.2 Das diffuse Magenkarzinom

2.2.1 Status quo - Therapieformen

Anamnestisch sind bei einem Magenkarzinom oft eine Magenoperation, Ulcus ventriculi oder Vorhandensein von Helicobacter pylori auszumachen [Onkolog. AG, 2001]. Nitrosamine sind die bekanntesten chemischen Karzinogene für gastro-intestinale Malignome. Darüber hinaus besteht gerade für das diffuse Magenkarzinom nachweislich eine genetische Prädisposition, von deren Auswirkung überproportional viele jüngere Patienten (< 41 Jahre) betroffen sind im Vergleich zu den Verhältnissen beim intestinalen Magenkarzinomtyp [Kokkola und Sipponen, 2001].

10 bis 20% der Patienten mit primärem Magenkarzinom - 80 % nach diffusem Magenkarzinom [Siewert und Sandler, 1999] - erkranken an Peritonealkarzinose. Auslöser dafür kann neben der Penetration des Karzinoms durch die Magenwand oder lymphogener Ablösung von Tumormikroemboli auch eine okkulte, meist traumatische Tumorzellaussaat sein. Diese kann sich schon bei einer explorativen Laparoskopie ereignen und ist während einer oft notwendigen, umfangreichen Resektion von Magen und regionären Lymphknoten an großer und kleiner Kurvatur sowie an Pankreas und Milz kaum zu vermeiden [Sugarbaker, 1988; Demetrick et al., 1997]. Eine Studie in Japan zeigte weiterhin eine intraoperativ nicht zu erkennende und bis zu 10 mm reichende Ausbreitung diffusen Magenkarzinoms in die Mukosa von makroskopisch gesundem Gewebe [Ninomiya et al., 2000].

Die Peritonealkarzinose ist die Tumorentität mit dem häufigsten Versagen einer systemischen, intensiven Chemotherapie. Die derzeitige Standardtherapie umfasst daher eine Kombination aus Gastrektomie, Peritonektomie und intraoperativer, intraperitonealer, hyperthermischer Chemotherapie [Sugarbaker und Yonemura, 2000]. Zusätzlich empfiehlt sich eine frühe postoperative 5-Fluoruracil-Therapie. Eine lokale Hyperthermie ist ein Ansatz, den Blutfluss und die Gefäßpermeabilität im Tumor zu erhöhen, die den Übertritt der Pharmaka in das tumoröse Gewebe entscheidend beeinflussen und damit entscheidend für den Therapieerfolg sind [Cope et al., 1990; Buchsbaum, 1997].

Wegen ihrer geringen Molekülgröße werden i.p. verabreichte Chemotherapeutika jedoch rasch von der Peritonealserosa resorbiert. Damit ist zum einen eine

lokoregional hohe Konzentration nur kurzzeitig zu erreichen [Borchardt et al., 2000], zum anderen ist mit den erheblichen, bekannten Nebenwirkungen der systemisch applizierten Chemotherapeutika zu rechnen. 1h nach i.p. Applikation von 5-Fluoruracil (MM = 130 Da) sind beispielsweise 28,4 % resorbiert, von Asparaginase (MM = 133 kDa) lediglich 9 % [Litterst et al., 1982]. Noch geringer dürfte die Resorptionsquote von IgG Ak (MM = 155 kDa) gegen tumorassoziierte Antigene sein, und zwar zusätzlich unter dem Aspekt, dass bei Vorhandensein von i.p. Tumoren eine spezifische Retention erfolgt. Bei Mäusen mit Aszites ist eine langsamere Resorption mehrfach bewiesen. Eine Erklärung dafür ist die Bindung der RIK an flotierende Tumorzellen [Senekowitsch et al., 1989], eine weitere eine von mehreren Aszitesätiologien, nämlich die Blockade des Lymphabflusses [Hnatowich et al., 1988; Reilly, 1991].

Die Vorteile der intraperitonealen Applikation von Radioimmunkonjugaten werden schon an der Tumoranreicherung der RIK ersichtlich. Ein Vergleich zwischen systemischer und lokoregionaler Applikation der RIK wurde an einem Modell für menschliches Ovarialkarzinom in Nacktmäusen durchgeführt. Besonders in kleinen Tumorknötchen (< 0,5 g) und in kurzen Zeitabständen von wenigen Stunden nach RIK-Injektion zeigte sich nach i.p. Applikation im Vergleich zur systemischen Verabreichung eine um den Faktor 2,2 höhere Anreicherung bezogen auf die injizierte Aktivität pro g Tumor [Senekowitsch et al., 1989].

Der Vergleich der beiden Applikationsarten im Mausmodell einer Peritonealkarzinose mit Kolonkarzinomzellen zeigt ebenfalls eine interessante Kinetik der RIK [Rowlinson et al., 1987]. Während bei lokoregionaler Applikation das Maximum des Tumor/Gewebe-Quotienten bereits 2 h nach der Injektion erreicht wurde, war das Maximum nach i.v. Applikation bis zum Ende der Untersuchung 48 h p.i. noch nicht erreicht. Der höchste Quotient bei i.v. Injektion ergab sich aus dem Verhältnis der RIK-Konzentrationen in Tumor und in Leber mit 3,0 und war immer noch ungünstiger als der niedrigste Peak nach i.p. Applikation (Tumor/Blut: 3,9 nach 2h).

Die vorstehenden Erkenntnisse verbunden mit der Tatsache, dass 1/5 des arteriellen Blutes auf direktem Weg in die Nieren gepumpt wird, die erwiesenermaßen die dosislimitierenden Organe bei inkorporierten Radiometallen sind [Behr et al., 1995b], legen eine lokoregionale Applikation des ²¹³Bi-Immunkonjugats nahe.

Goldenberg [2002] listet in seinem Review-Artikel die wichtigsten Herausforderungen zur Verbesserung der RIT auf. Gegenübergestellt sind die konsequenten Modifikationen für die vorliegende Studie und darüber hinaus für die Anwendung im Patienten, nachdem die Bedeutung jedes einzelnen Parameters festgestellt worden ist.

Ziel	Konsequenz für RIT der Peritonealkarzinose
verstärkte Ak-Anreicherung im Tumor	lokoregionale Applikation, Fragmentierung des spezifischen Ak
Reduktion der Strahlenexposition des gesunden Gewebes	Nierenschutz durch kationische Aminosäuren
Reduktion der Immunreaktion auf Ak	Humanisierung des Rattenantikörpers
Erhöhung des Dosisquotienten Tumor / Normalgewebe	fraktionierte Therapie

2.2.2 Spezifische Antikörper für die Radioimmuntherapie des diffusen Magenkarzinoms

Diffuse Magenkarzinome weisen in 50 % der Fälle Mutationen an Exon 8 oder 9 des E-Cadherin-Gens (d8-Cad bzw. d9-Cad) auf [Becker et al., 1994]. Gegen Aminosäuresequenzen, die ausschließlich als Folge der Mutationen exprimiert werden, konnten mutationsspezifische, monoklonale Antikörper entwickelt werden [Becker et al., 1999]. Über Jahre hinweg waren diese die einzigen tumorspezifischen Ak neben dem EGFRvIII, der gegen eine bei Brustkrebs, Gliomen und Lungenkarzinomen vorkommende Mutationsform des EGF-Rezeptors gerichtet ist [Reist et al., 1997]. Ein Ensemble aus vier Ak ermöglicht inzwischen eine spezifische Differenzierung ohne Kreuzreaktion zwischen Zellen mit d8-Cad oder d9-Cad und den jeweiligen physiologischen Allelen [Becker et al., 2002].

Cadherine sind transmembrane Glykoproteine, die kalziumabhängig die Zellkohäsion vermitteln und so die Morphogenese von Organen bewerkstelligen [Takeichi, 1993]. Reduzierte Expression durch genetische Down-Regulation oder ein gänzlicher Verlust

des epithelialen Cadherins (E-Cadherin) führen zu einer reduzierten Aggregation der betreffenden Zellen, zu gesteigerter Motilität und Invasivität [Handschuh et al., 1999; Frixen et al., 1991; Hippo et al., 2001]. Als besonders aggressiv haben sich Magenkarzinome mit reduzierter E-Cadherinexpression bei jungen Patienten (<30 Jahre) herausgestellt [Lim et al., 2003]. Veränderte Expressionsraten des E-Cadherins wurden auch bei Kolon- und Lungenkarzinomen beobachtet [El-Bahrawy et al., 2002; Qiu et al., 2002].

2.3 Tiermodell für die α -Radioimmuntherapie

Zur Durchführung von Tierversuchen muss deren Unerlässlichkeit am Stand der wissenschaftlichen Erkenntnisse nachgewiesen sein [TierSchG, 1998].

Die vorliegende Studie erfolgt vor dem Hintergrund bis dato unbefriedigender Therapieergebnisse bei der Peritonealkarzinose nach Resektion eines primären Magenkarzinoms. Durch eine verbesserte Verfügbarkeit geeigneter Radionuklide eröffnet die RIT neue Therapiemöglichkeiten, die einen viel versprechenden Ansatz für die Bekämpfung der Peritonealkarzinose darstellen und damit quasi zum Handeln zwingen.

Pathologische Prozesse im Wirbeltierorganismus führen zu komplexen Reaktionen, die in In-vitro- und Computer-Modellen nur fragmentarisch nachgeahmt werden können. So wurde beispielsweise ein Computer-Simulations-Modell für die Knochenmarksdosimetrie bei der Nacktmaus entwickelt, das sich auf die i.v. Applikation von RIK mit β -Emittern bezieht [Muthuswamy et al., 1998]. Für die i.p. Applikation von α -Emittern ist ein solches bisher noch nicht verfügbar.

Grundlage derartiger Modelle sind Messdaten aus im Versuch gewonnenen Biodistributionsstudien. Um die Versuchstierzahlen gering zu halten, müssen bei der Versuchsplanung aktuelle Erkenntnisse aus In-vitro-Studien berücksichtigt werden sowie weiterhin Daten aus ähnlich konzipierten Tierversuchen.

Die in dieser Studie für die Versuche an Mäusen gewählten Antikörpermengen basieren auf der Quantifizierung der Antigenmoleküle mittels FACS-Analyse. Bei den HSC-Zellen betrug die Expression der d9-E-Cad-Moleküle $3,5 \times 10^5$ pro Zelle. MDA-d9- und MDA-WT-Zellen exprimieren je etwa 10^5 E-Cad pro Zelle [Seidenschwang,

persönliche Mitteilung]. Anhaltspunkte für die ersten, in der vorliegenden Studie zur Therapie gewählten Aktivitätsmengen boten die Ergebnisse von Nikula u. Mitarb. [1999], die für ^{213}Bi -Immunkonjugate bei Mäusen eine MTA von 370 MBq/kg bei i.v. Applikation und von 740 MBq/kg bei i.p. Applikation ermittelten.

Die Übertragbarkeit der Erfahrungen im Tiermodell auf den Menschen wird kontrovers diskutiert. Zhu u. Mitarb. [1997] kommen zu der Auffassung, insbesondere Daten zur Dosimetrie könnten für menschliche Anwendungen hinreichend an der Maus erforscht werden. Unterschiede ergeben sich aber aus der Größendifferenz. Die kleinen Nager haben eine höhere Stoffwechselrate, die eine verkürzte biologische HWZ von RIK zur Folge hat [Wahl, 1994]. So erfolgt beim Menschen die Anreicherung von RIK im Blut nach i.p. Applikation langsamer als bei Mäusen, und die erreichten Maximalwerte sind erheblich niedriger [Larsen et al., 1995]. Die höchste Aktivitätskonzentration von RIK im Blut ist bei Mäusen bereits nach 2h erreicht [Rowlinson et al., 1987], bei Menschen hingegen erst nach 24 bis 48 h [Epenetos et al., 1987].

Das Immunsystem ist bei der thymushypoplastischen Nacktmaus konzeptionell von dem des Menschen verschieden. Die Zahl der Lymphozyten ist selbst bei Heterozygoten sowohl in der Rinde als auch im Mark des Thymus signifikant reduziert. Auch im peripheren Blut ist die Anzahl an Leukozyten wesentlich verringert mit absolut geringerem Anteil an Lymphozyten [Yunker et al., 1978].

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Medikamente

ABC-Reagenzien	Vector Laboratories/ Camon, U.K.
Ammoniumacetat	Sigma, Steinheim
Augensalbe, Vidisic®	Dr. Mann Pharma, Berlin
Chelating Resin	Sigma, Steinheim
Concanavalin A	ICN, Eschwege
Demecolzin	ICN, Eschwege
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
EDTA 1% in PBS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	c.c. pro, Neustadt
Entellan, Eindeckmedium	Merck, Darmstadt
Entwickler Kodak D19	Foto Heinrich, München
Eosin	Chroma- Gesellschaft, Köngen/N.
Essigsäure 100%	Merck, Darmstadt
Ether "Aether zur Narkose"	Chinosol, Seelze
Ethanol 96%	Merck, Darmstadt
FCS (fetales Kälberserum)	Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Fixierer Kodak	Foto Heinrich, München
Formalin, 4% (Stammlösung 37%)	Merck, Darmstadt
Genitacin 50 mg/ml	Gibco, U.K.
Glyceringelatine, Kaisers	Merck, Darmstadt
Hämalaun, Mayers	Hausapotheke rechts der Isar, München
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
Heparin	Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen

ITLC SG	(Instant thin-layer chromatography paper) Gelman Sciences, Michigan, USA
Kältespray (Tetrafluorethan)	neoLab Migge, Heidelberg
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kernechtrot 1% wässrig	Hausapotheke rechts der Isar, München
Ketavet (100mg/ml Ketaminhydrochlorid)	Pharmacia & Upjohn, Erlangen
NaCl- Lösung, 0,9%	Delta-Pharma, Pfullingen
Naphthol AS-D Chloracetat	Sigma, Deisenhofen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumnitrit	Merck, Darmstadt
Optical Imaging, Digital Camera, C 4742 -98	Hamamatsu, Herrsching
Paraffin	Monoject Scientific Inc., Irland
Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen
Pararosanilin-Chlorid	Sigma, Deisenhofen
PD-10 Desaltin columns	Amershambiotech, Freiburg
Penicillin/ Streptomycin	Biochrom, Berlin
pH-Indikatorstäbchen pH 4.0-7.0	Merck, Darmstadt
Photoemulsion EM	Amershambiotech, Freiburg
Photoemulsion LM	Amershambiotech, Freiburg
Rompun (2% Xylazinhydrochlorid)	Bayer Vital, Leverkusen
Salzsäure 1N	Merck, Darmstadt
Salzsäure 30%	Merck, Darmstadt
„Silan“ 3-(Triethoxysilyl)-propylamin	Merck, Darmstadt
Tissue-Tek® O.C.T.Compound	Sakura Finotek, Niederlande
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Trypsin-EDTA	Biochrom, Berlin

Vecta Mount, Eindeckmedium	Vector Laboratories, Peterborough, U.K.
Vitamin C	Sigma, Steinheim
Vybrant Cell-Labeling Solutions	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Wasserstoffperoxid 30%	Merck, Darmstadt
Xylol	Merck, Darmstadt

3.2 Lösungen

3.2.1 Anästhesie

Ketavet-Rompun Narkotikum

82% physiologische NaCl-Lösung, 0,9%

10% Ketavet® (100mg/ml Ketaminhydrochlorid)

8% Rompun® (2% Xylazinhydrochlorid)

Antagonisierbare Narkose

Narkotikum:

Wirkstoff (Marke)	Menge in µg/kg Maus	Konzentration mg/ml
Medetomidin (Domitor)	500	1
Midazolam (Dormicum)	5	5
Fentanyl (Fentanyl)	50	0,05

Antagonist:

Wirkstoff (Marke)	Menge in mg/kg Maus	Konzentration mg/ml
Atipamezol (Antisedan)	2,5	5
Flumazenil (Anexate)	0,5	0,1
Naloxon (Narcanti)	1,2	0,4

3.2.2 Zellkultur

DULBECCO'S MEM (Biochrom, Berlin):

NaHCO₃ (3,7 g/l); D-Glucose (4,5 g/l); N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamin (1,028 g/l);
Na-Pyruvat

Phosphatpuffer (PBS)

NaCl (8 g/l); KCl (0,2 g/l); KH₂PO₄ (0,2 g/l); Na₂HPO₄ x 12 H₂O (2,85 g/l); pH = 7,2

3.2.3 Chromosomenpräparation

Hanks Nährpuffer (HBSS) ohne Mg²⁺ und Ca²⁺ (Amimed, Allschwill, CH)

KCl (0,56% Lösung)

Fixationslösung: 1 Teil Eisessig: 3 Teile 96% Ethanol

Weisepuffer (pH 7,2):

Kaliumdihydrogenphosphat 0,49g/l

di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat 1,14g/l

Giemsa-Lösung: 5% Giemsa (Merck, Darmstadt) in Weisepuffer

May-Grünwald-Lösung (Merck, Darmstadt)

3.3 Geräte

Analysenwaage Sartorius, Typ LA 230S-OCE	Sartorius, Göttingen
Biofuge 13	Heraeus Sepatech, Osterode
Blutanalysegerät SE 9000	Sysmex, Norderstätt
Cell Counter, CASY®	Schärfe, Reutlingen
Darkbox, Typ 4, Model 2	Unit One electronics, Dänemark
Gamma-counter TYP 1480 Wizard TM 3	Wallac , Finnland
Gamma-Kamera Vertex	ADAC/Philips, Niederlande
Kernspintomograph, 1,5 Tesla	Philips, Niederlande
Kryostat Microm, Typ HM 500	Microm, Walldorf
Laminar-Flow-Arbeitsbank	Heraeus-Instrumente, Osterode
Mäusewaage, Laboratory LC 1200S	Sartorius, Göttingen
Megafuge 1,0 R	Heraeus Sepatech, Osterode
Rotationsmicrotom Microm, Typ HM 330	Microm, Walldorf
Ultraschallgerät Hitachi EUB-6000 CV	Hitachi-Ultrasound, Wiesbaden
Vitros System 250 Chemistry	Johnson-Johnson, Clinical Diagnostics, Rochester, USA

3.4 Antikörper für die Therapie

Die hier verwendeten Antikörper waren am Institut für Pathologie der GSF entwickelt und von K.-F. Becker und E. Kremer für diese Studie freundlicher Weise zur Verfügung gestellt worden.

3.4.1 Anti-delta 9-E-Cadherin (d9MAk)

Die Antikörper gegen mutationsbedingt verändertes E-Cadherin waren nach der Hybridomatechnik von Köhler und Milstein [1975] hergestellt worden. Ein Peptid, dessen Folge aus 13 Aminosäuren beim Fehlen des Exon 9 typisch exprimiert wird [Becker et al., 1999], wurde nach Kopplung an KLH (keyhole limpet hemacyanin= Napfschnecken-Hämacyanin) Lou/C Ratten sowohl s.c. als auch i.p. appliziert. Vier Wochen später erfolgte eine Boosterung, und nach drei Tagen wurden die stimulierten

Milzzellen aus der weißen Pulpa der Ratten mit Myelomzellen fusioniert. Aus der resultierenden Vielzahl verschiedener Hybridomzellen wurde das Produkt eines Klons wegen der hohen spezifischen Bindung an d9-E-Cad für diese Studie ausgewählt. Der als 6H8 bezeichnete Antikörper gehört der Immunklasse IgG2a an und bindet ohne Kreuzreaktionen ausschließlich an d9-E-Cad.

3.4.2 Anti-delta 8-E-Cadherin

Zur gleichen Unterklasse zählt der spezifische Antikörper 7H1 gegen die Fusionsregion von Exon 7 und 9 bei Deletion des Exon 8. Auch dieser Antikörper war nach oben beschriebener Technik hergestellt worden. Für d9-E-Cad ist der 7H1 Antikörper unspezifisch und wurde in dieser Studie daher als Kontrolle an Zellen mit d9-E-Cad-Expression eingesetzt.

3.4.3 Anti-delta 9-E-Cadherin Fab'

Die Herstellung der Fab' erfolgte durch enzymatische Spaltung mittels Papain des 6H8 nach Standardmethoden [Rousseaux et al., 1983]. Papain wurde demnach in Konzentration von 0,1% im cysteinhaltigen Puffer bei pH 7,0 zu 2 µg Antikörper gegeben, und der Ansatz vier Stunden bei 37°C inkubiert. Gestoppt wurde die Reaktion durch Zugabe von Jodacetamid. Die Trennung der Fab'- von den Fc-Fragmenten erfolgte mittels Boten G Agarose.

Die in dieser Studie für die Versuche an Mäusen gewählten Antikörpermengen basieren auf der Quantifizierung der Antigenmoleküle mittels FACS-Analyse. Bei den HSC-Zellen betrug die Expression der d9-E-Cad-Moleküle $3,5 \times 10^5$ pro Zelle. MDA-d9 und MDA-WT exprimieren etwa 10^5 E-Cad-Moleküle pro Zelle [Seidenschwang, persönliche Mitteilung].

3.5 Radionuklide

3.5.1 Wismut-213

Wismut-213 (^{213}Bi) ist ein Zerfallsprodukt von ^{225}Ac (Abb. 2). Mit einer Halbwertszeit (HWZ) von 45,6 min zerfallen 98% des ^{213}Bi zunächst unter Elektronenemission in ^{213}Po (β^- -Zerfall). Dieses wird mit einer HWZ von 4,2 µs in ^{209}Pb umgewandelt, wobei α -Teilchen (Heliumkerne) emittiert werden mit der Energie von 8,54 MeV, welche die

eigentliche α -Emission dieser Versuche darstellen. Die andere ^{213}Bi -Fraktion (2%) sendet erst einen Heliumkern aus, wodurch ^{209}Tl verbleibt. Mit einer HWZ von 2,2 min folgt der β^- -Zerfall zu ^{209}Pb . Dieses wandelt sich mit einer HWZ von 3,3 h in stabiles ^{209}Bi um (Abb. 2). Die beim ^{213}Bi -Zerfall auftretende γ -Strahlung hat ihr Energiemaximum bei 440keV. Das wird genutzt zur Erfassung der Verteilung des Radionuklids im Tier sowohl zur Szintigraphie als auch zur Quantifizierung in den Organen in Biodistributionsversuchen.

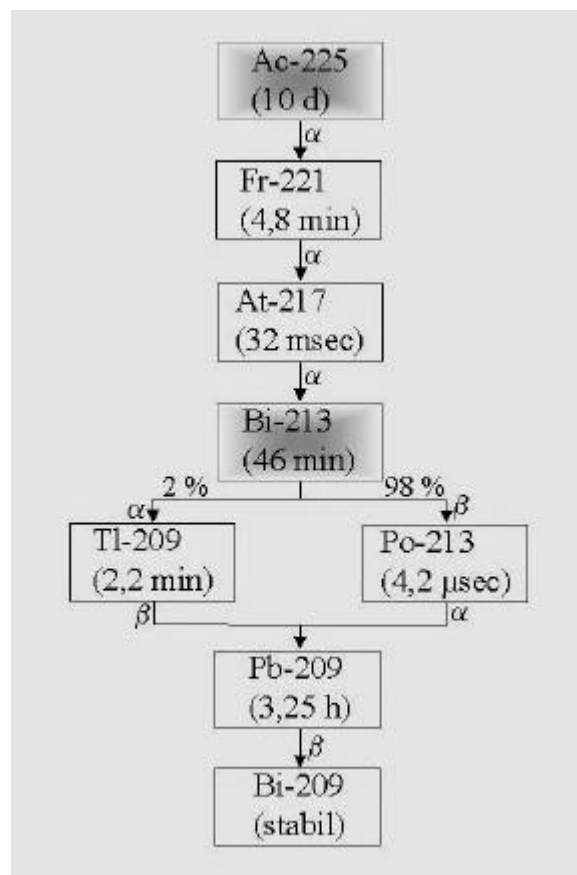


Abb. 2: Zerfallsreihe von Actinium-225

3.5.1.1 $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generator

^{213}Bi wird in einem etablierten Verfahren aus $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generatoren gewonnen, deren Produktion bisher an nur wenigen Einrichtungen weltweit möglich ist. Die kommerzielle Verfügbarkeit von ^{213}Bi scheint aber durch aktuelle Neuerungen in absehbarer Zeit gesichert zu sein:

^{225}Ac erhält man entweder aus dem natürlichen Zerfall von ^{233}U [Boll et al., 1997] oder es wird durch Neutronenbestrahlung von ^{226}Ra im Hochflussreaktor oder durch Protonenbestrahlung von ^{226}Ra im Zyklotron hergestellt. Der entscheidende Nachteil der erstgenannten und derzeit gängigen Methode liegt in der geringen Menge an ^{229}Th , die beim Zerfall von ^{233}U entsteht. Da für eine weltweite klinische Versorgung mit ^{225}Ac dessen Ausgangsnuklid ^{229}Th in einer Menge zwischen 10 g und 100 g benötigt wird, müsste ^{233}U in der Größenordnung von einer Tonne und mit einer Lagerzeit von 20 bis 30 Jahren für die Abtrennung vom unerwünschten ^{228}Th zur Verfügung stehen. Derartige Mengen finden sich jedoch auf der ganzen Erde nicht. Alternativ können z.B. 100g ^{229}Th auch hergestellt werden durch etwa 3-jährige Bestrahlung von ca. 1kg ^{226}Ra mit einem thermischen Neutronenfluss von mindestens $4,7 \times 10^{14}$ Neutronen/($\text{cm}^2 \times \text{s}$) eines Hochflussreaktors [Van Geel et al., 1994]. Die dritte Methode zeichnet sich als ökonomischste ab: ^{226}Ra wird im Zyklotron mit Protonen beschossen. Die Absorption eines Protons verursacht die Emission zweier Neutronen. Als Resultat dieser (p,2n)-Reaktion entsteht ^{225}Ac . Mindestens 37 GBq (1 Ci) ^{225}Ac können so innerhalb weniger Tage durch Bestrahlung von 37 GBq (1 Ci) ^{226}Ra produziert werden. Versuche zur Anwendung dieser Technik werden im Kernforschungszentrum in Karlsruhe durchgeführt [Apostolidis et al., 2001].

Das Institut für Transurane der Europäischen Kommission in Karlsruhe stellte das ^{225}Ac für die vorliegende Studie zur Verfügung. Es wurde dort trägerfrei aus einem $^{229}\text{Th}/^{225}\text{Ac}$ -Generator eluiert, der aus an Titanphosphatharz gebundenem ^{229}Th -Oxid besteht [Mc Devitt et al., 1998]. Nach Elution mit 0,5 M HNO_3 wurden die Nuklide ^{225}Ra und ^{224}Ra aus dem Gemisch mit ^{225}Ac mittels einer Dowex 50 W x 8 Reinigungssäule von diesem separiert. Zur Herstellung des $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generators wurden ca. 740 MBq (20 mCi) ^{225}Ac -Nitrat an AGMP-50 Kationen-Austauschharz adsorbiert und mit diesem in eine Fluorpolymer Säule (5,5 cm, $r = 3,2$ mm) überführt [Mc Devitt et al., 1999].

^{213}Bi wurde eluiert, indem über einen Polyethylenschlauch ($r = 0,8 \text{ mm}$) $600\mu\text{l}$ einer $0,1\text{M HCl}/0,1 \text{ M NaI}$ Lösung in den Generator eingeführt und dort während einer zweiminütigen Reaktionszeit mehrmals durch die Säule vor gepumpt und zurückgesaugt wurden. Im Eluat finden sich $(^{213}\text{BiI}_5)^{2-}$ Anionen, aus denen ^{213}Bi in Chelat gebunden wird [Spivakov et al., 1979]. Fünf Stunden nach dem Eluieren ist im Generator wieder das radioaktive Gleichgewicht zwischen ^{225}Ac und ^{213}Bi erreicht. 90% der maximalen ^{213}Bi -Radioaktivität liegen allerdings schon nach 150 Minuten vor. Zur effizienten Nutzung des Generators empfiehlt sich somit eine ^{213}Bi -Gewinnung im Abstand von etwa 2 bis 2,5 h.

3.5.1.2 Chelatierung der Antikörper

Die vergleichsweise kurze Halbwertszeit des ^{213}Bi erfordert einen zeitsparenden Markierungsprozess. Die Kopplung zwischen Radionuklid und Antikörper soll dessen Pharmakokinetik und Bindung nicht beeinflussen und muss eine Stabilitätsdauer des Radioimmunkonjugates in vivo garantieren, welche die Halbwertszeit des eingesetzten Radionuklides um ein Mehrfaches übertrifft. Diesen Anforderungen wird der bifunktionelle Chelator SCN-CHX-A''-DTPA (2-(4-isothiocyanatobenzyl)-Cyclohexyl-Diethylentriaminpentaessigsäure) gerecht. Die Stabilität dieses DTPA-Konstruktes wird zwar von anderen Chelatoren wie zum Beispiel DOTA übertroffen [Camera et al, 1994], ist aber bei der HWZ von 45,6 min mit in vitro-Release von weniger als 5% über 2 Tage hinreichend [Nikula et al., 1999]. Dass SCN-CHX-A''-DTPA weder Einfluss auf die Bindungskinetik [Fischer, 2001] noch auf die Biodistribution [Huneke et al., 1992] des jeweils markierten Antikörpers hat, ist bewiesen. Der größte Vorzug dieses Chelators liegt in der Reaktionsgeschwindigkeit, mit der ^{213}Bi gebunden wird. Der Kopplungsprozess ist beschrieben bei Brechbiel und Gansow [1991] sowie bei Mirzadeh und Kennel [1996]. Dazu wurde zunächst CHX-A''-DTPA (Abb. 3) an die Antikörper 6H8, 7H1 oder die 6H8-Fab' gekoppelt. Eine freie Thioharnstoffgruppe des Chelators reagiert dabei mit freien NH_2 -Gruppen von Lysinresten des Antikörpers oder seiner Fragmente zu stabilen Schwefelbrückenbindungen. Etwa 5 bis 10 Chelatmoleküle pro intaktem Antikörpermolekül konnten im standardisierten ^{111}In -Assay nachgewiesen werden [Nikula et al., 1999].

Zur Vermeidung einer Fehlchelatierung wurden alle Schritte der Chelatierung und Markierung der Antikörper mit metallfreien Chemikalien und Gefäßen durchgeführt.

Reagenzien, die nicht a priori frei von Metallen waren, wurden mit Chelex 100 (Bio Rad) von diesen gereinigt. Alle Glasgefäße, die mit dem RIK in Berührung kamen, wurden vorher silanisiert, um eine Adhärenz der Antikörper am Behältnis zu vermeiden. Dazu wurde eine 2%ige 3-(Triethoxysilyl)-propylamin-Lösung in Azeton verwendet.

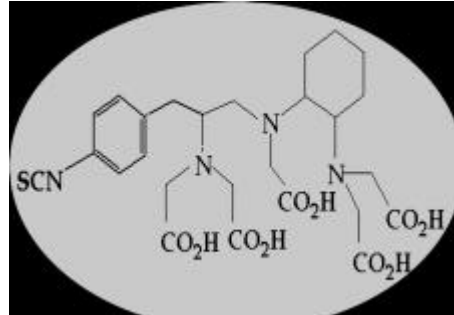


Abb. 3 SCN-CHX-A''-DTPA

3.5.1.3 Radionuklidmarkierung der chelatierten Antikörper und Fragmente

Das gewonnene ^{213}Bi -Eluat (siehe 3.5.1.1) wurde mittels 3M Ammoniumazetat ($\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$) bei einem pH Wert von etwa 5,5 gepuffert. Um den Antikörper vor Radiolyse zu schützen, wurden 100 μl 4%iger L-Ascorbinsäure zugesetzt. 50 bis 100 μg chelatierten Antikörpers bzw. Fragmente wurden nun der Lösung zugesetzt und etwa 7 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die Separierung des radioaktiv markierten Antikörpers von den freien Radionukliden erfolgte über eine mit PBS gespülte, 2,5 ml fassende PD 10 Gelfiltrationssäule (Amersham). Dazu wurde das Volumen der RIK-Lösung zunächst auf das der Säule mit PBS aufgefüllt, dann aber nur 2 ml wieder aus der Säule ausgespült. Die Markierungsausbeute wurde vor und nach dem Reinigungsschritt mittels ITLC SG Papier geprüft.

3.5.2 Indium-111

^{111}In wurde als $^{111}\text{InCl}_3$ bezogen. Es ist geeignet für die Beobachtung der RIK-Verteilung in den Mäusen über einen längeren Zeitraum aufgrund seiner Halbwertszeit von 66 h und einfacher Kopplung an den chelatierten Antikörper und die Fragmente. Diese erfolgte wie unter 3.5.1.3 für ^{213}Bi beschrieben. In vivo wurden die

Emissionsmaxima der γ -Strahlung bei 171 und 245 keV sowohl zur Szintigraphie als auch für die Messung bei Biodistributionsstudien genutzt.

3.5.3 Jod-125

Jod-125 (^{125}I) zerfällt mit einer Halbwertszeit von 60,14 Tagen in ^{125}Xe . Neben der Auger-Emission zeichnet sich dieses Radionuklid durch γ -Strahlen mit einer Energie von 35 keV aus. ^{125}I wurde in Biodistributionsstudien verwendet, wo es für erste orientierende Studien sowohl mit intaktem Antikörper gekoppelt als auch mit den Fab'-Fragmenten als Tracer diente. In den ersten Studien konnte gezeigt werden, dass die Verteilung des Radioimmunkonjugates in biologischen Systemen beim Einsatz der verschiedenen genannten Radionuklide nicht differiert, abgesehen von der Anreicherung des Jods in Schilddrüse und Magen [Fischer, 2001].

3.5.4 Radiojodmarkierung

Die Jodierung der Antikörper und der Fab'-Fragmente erfolgte nach der von Fraker und Speck [1978] entwickelten Jodogen-Methode. Dabei werden Eppendorfcups mit je 5 μg 1,3,4,6-Tetrachloro-3 α ,6 α -Diphenylglycoluril (JodoGen[®], Pierce Chem., Rotterdam) gelöst in Chloroform beschichtet. Um eine spezifische Aktivität von etwa 8 mCi/mg Antikörper (296 MBq/mg) zu erreichen, wurden 625 μg Antikörper in 0,5 ml PBS mit 500 μCi (18,5 MBq) Na ^{125}I -Lösung für 15 min im beschichteten Eppendorfcup inkubiert. Der so markierte Antikörper wurde von freiem ^{125}I anschließend in einer Hightrap-Kartusche separiert. Die Dünnschichtchromatographie ergab in der Messung mittels Radio-DC-Detektors eine Markierungsausbeute von über 99%.

3.6 Zelllinien und Zellkultur

3.6.1 Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-435S

Zur Etablierung des Peritonealkarzinosemodells in Mäusen wurde die adhärent wachsende humane Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-435S (American Type Culture Collection, Manassas, VA) eingesetzt, die natürlicher Weise kein E-Cadherin exprimiert. Durch Transfektion mit der Calciumphosphat-Kopräzipitations-Methode wurde E-Cad in das Zellgenom eingeschleust zur Expression von physiologischem, also Wildtyp-E-Cadherin (MDA-WT). Die Transfektion des mutierten Gens, das die

Expression von Exon 9- deletiertem E-Cadherin verursacht (MDA-d9), erfolgte in gleicher Weise [Handschuh et al., 1999]. Zusätzlich wurde in beide Linien ein Plasmid für die Resistenz gegen Geneticin ko-transfiziert. Die für WT-E-Cadherin oder Exon-9-Deletion codierende cDNAs wurden durch RT-PCR aus physiologischem bzw. maligne entartetem Magengewebe hergestellt [Becker,1999]. Diese Zelllinie diente zu Beginn dieser Studien der Modellbildung, da anfänglich noch keine menschliche Magenkarzinomzelllinie mit E-Cadherinmutation zur Verfügung stand.

3.6.2 Magenkarzinomzelllinie HSC45-M2

Diese Zelllinie ist 1993 aus dem Magenkarzinom einer japanischen Patientin isoliert worden und wird seitdem in Kultur gehalten [Yanagihara et al., 1993]. Es handelt sich um eine Magenkarzinomzelllinie vom Siegelringzelltyp, die natürlicher Weise das veränderte E-Cadherin exprimiert, dem das Fehlen des Exon 9 durch In-frame-deletion zugrunde liegt.

3.6.3 Kultivierung der Zellen

Die Zelllinien wurden in Dulbeccos Modified Eagle Medium (D-MEM, 4,5 g/l Glucose) mit 10% FKS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit. Bei den Mammakarzinomzelllinien wurde zudem 1 µg/ml Geneticin dem Kulturmedium zugesetzt, um das zufällige Entstehen von Mischkulturen zu unterbinden. Der pH-abhängige Indikator im Medium zeigt durch Farbumschlag von rot nach gelb eine Anreicherung saurer Stoffwechselprodukte. Die Subkultivierung sowie das Ablösen der Zellen erfolgten unter antiseptischen Bedingungen in einer Laminar-Flow-Arbeitsbank. Die Zelllinien wurden bei einer Dichte von etwa 1×10^7 Zellen pro Kulturflasche der Größe 183 cm² passagiert. Bei dieser Zelldichte befinden sich die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase.

Nach Absaugen des Kulturmediums wurden von den Monolayern mit 10 ml PBS durch Schwenken der Flaschen Zelldetritus und Mediumreste ab gespült und abgesaugt. Dieser Reinigungsschritt macht das Ablösen der Zellen durch den Ca²⁺-Komplexbildner effizienter. Pro Kulturflasche (183 cm²) wurden 7 ml 1mM EDTA in PBS zugegeben und für 10 min im Wärmeschrank inkubiert. Durch Beklopfen der Flaschen lösten sich die Zellen vollends ab. Sie wurden anschließend in sterile Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 380 g zentrifugiert. Nach Absaugen des

Überstandes wurde das Zellpellet entweder mit FKS-haltigem Medium zur Passagierung oder mit FKS-freiem Medium zur Injektion in Mäuse resuspendiert.

3.6.4 Immunfluoreszenz

Die Passagierung von Zelllinien führt zwangsweise zur Kultivierung von Sublinien, die unter Umständen in ihrem Genom erheblich von dem gleichnamiger Zelllinien in anderen Labors abweichen. Um diese Entwicklung in vertretbaren Grenzen zu halten, wurden durch regelmäßiges Einfrieren größerer Chargen von Zellen in flüssigem Stickstoff nach Standardmethoden und entsprechendem Reaktivieren Zellen eingesetzt, die sich in der Passage um nicht mehr als 20 voneinander unterschieden.

Mittels Immunfluoreszenztests wurden die Zelllinien regelmäßig im Abstand von etwa 2 Monaten auf das Vorhandensein des mutierten E-Cad analysiert. Hierzu wurden ca. 5×10^5 Zellen in je eine Vertiefung einer 6-Well-Platte in Kulturmedium ausgesät. Nach 2 Tagen wurde das Medium abgesaugt und die Zellmonolayer zweimal behutsam mit PBS gespült und unfixiert weiter bearbeitet, da sich erwiesen hat, dass jegliche chemische Fixierung die Bindungseigenschaften der hochspezifischen Antikörper beeinflusst. Je 40 μg des 6H8 Ak wurden in 1,5 ml PBS in die Wells pipettiert. Auf die Kontrollen wurde PBS ohne Primärantikörper gegeben. Die Inkubationszeit betrug 1h bei Raumtemperatur. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden alle Wells eine halbe Stunde mit Anti-Ratte IgG, konjugiert mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 (Chemion, CA, USA) in der Verdünnung 1:200 inkubiert und anschließend ebenfalls mit PBS vorsichtig abgespült. Die Auswertung erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie (Axiovert 10, Zeiss) unter Verwendung eines Filtersatzes, der eine Anregung mit Licht der Wellenlänge 550 nm also im Grünbereich ermöglicht. Die Emission von Cy3 erfolgt mit 570 nm.

3.7 Immunreaktivität der Radioimmunkonjugate

Ein Vergleich der spezifischen Bindungsfähigkeit des ^{213}Bi -d9MAk wurde an allen drei Zelllinien durchgeführt. Die Immunreaktivität der ^{213}Bi -d9Fab' wurde an den HSC untersucht. Das gewählte Verfahren ist bei Nikula et al., 1999 beschrieben und wurde hierfür geringfügig modifiziert: Je 3×10^6 Zellen wurden in etwa 200 μl Zellkulturmedium 30 min auf Eis mit je 2 ng des markierten MAk bzw. der Fab'-Fragmente inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 ml PBS wurden die Zellen durch drei-minütige Zentrifugation bei

90 g vom Überstand separiert. Nach zweimaligem Waschen mit jeweils 0,5 ml PBS wurden die Aktivitäten der Überstände und Pellets im γ -Counter gemessen und die an den Zellen verbliebene Aktivität in Prozent der zugegebenen Gesamtaktivität berechnet.

3.8 Tierexperimente

3.8.1 Versuchstiere und Haltung

Weibliche Swiss nu/nu und weibliche Balb/c AnN Crl BR Mäuse, im Alter von 5 bzw. 7 Wochen, wurden aus spezifiziert pathogenfreier Zucht (Charles River, Frankreich bzw. Sulzfeld) bezogen und in Käfigen zu je 4-5 Tieren in einem Tierstall mit speziellem Lichtprogramm bei 26°C, 50-60% Luftfeuchtigkeit gehalten und mit Mäusestandardfutter Altromin 1314 und Leitungswasser ad libitum versorgt. Die Einstellung der Tiere erfolgte mindestens 2 Wochen vor Versuchsbeginn.

Die Nacktmäuse zeichnen sich durch Thymushypoplasie und konsequenter Immundefizienz aus. Die humorale Immunität ist reduziert, während die zelluläre nahezu völlig fehlt. Dies ist die Voraussetzung für erfolgreiche Xenotransplantation, z.B. von humanen Tumoren [Rygaard,1981]. Die Immunkompetenz der Balb/c Mäuse bot die Grundlage für die Erfassung von Chromosomenschäden in Knochenmarksstammzellen, die durch ein Entzündungsmodell vermehrt werden konnten.

Die Tierversuche wurden mit Genehmigung der Regierung von Oberbayern 209.1/211-2531-81/2000 und 2002 durchgeführt.

3.8.2 Anästhesie und Tötung

Zur Anästhesie wurden den Tiere entweder 250 μ l des Rompun-Ketamin-Gemisches (s.3.2) intraperitoneal injiziert oder die dem Tiergewicht angemessene Menge der antagonisierbaren Narkotikakombination (s.3.2) s.c. appliziert. Die Augensalbe Vidisic® wurde während des Fehlens des Lidschlußreflexes auf der Cornea verteilt. Ein rasches Auskühlen der Tierkörper insbesondere der Nacktmäuse bei narkosebedingt reduziertem Stoffwechsel wurde durch Einsatz einer Infrarotlampe oder durch körperwarme Wasserkissen verhindert. Zur i.v. Injektion des Radioimmunkonjugates genügte eine Kurznarkose mit Äther. Dazu wurden die Tiere in

ein geschlossenes Glasgefäß, das ein mit Aether getränktes Papiertuch enthielt, verbracht.

Die Tötung der Tiere erfolgte nach Atemstillstand infolge der Betäubung mit CO₂ durch Eröffnung des Brustkorbs und Durchtrennung der Aorta im Bereich des Aortenbogens zum Entbluten der Organe.

3.8.3 Tumormodelle

Zwei unterschiedliche Ansätze zur Untersuchung der spezifischen therapeutischen Effizienz des mutationsspezifischen Antikörpers 6H8 gerichtet gegen die delta 9-Mutation des E-Cadherins ergaben sich aus der Verfügbarkeit von Zelllinien mit der genannten Mutation:

1. Die MDA-Zelllinie wurde wie unter 3.6.1 beschrieben mit WT-E-Cad bzw. d9-E-Cad transfiziert. Der mutationsspezifische Antikörper sollte an das mutierte E-Cadherin spezifisch binden, an das WT-E-Cadherin, das als Kontrolle dient, jedoch nicht binden.
2. Bei der Magenkarzinomzelllinie HSC45-M2 war keine Zelllinie mit WT-E-Cadherin verfügbar. Spezifische Bindung des 6H8 und seiner Fab' wurden untersucht, indem als Kontrolle der für delta 9-Mutation unspezifische 7H1 (für delta 8-Mutation spezifische! s. 3.4) eingesetzt wurde.

3.8.3.1 Peritonealkarzinose

In Vorstudien hat sich eine orthotope Applikation von 1×10^7 MDA-MB-435S-Zellen pro Maus als geeignet erwiesen für die Induktion ein Peritonealkarzinose innerhalb weniger Wochen nach Zellinokulation [Fischer, 2001]. Diese Zellzahl wurde auch für die HSC45-M2 übernommen und mit Hilfe eines Cell Counter- und Analyser-Systems (CASY[®], Model TT) in der zu injizierenden Zellsuspension eingestellt. Nach dem Widerstandsmeßprinzip wurde die Anzahl der intakten Zellen/ml Flüssigkeit bestimmt. Aus der Pulsfläche (=Integral des Widerstandsmeßsignals) berechnete das Gerät die durchmesserlineare Größenverteilung der Zellen in der Suspension. Um eine Manifestierung der Karzinomatose, die dem Krankheitsbild beim Menschen vergleichbar ist, zu gewährleisten, sollen die Zellen möglichst homogen im Bauchraum verteilt sein und auch zwischen die Mesenterialfalten gelangen. Dazu wurden unter

Beachtung der Tierschutzrichtlinien, die eine Applikation von maximal 1ml Flüssigkeit i.p. bei 20 g schweren Nagern zulassen, die Zellen in einem Volumen von 0,5 ml serumfreien Mediums injiziert. Die Injektionsstelle befand sich auf der Linea alba, zur Schonung der Leber caudal des Nabels und erfolgte zur Vermeidung einer Milzpunktion im 20-30⁰-Winkel der 27G Kanüle nach rechts von der Linea alba abweichend nach cranial unmittelbar visceral des Peritoneums.

3.8.3.2 Darstellung der Karzinose

3.8.3.2.1 Histologie

Da die Manifestierung der Peritonealkarzinose im zeitlichen Ablauf für MDA Zellen, die d9-E-cad exprimieren, bereits beschrieben ist [Fischer, 2001], wurden hier MDA-Zellen mit WT-E-Cad-Expression bzw. HSC45-M2-Zellen untersucht. Dazu wurden nach der oben dargelegten Methode in 14 bzw. 8 Nacktmäuse die Tumorzellen inokuliert. Im Abstand von drei Tagen bei den WT-MDA-Zellen, im 2-Tage-Abstand bei der Magenkarzinomzelllinie (HSC) wurden je zwei Tiere getötet, und das Peritoneum und die abdominalen Organe adspektorisch auf Ausbildung der Peritonealkarzinose untersucht. Die Organe, das Diaphragma und ein Stück des Peritoneums wurden nach Entnahme und sofortigem Verbringen in 4%iges Formalin nach Standardmethoden in Paraffin eingebettet, geschnitten, HE gefärbt und hinsichtlich der Tumormanifestierung histologisch beurteilt (I. Becker, Institut für Pathologie der TUM).

3.8.3.2.2 Sonographie

Das Ultraschallgerät EUB-6000 CV wurde mit einer Konvex-Sektor-Sonde verwendet mit einer Frequenz von 7,5 MHz. Die Abdominalsonographie diente der Erfassung der Tumormanifestierung in vivo.

Die Tiere wurden in Ätherkurznarkose in Rückenlage gebracht, und das auf Körpertemperatur vorgewärmte Ultraschallkontaktgel ventral aufgetragen. Die Untersuchungsebenen waren transversal und longitudinal.

3.8.3.2.3 In-vivo-Kernspintomographie

Die Kernspintomographie nutzt die magnetischen Eigenschaften von Wasserstoffatomen zur bildgebenden Diagnostik. Die magnetischen Momente (Spins) der Kerne werden dabei in einem homogenen Magnetfeld parallel zu diesem ausgerichtet (z-Richtung) und können durch ein mit Resonanzfrequenz eingestrahltes elektromagnetisches Wechselfeld zur Präzession angeregt werden. Nach Abschaltung des Wechselfeldes kehren sie in ihre Ausgangslage zurück (Relaxation). Dabei wird ein detektierbares elektromagnetisches Feld abgestrahlt, das sog. NMR (nuclear magnetic resonance)-Signal. Drei dem homogenen Grundfeld überlagerte Gradientenfelder erzeugen eine Ortsabhängigkeit der Resonanzfrequenz und machen somit eine Ortskodierung des Empfangs-Signals möglich. Die Signalstärke hängt von der Dichte der Wasserstoffkerne im Gewebe sowie den Relaxationszeiten T_1 und T_2 ab. Dabei beschreibt T_1 die Spin-Gitter Relaxation, das heißt die Rückkehr der Magnetisierung in z-Richtung, die mit Energieübertrag auf die Umgebung verbunden ist. Die Spin-Spin-Relaxationszeit T_2 ist charakterisiert durch die Rückkehr der Magnetisierung in xy-Richtung auf den Ausgangswert 0 und hängt ab von der Wechselwirkung benachbarter Kernspins, sog. Umklappprozesse. Durch geeignete Wahl von Gradientenfeldschaltung, Hochfrequenzeinstrahlung und Signalauslesung können T_1 oder T_2 gewichtete, d.h. den Kontrast bestimmende, Bilder erzeugt werden. Krankhafte Prozesse wie beispielsweise Aszites im Mäuseabdomen gehen häufig mit freien Wasserstoffmolekülen mit langen Spin-Spin-Relaxationszeiten einher und können daher am eindrucksvollsten mit T_2 gewichteten Aufnahmen sichtbar gemacht werden [Roth, 1984]. Als eines der bildgebenden Verfahren zur Tumordiagnostik mit der geringsten Invasivität fand die Kernspintomographie in dieser Studie zum Staging der Peritonealkarzinose Verwendung. Ziel war es, die Entwicklung bzw. die Regression der Tumorausbildung zu visualisieren.

Antagonisierbar betäubte (s. 3.2), tumortragende und tumorfreie Nacktmäuse wurden axial zu den beiden Öffnungen auf dem Bauch liegend in der Handgelenkspule eines Philipps 1,5 Tesla Kernspintomographen gelagert. Die Aufnahmezeit mit dem 2D Turbospin Echo T_2 -Programm betrug 11 min mit 4 Mittlungen bei einer Repetitionszeit T_R von 2500 ms.

3.8.3.2.4 In-vivo-Fluoreszenzanalyse „Optical Imaging“

HSC-Zellen wurden in vitro mit dem Fluoreszenzfarbstoff Vybrant Did-dye[®] markiert. Dazu wurden sie abgelöst und mit serumfreiem Medium auf die Dichte 1×10^6 Zellen/ml resuspendiert. Pro ml Zellsuspension wurden dann 5 μ l der Vybrant Did-dye[®]-Lösung zugegeben und 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz bei 1500 rpm 5 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und verworfen, und die Zellen wieder in serumfreiem, 37°C warmem Medium resuspendiert. Der Waschschrift wurde noch zweimal wiederholt. 5×10^5 Zellen wurden mit PBS ad 0,5 ml verdünnt und in Nacktmäuse i.p. inokuliert. Die Nacktmäuse wurden für die Aufnahme in Rompun/Ketamin-Narkose auf dem Rücken in einer Darkbox gelagert in einer dem Mäuserücken angepassten Gipsform. Die Ausbreitung und Adhärenz der Zellen im Mäuseabdomen wurde mittels Fluoreszenz beobachtet. Vybrant Did-dye[®] emittiert Licht der Wellenlänge 665 nm, wenn es mit 644 nm angeregt wird [Horan et al., 1988]. Die von einer Digital-Kamera aufgenommenen Fluoreszenzbilder wurden mit der polychromatischen Aufnahme überlagert.

3.8.3.3 Erzeugung solider, subkutaner Tumoren

Durch Injektion von 1×10^7 HSC45-M2 in 100 μ l serumfreien Zellkulturmediums in die Flanke von Swiss nude Mäusen konnten innerhalb von zwölf Tagen solide Tumoren mit Durchmessern von ca. 2 mm generiert werden. Dieses Tumormodell wurde zur Analyse der Antigenverteilung im Tumor verwendet, sowie zum Vergleich der Eindringtiefen von intaktem Antikörper bzw. von Fragmenten in den Tumor gegen den interstitiellen Druck.

3.8.4 Verteilung der RIK im murinen Organismus

3.8.4.1 Beobachtung der Kinetik mittels Szintigraphie

Tumortragenden Nacktmäusen und tumorfreien Kontrolltieren wurden je 0,74-6,54 MBq (20-174 μ Ci) ^{111}In -d9MAk (10 μ g) oder -Fab' i.p. appliziert (s. 3.7.4.2). Nach 4 h, 24 h und 52 h wurde die Verteilung der ^{111}In -Konjugate mittels Szintigraphie dargestellt. Die Tiere wurden dazu mit Rompun/Ketamin narkotisiert. Die Aufnahmen erfolgten in Bauchlage ventro-dorsal. Die beiden Peaks von 172 und 249 keV wurden je in einem 15%-Fenster erfasst von einem ADAC Vertex Gerät mit 3/8" Kristall und

einem Medium-Energy-General-Purpose-Collimator bei Aufnahmezeiten von 20-45 min. Die Auflösung betrug 5,5 mm FWHM (Full Width at Half Maximum). Die Verteilung der Radioimmunkonjugate über einen längeren Zeitraum interessierte trotz kurzer HWZ des für die Therapie verwendeten ^{213}Bi , da sie Schlüsse zulässt auf die Spezifität und Stabilität der Bindung der eingesetzten Antikörper oder Fragmente.

3.8.4.2 Biodistribution

Die Biodistribution, d.h. die Verteilung der RIK in den Geweben der Versuchstiere, wurde sowohl nach i.p. als auch nach i.v. Applikation untersucht. Die orthotope Injektion der RIK erfolgte analog der Tumorzellinokulation wie unter 3.7.3.1 beschrieben ebenfalls im Bolus ad 0,5 ml in PBS. Injektionsstelle und -weise sind ebenfalls dort beschrieben.

Unmittelbar vor der i.v. Injektion des RIK in eine der beiden lateralen Schwanzvenen wurde der Schwanz in etwa 45°C warmes Wasser getaucht und anschließend abgetrocknet. Die so dilatierte Schwanzvene wurde mittels 27G Kanüle punktiert, und 100-200 µl der jeweiligen radioaktiven Substanz i.v. injiziert. Eine Anreicherung der RIK über den Blutweg bot die Möglichkeit, bei Peritonealkarzinose auf die Vaskularisation der Mikrometastasen zu schließen.

Die applizierte Aktivität war abhängig von der HWZ des verwendeten Radionuklids und der Inkubationszeit. Um in allen Geweben Impulsraten zwischen 1×10^3 - 1×10^6 cpm zu erreichen, da nur diese im γ -Counter zuverlässig messbar waren, wurden von ^{213}Bi -Konjugaten Aktivitäten von 3,7 MBq bzw. 11,1 MBq appliziert zur Erfassung der Bioverteilung 1 h bzw. 3 h p. i.. An ^{125}I -Konjugaten wurden 0,37 MBq injiziert.

Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Injektion der RIK (^{213}Bi 1h und 3h, ^{111}In wenige Tage) wurden die Tiere wie beschrieben getötet. Blut, Herz, Lunge, Muskel, Pankreas, Peritoneum, Milz, Leber, Niere, Magen, Darm und ggf. Tumor und Aszites wurden in γ -Probenröhrchen überführt, deren Taragewicht vorher bestimmt worden war. Um Masseveränderungen aufgrund von Feuchtigkeitsverlust zuvor zu kommen, wurde das Gewicht sämtlicher Gewebe sowie von Blut und Aszites unverzüglich nach Entnahme mit einer Analysenwaage (Einteilung = 0,0001g; Meßfehler= 0,0002g) bestimmt.

Von Blut und Leber wurden jeweils nur Anteile gemessen, weil andernfalls die hohe Aktivität jenseits des linearen Zählbereichs des γ -Counter gelegen hätte. Von einer homogenen Verteilung des RIK in Blut bzw. Leber konnte aufgrund deren physikalischer und histologischer Strukturen ausgegangen werden. Von Dickdarm und Dünndarm wurden jeweils etwa 2 cm ohne Mesenterium entnommen, und die Ingesta durch Ausstreichen entfernt. Die Akkumulation von Radionuklid in der Schilddrüse interessierte bei Applikation von jodmarkierten Antikörpern und Fab', da durch die spezifische Anreicherung freien Jods in diesem Organ auf die Stabilität der Markierung rückgeschlossen werden konnte. Das Gewicht der Mäuseschilddrüse wurde nach Erfahrungswerten unseres Labors mit 2,5 μg festgesetzt. Der Aszites wurde unmittelbar nach Erfassung von Masse und Aktivität durch Zentrifugation bei 200 g in Zellpellet und Überstand separiert, wobei zweimal mit je 500 μl PBS gespült wurde. Anschließend wurden die zwei Fraktionen getrennt gewogen, und die Aktivität gemessen.

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte in einem γ -Counter (Wallac). Dazu wurden in den Organproben mit ^{111}In -, ^{125}I - und ^{213}Bi -markierten Antikörpern bzw. Fragmenten 1 min lang die Zählraten bestimmt und in counts per minute (cpm) angegeben. Zur Auswertung wurden nur solche Zählraten herangezogen, die innerhalb des linearen Meßbereichs des γ -Counters (1.000-1.000.000 cpm) lagen. Diese cpm-Werte der Gewebeproben wurden auf Prozent der injizierten Aktivität pro g Gewebe normiert (% ID/g). Der 1% Referenz-Wert wurde wie folgt bestimmt: Die pro Tier injizierte Aktivität wurde ad 100 ml in PBS verdünnt und 1 ml davon im γ -Counter gemessen (5-fach Bestimmung).

3.8.5 Therapiestudie

Die Therapiestudien wurden an Nacktmäusen durchgeführt, denen i.p. 1×10^7 MDA-d9-, MDA-WT oder HSC-Zellen inokuliert worden waren (s. 3.7.3.1). Nach einem Tag bzw. nach 8 Tagen wurden die Tiere mit 1,85 MBq (50 μCi), 7,4 MBq (200 μCi) oder 22,2 MBq (600 μCi) des ^{213}Bi -Immunkonjugates i.p. behandelt. Als Kontrolle dienten untherapierte Tiere. Die Spezifität der ^{213}Bi -d9MAk-Therapie wurde kontrolliert mittels eines tumorunspezifischen ^{213}Bi -Immunkonjugates, also unter Einsatz des 7H1 im Modell mit den HSC45-M2 (s. 3.7.3) bzw. mit Hilfe von Tumorzellen ohne tumorspezifischem Antigen, d.h. mit dem d9MAk (6H8) bei Mäusen mit MDA-WT.

Tab. 1 fasst die verschiedenen Therapieansätze zusammen. Als Endpunkte der Überlebenszeit wurden adspektorisch erkennbarer Aszites, beginnende Tumorkachexie oder Tumorgroße, die das Allgemeinbefinden des Tieres beeinträchtigt, gewertet. Anhaltspunkte für die ersten, zur Therapie gewählten Aktivitäten boten die Ergebnisse von Nikula [1999], der für ^{213}Bi -Immunkonjugate bei Mäusen eine MTA von 370 MBq/kg bei i.v. Applikation und von 740 MBq/kg bei i.p. Applikation ermittelte.

Tab. 1: Zusammenstellung der Therapieansätze mit menschlichen Magenkarzinomzellen (HSC) und transfizierten Mammakarzinomzellen (MDA)

Zeit zw. Tumorzellinj. und Therapie	therapeutisch applizierte Aktivität			
	Kontrollen	1,85 MBq	7,4 MBq	22,2 MBq
1 d	HSC,	HSC	HSC, MDA	HSC, MDA
8 d	MDA	-	HSC, MDA	HSC, MDA

3.8.6 Untersuchungen zur Toxizität der Radioimmunkonjugate

Während freies ^{213}Bi Affinität zu den Nieren zeigt [Nikula et al., 1999], ist für das Radioimmunkonjugat das Knochenmark das dosislimitierende Organ. Entsprechend erlaubt der Blick auf das Blutbild und dessen Generationsort eine erste präklinische Beurteilung der Toxizität der hier untersuchten neuen Therapieform in Abhängigkeit von der eingesetzten Aktivität.

3.8.6.1 Zählung peripherer Leukozyten

Nach zweiwöchiger Adaptationszeit in den Stallungen des Klinikums wurde tumorfreien Nacktmäusen aus der Vena jugularis unter Kurznarkose mit Äther ca. 40 µl Blut entnommen und die Anzahl der Leukozyten im Blutanalysegerät SE 9000 (Sysmex, Norderstadt) bestimmt. Das Blut musste hierfür mit der Shedreagenz Cellpack (Sysmex, Norderstadt) auf 150 µl verdünnt werden. Dann wurde den Tieren i.p. 1,85 MBq (50 µCi), 7,4 MBq (200 µCi) oder 22,2 MBq (600 µCi) des ^{213}Bi -d9MAk (10µg) appliziert oder - in der Kontrollgruppe - nur 10 µg des nativen MAk. Am Tag 2

oder am Tag 3 nach Injektion des RIK dann wöchentlich bis 50 Tage p. i. wurde die Bestimmung der Leukozytenzahl wiederholt. Die erfassten Werte wurden prozentual bezogen auf den individuellen prätherapeutischen Wert jeder einzelnen Maus.

Als Eckdaten für die Planung dieses Versuchs dienten Empfehlungen der Arbeitsgruppe GV-SOLAS [1999], nach denen bei einem Versuchstier bei wiederholten Blutentnahmen die wöchentlich entnommene Menge 7,5 % des Blutvolumens nicht überschreiten soll. Als Faustzahl gilt, dass einem Versuchstier pro Tag maximal 1% des Blutvolumens entnommen werden darf. Dies entspricht etwa 0,6 ml/kg/Tag. Bei einer 25g schweren Maus dürfen demnach etwa 15 µl/Tag entnommen werden.

3.8.6.2 Präparation des Knochenmarks zur Analyse chromosomaler Aberrationen

Noch zeitnäher am toxischen Ereignis als durch Leukozytenzählung können dessen Auswirkungen durch die Analyse der Läsionen an Chromosomen detektiert werden, da die Veränderungen im Blutbild sekundär aus einer Schädigung auf Zellebene folgen (Abb. 4).

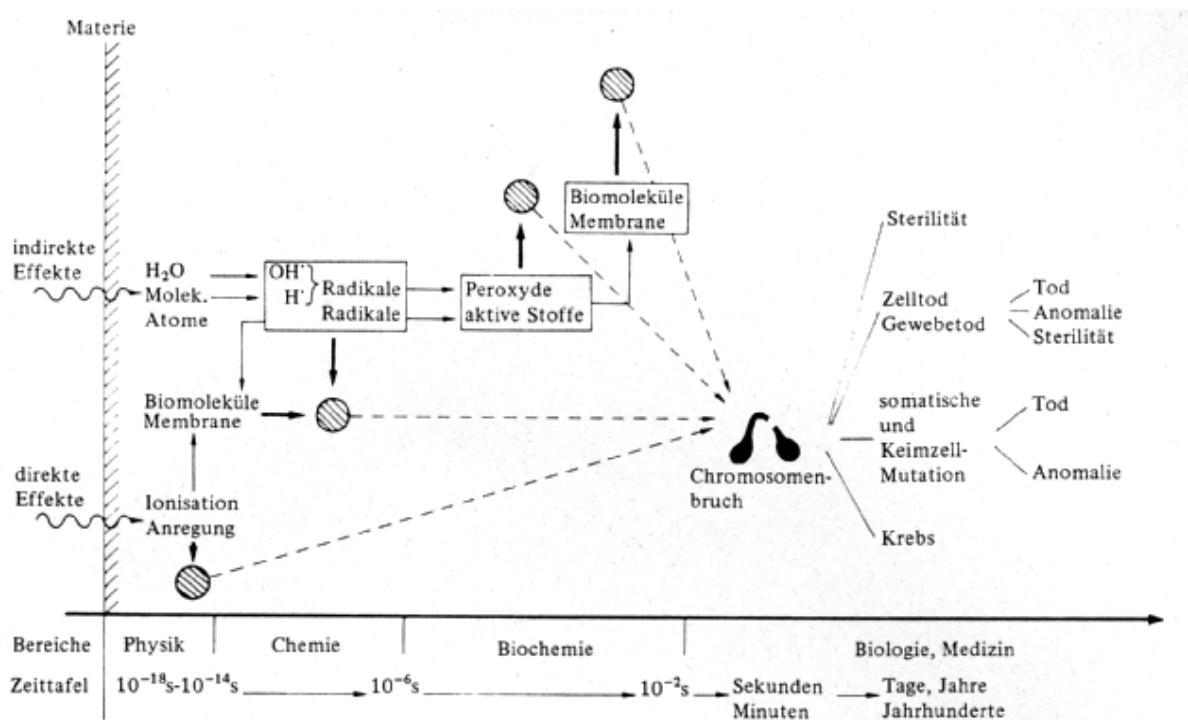


Abb. 4: Strahlenbiologische Wirkungskette [Fritz-Niggli, 1988]

Nativen Balb/c Mäusen wurden Aktivitäten von 1,85 MBq (50 μ Ci), 7,4 MBq (200 μ Ci), 14,8 MBq (400 μ Ci) oder 22,2 MBq (600 μ Ci) des ^{213}Bi -markierten d9MAk (6H8) bzw. nativer d9MAk i.p. injiziert. Zu den Zeitpunkten 4, 8 und 24 Stunden sowie 3, 5, 7, 28 oder 100 Tage nach Injektion des RIK wurde das Knochenmark der Tiere präpariert. 24 h vor der Präparation wurde die Zellteilung mittels Injektion von ConA (200 μ g/200 μ l PBS/ Tier) stimuliert. 3 h vor der Tötung wurde den Tieren i.p. je 20 μ g Demecolcine in 250 μ l PBS injiziert, um mitotische Zellen in der Metaphase zu arretieren.

Nach Tötung der Tiere mittels CO_2 wurden beide Femuren unter Schonung der Femurköpfe und der Condylen entnommen. Durch behutsames Abtragen von Knorpel und Gelenkflächen beidseits wurde ein Spülkanal durch den Femur für eine Kanüle von 21 G geschaffen. Die Knochenmarkszellen wurden mittels HBSS ausgespült und in ein Reagenzglas überführt. Der Erfolg des Ausspülens des Knochenmarkes zeigte sich in einem Farbwechsel der zunächst braunroten Oberschenkelknochen zu elfenbeinfarbig. Nun wurde die Knochenmarkssuspension bei 90 g für 5 min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Das Pellet wurde in etwa 2 ml 0,56%iger KCL-Lösung luftblasenfrei resuspendiert. Diese hypotone Behandlung bewirkt, dass nach 20 min die Erythrozyten geplatzt sind und die Lymphozyten an Volumen zugenommen haben. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das Pellet mit 3 ml frisch angesetzter, eiskalter Lösung aus Ethanol und Essigsäure (s. 3.2) zwischen 24 h und 96 h fixiert. Der Überstand nach Zentrifugation wurde verworfen, und das Pellet in ca. 0,8 ml Fixans aufgenommen, so dass eine kristalline Lösung resultierte. Auf gereinigte, luftgetrocknete Objektträger wurden je zwei Tropfen der Zellsuspension nach der Bombing-Methode aus etwa 10 cm Höhe aufgetropft, und den Zellbestandteilen durch die Temperaturerhöhung auf ca. 45 °C die Ausbreitung erleichtert. Sobald am Rand eines Suspensionstropfens Newtonsche Ringe erkennbar wurden, wurde erneut ein Tropfen Fixationslösung auf die Zellen gegeben. Nach vollständiger Lufttrocknung wurden die Präparate einer Giemsa-Färbung unterzogen. Dazu wurden die Objektträger in 5% ige Giemsa-Lösung in Weise-Puffer (s. 3.2) 5 min eingelegt und anschließend zweimal mit Aqua bidest. gespült. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch mit Ölimersionsobjektiven (Zeiss, 1000-fach).

Strahleninduzierte strukturelle Chromosomendefekte werden in Chromosomenaberrationen und Chromatidaberrationen unterteilt. Welcher dieser Aberrationstypen beobachtet werden kann, hängt davon ab, in welcher Phase des Zellzyklus bestrahlt

wurde. Chromosomenaberrationen werden in der G1-Phase des Zellzyklus induziert und können in der folgenden Metaphase in verschiedenen Typen auftreten, je nachdem wie viele der induzierten Brüche offen bleiben oder miteinander in Wechselwirkung treten. Chromatidaberrationen werden im Allgemeinen in der S- und in der G2-Phase des Zellzyklus induziert, nach Aufspaltung des Chromosoms in zwei Chromatiden.

3.8.6.3 Blutharnstoff- und Kreatininwerte von ausgewählten Tieren

Freie Metallradionuklide stellen ein Gefährdungspotential besonders für die Nieren dar. Daher wurden bei einigen Versuchstieren, die makroskopische Veränderungen der Nieren in der Sectio aufwiesen oder deren Aszites tumorzellfrei war (s. 3.8.3), Harnstoff- und Kreatininkonzentration im Serum mit dem Serumanalysegerät Vitros System 250 Chemistry (Johnson-Johnson) gemessen. Die Harnstoffwerte wurden, wie international gebräuchlich, als Harnstoff-Stickstoff-Werte BUN (=blood urea nitrogen) erfasst. Eine Erhöhung der Werte dieser harnpflichtigen Substrate im Blut - eine Azotämie - ist als Zeichen einer weit fortgeschrittenen akuten oder chronischen Niereninsuffizienz zu werten. Zur Serumgewinnung wurde nach einer halbstündigen Koagulationszeit des Blutes bei RT durch 5 minütige Zentrifugation bei 2000 g das Zellpellet vom Serum separiert.

3.9 Zytologie und Histologie

3.9.1 Quantifizierung der HSC45-M2-Zellen im Aszites

Aszites ist ein Symptom einer umfangreichen Palette von Erkrankungen und somit für Peritonealkarzinose keineswegs pathognomonisch. Rechtsherzinsuffizienz, Hepatitis, Hypalbuminämie, Amyloidose und Endometriose kommen beispielsweise als Differentialdiagnose in Frage. Aber auch Peritonitis, chronisches Nierenversagen, Pankreatitis und Verlegung des Lymphabflusses oder der Vena portae [Lorenz et al., 1984] können einer Aszitesbildung zugrunde liegen. Letztgenannte Aszitesursachen könnten in dieser Studie aufgrund der eingesetzten Strahlung oder durch raumforderndes Tumorwachstum eine erhöhte Inzidenz haben. Eine nähere histologische Untersuchung der abdominalen Flüssigkeitsansammlung war daher zwingend.

Tumorzellen wurden mittels einer modifizierten Neubauer-Zählkammer bei 100-facher Vergrößerung quantifiziert. Dazu wurde der Aszites mit PBS jeweils so verdünnt, dass sich die Zellen in der Kammer nicht überlappten. Es wurden nur Zellen registriert, die einen Durchmesser von 10-30 µm hatten (vgl. 3.7.3.1) und epitheliale Morphologie aufwiesen. Eine Verwechslungsgefahr mit Monozyten, Mesothelzellen und Makrophagen bestand bezüglich der Zellgröße. Zur eindeutigen Unterscheidung wurde jeweils auch ein Aszitesausstrich angefertigt, der nach 24 stündiger Lufttrocknung nach dem Standardprotokoll von Pappenheim gefärbt wurde. Dazu wurde jeder Objektträger mit etwa 1,5 ml May-Grünwald-Lösung bedeckt. Nach 3-5 min wurde die gleiche Menge Aqua dest. zugegeben, 1 min inkubiert, und das Gemisch abgegossen. Anschließend wurden die Ausstriche mit verdünnter Giemsa-Lösung (5ml Stammlsg. ad 100 ml mit Aqua dest.) 15 min gegengefärbt, vorsichtig unter Leitungswasser gespült und luftgetrocknet.

3.9.2 Herstellung von Kryostat-Gewebeschnitten

Kryostat-Gewebeschnitte lassen sich mit relativ geringem Zeitaufwand herstellen, daher war diese Art der Gewebseinbettung für die Mikroautoradiographie mit ²¹³Bi wegen dessen kurzer HWZ besonders geeignet. Die Gewebe - zumeist Tumoren und entsprechende Kontrollgewebe wie Muskel oder Leber - wurden unmittelbar nach Entnahme aus dem Tier in kaltes PBS verbracht, anschließend abgetupft, auf Objekteller eines Kryostaten (Microm, TYP HN 500) mittels O.C.T. Compound (Tissue Tek) aufgefroren und bei -18 °C Schnitte von 6 µm angefertigt. Mit gereinigten und silanisierten Objektträgern wurden die Gefrierschnitte aufgenommen und sofort weiter bearbeitet oder bei -70 °C gelagert.

3.9.3 Immunhistochemie

Mittels immunhistochemischen Verfahren sollte die Antigenverteilung in Tumorknötchen illustriert werden. In der sog. Sandwich-Methode bindet zunächst d9MAk als Primärantikörper an das spezifische Antigen, dann wird der Sekundärantikörper mit konjugiertem Enzym an die speziesspezifische c-Kette des Primärantikörpers gekoppelt. Das chromogene Substrat wird dann im 3. Schritt proportional zur Sekundärantikörpermenge und somit auch zur Primärantigenanzahl durch das Enzym in den sichtbaren Farbstoff umgesetzt. Eine Verstärkung des

Effektes wird erreicht durch Bildung eines Avidin-Biotin-Enzym-Komplexes (ABC-System)(Tab.3).

Biotinylierter Anti-Ratte-IgG wurde als Sekundärantikörper eingesetzt. Er war im Vectastain Elite ABC Kit (Vector Laboratories, Bulingame, USA) enthalten. Als chromogenes Substrat wurde 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC-Farbsubstrat, Vector Laboratories, U. K.) verwendet.

Kontrollen wurden nur mit Sekundärantikörper inkubiert. Die Schnitte wurden entsprechend den Herstellerangaben vorbehandelt und nach der Normalserumbehandlung mit der vom Hersteller angegebenen Antikörperverdünnung inkubiert. Alle folgenden Protokollschritte richteten sich nach dem Standard-ABC-Protokoll (Tab. 2) und wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Tab. 2: Protokoll der Avidin-Biotin-Methode mit Vorbehandlung / Verdünnung der Antikörper

Vorbehandlung der Kryostatschnitte:

Fixierung in eiskaltem Aceton	10 min
Inaktivierung der endogenen Peroxidase mit 1% igem H ₂ O ₂ in Aqua dest.	30 min

ABC- Protokoll:

Spülen in PBS	2 x 2 min
Verdünntes Normalserum in PBS 1:133	20 min
Zur Antigenverteilungsstudie: Inkubation mit d9MAk	30 min
Spülen mit PBS	2 x 2 min
Inkubation mit biotinyliertem Sekundär-AK 1: 400	30 min
Spülen mit PBS	2 x 2 min
Inkubation mit ABC- Peroxidase- Komplex	30 min
Spülen mit PBS	2 x 2 min
Inkubation mit AEC	15 min
Spülen mit PBS	2 x 2 min
Färbung mit Hämalaun	1 min
Bläuen mit Leitungswasser	5 min
Eindecken mit Vecta Mount	

3.9.4 Mikroautoradiographie zur Bestimmung der Penetrationstiefe von d9MAk und Fab'

Mittels dieser Technik sollte die Penetrationstiefe in Tumorknötchen von intaktem Antikörper mit der von Fab' verglichen werden. Theoretisch sehen sich Fab' aufgrund ihrer reduzierten Größe im Tumor einem geringeren Widerstand durch den interstitiellen Druck gegenüber als intakte Antikörper, was eine homogenere Verteilung im Tumor erwarten lässt. Das Prinzip dieses Verfahrens beruht auf der Reaktion der Energie aus radioaktivem Zerfall mit dem kristallinen Silberbromid der Photoemulsion. Dabei werden die Bromidanionen oxidiert und die Silberkationen zu atomarem Silber reduziert. Dieses wird durch die photographische Entwicklung sichtbar gemacht und erlaubt eine Lokalisation der radioaktiven Strahler in Gewebeschnitten mit einer Auflösung von 0,05 µm.

Das s.c. aus einer Nacktmaus isolierte Tumorknötchen von etwa 3 mm Durchmesser mit Expression von d9-E-Cadherin sowie Teile der Leber wurden nach Entnahme unverzüglich in ^{213}Bi -d9MAk-Lösung bzw. ^{213}Bi -d9Fab'-Lösung inkubiert. Nach 30 min wurden die Gewebe zweimal in PBS gespült, abgetupft und Kryoschnitte angefertigt (s. 3.8.2). Die Schnitte wurden im Dunkeln mit Photoemulsion LM RPN 40 bedeckt. Nach Exposition über 18 h bei +4 °C unter Lichtabschluß wurden die Schnitte entwickelt (6 min), in Aqua bidest getaucht (1 min), 10 min fixiert und gewässert. Die luftgetrockneten Mikroautoradiographieschnitte wurden nach dem H.E.-Protokoll gefärbt (Tab. 3) und mit Glyceringelatine eingedeckt.

Tab. 3: Hämalaun/ Eosin-Färbung

Saures Hämalaun (nach Mayer)	1 min
Wässern in Leitungswasser (Bläuen)	5 min
Eosin wässrig (1 %)	30 s
Aqua dest.	1min
aufsteigende Alkoholreihe (2x 96%, 2x 100%)	je 1min
Xylol	2 x 5 min

3.10 Statistische Auswertung der Überlebensdaten

Wie bei Therapiestudien über humane Krebserkrankungen stand die statistische Erfassung der Überlebenszeiten auch hier dem Problem gegenüber, dass

1. die Studie ausgewertet wurde zu Zeitpunkten, zu denen noch nicht alle Therapierten verstorben waren, und
2. nicht alle zu Untersuchenden gleichzeitig in die Studie eingetreten waren, und somit nicht die gleiche Beobachtungszeit zugrunde gelegt werden konnte [Harms, 1992].

Die graphische Darstellung der Überlebenszeit erfolgte daher nach der Kaplan-Meier-Methode [1958], einer Form der umgekehrten Summenhäufigkeitsfunktion, in der auch sog. *zensierte Daten* berücksichtigt werden. Zensierte Daten sind Werte mit vorläufigem Charakter. Die Berechnung der statistischen Signifikanzen wurde nach dem Logranktest durchgeführt mittels des SPSS-Programms (Microsoft Windows). Als „hochsignifikant“ wurden Werte definiert mit Signifikanzniveau $p < 0,01$, als „signifikant“ mit $p < 0,05$.

4 Ergebnisse

4.1 Kopplung der Radionuklide an den Antikörper

Für die Therapieversuche wurde eine Antikörpermenge von etwa 10 µg pro Maus angestrebt, um eine vergleichbare Antigenbesetzung an den Tumorzellen auch bei unterschiedlichen Aktivitäten zu erreichen. 10 µg Antikörper entsprechen etwa 4×10^{13} Molekülen. Die daraus resultierenden spezifischen Aktivitäten reichten von 270 MBq/mg (7,3 mCi/mg) bis 1800 MBq/mg (49 mCi/mg). Die Markierungsausbeute vor der Reinigung mit der PD 10 Säule variierte in Abhängigkeit von der eingesetzten Antikörpermenge: 60 µg Antikörper wurden zum Erreichen hoher spezifischer Aktivitäten eingesetzt und konnten nur 48% des ^{213}Bi im Eluat binden. Bei größeren Antikörpermengen von etwa 130 µg waren bis zu 81% des ^{213}Bi des Eluats bereits vor der Reinigung gebunden. Nach der Reinigung zeigten die RIK-Lösungen eine Markierungsausbeute von 98%.

Die spezifische Aktivität ^{125}I -markierter intakter Antikörper lag zwischen 74 und 111 MBq/mg (2 und 3 mCi/mg) bei einer Markierungsausbeute von über 98%. Bei Kopplung der Antikörper mit ^{111}In wurde eine spezifische Aktivität von etwa 78 MBq/mg (2,1 mCi/mg) erreicht.

Bei der Markierung der Fab' Fragmente des d9MAk 6H8 mit ^{213}Bi lag die Markierungsausbeute selbst nach der Reinigung bei nur 38,3 %. Da nur 3,9% des im Eluat vorhandenen ^{213}Bi an die Fab' gebunden waren, kann eine mangelhafte Chelatierung der Fragmente ursächlich zu Grunde gelegt werden. Die spezifische Aktivität lag bei 85,1 MBq/mg (2,3 mCi/mg).

Bei ^{125}I -Markierung der Fragmente wurde bei einer spezifischen Aktivität von 65,1 MBq/mg (1,8 mCi/mg) eine Markierungsausbeute von etwa 96% erzielt.

Die unter 3.7 beschriebene Untersuchung zur Bindungsspezifität ergab eine Bindung des ^{213}Bi -d9MAk von 42% an das Zellpellet von d9-MDA-Zellen und von 4% an WT-MDA-Zellen. Von den ^{213}Bi markierten Fab' blieben 27 % im Zellpellet retiniert.

4.2 Charakteristika der verwendeten Tumorzelllinien

Die Zellgrößenanalyse mittels Zellzählgerät ergab bei allen frisch abgelösten Tumorzellen eine Gauß'sche Verteilung zwischen 10,5 und 30 µm mit dem Scheitel bei etwa 20 µm für die HSC-Zellen und bei 16 µm für beide MDA-Zelllinien. Ein zweites Maximum lag bei 5 µm bei den HSC-Zellen und 4 µm bei den MDA-Zellen. Durch mehrmalige fünfminütige Zentrifugation bei 380 g konnten diese Zelltrümmer und bei den HSC-Zellen auch Muzine von den intakten Zellen separiert werden. In die Zellzahlbestimmung gingen nur Partikel der Größe 10,5-30 µm ein.

4.2.1 Verdopplungszeit der Zellen in vitro

Die Verdopplungszeit ist ein wesentliches Charakteristikum einer Zelllinie hinsichtlich der Zellvermehrung im Tier bei der Modellentwicklung. Durch zweimalige Zellzählung (y_i =Zellzahl zur Zeit t_i) in TC-Flaschen mit Netzeinteilung konnte die Verdopplungszeit t_{doppel} der Population errechnet werden.

$$y_1 = e^{k \cdot t_1}$$

$$k = [\ln(y_2) - \ln(y_1)] / (t_2 - t_1)$$

$$t_{\text{doppel}} = [\ln(2 \cdot y_1) / k] - t_1$$

Die Verdopplungszeit liegt für MDA-d9-Zellen demnach bei $24,5 \pm 4,5$ h ($n=5$), für MDA-WT-Zellen bei $30,3 \pm 4,9$ h ($n=5$) und für die HSC-Zellen bei $21,5 \pm 2,6$ h ($n=4$).

4.2.2 Überprüfung der d9-E-Cad-Antigenexpression mittels Immunfluoreszenz

Die Expression von d9-E-Cad auf MDA-d9-, MDA-WT- und HSC-Zellen wurde jeweils vor Inokulation der Zellen in die Maus überprüft. Dazu wurden die Zellen mit d9MAK und Anti-Ratte-CY3 inkubiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Dabei erwiesen sich die MDA-WT-Zellen stets d9-E-Cad-negativ, die MDA-d9- und die HSC-Zellen d9-E-Cad-positiv (Abb. 5).

Die d9-Cad-Expression und die Spezifität der Antikörperbindung ließen sich in einer Mischkultur aus MDA-WT- und MDA-d9-Zellen (1:1) darstellen. Wie Abb. 5 a zeigt,

fluoreszieren nur die MDA-d9-Zellen. MDA-WT-Zellen (Pfeile) dagegen sind nur lichtmikroskopisch erkennbar (Abb. 5 b).

Die HSC-Zellen zeigten auf Grund von d9-E-Cad-Expression ebenfalls Fluoreszenz (Abb. 6). Diese Aufnahme läßt darüber hinaus eindrucksvoll die epitheliale Struktur dieser Zelllinie erkennen.

Die Intensität der Fluoreszenz variierte bei gleichbleibenden Konzentrationen der Primär- und Sekundärantikörper und konstanten Inkubationszeiten lediglich mit dem Alter des Sekundärantikörpers.

Abb. 5: Nachweis von d9-E-Cad-Expression auf MDA-Zellen mittels Immunfluoreszenz

Eine Mischkultur von MDA-d9- und MDA-WT-Zellen (1:1) wurde mit d9MAk und Anti-Ratte-CY3 inkubiert

a) fluoreszenzmikroskopische Aufnahme zur Darstellung d9-E-Cad-positiver Zellen b) Die lichtmikroskopische Aufnahme zeigt sowohl d9-E-Cad-positive Zellen als auch d9-E-Cad-negative Zellen (Pfeile).

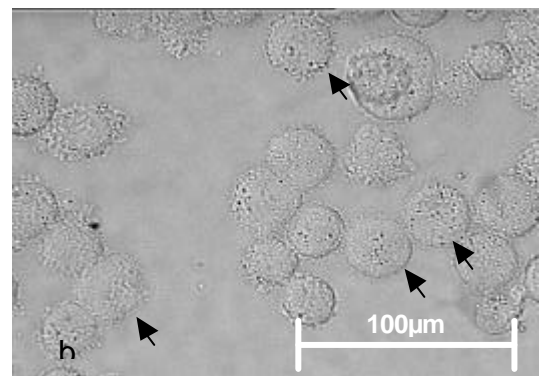
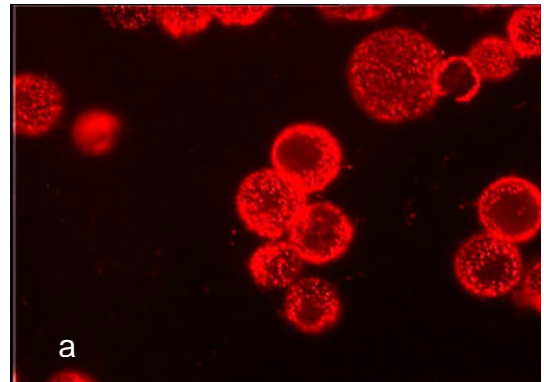
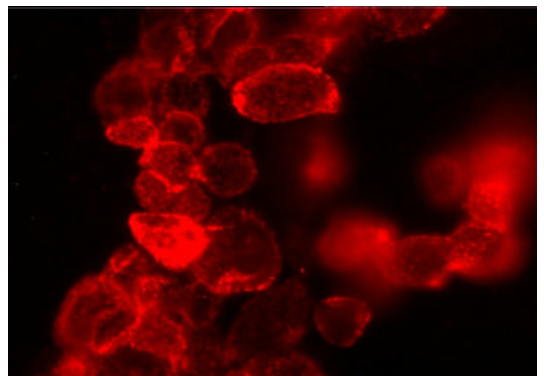


Abb. 6: Nachweis von d9-E-Cad-Expression auf HSC-Zellen mittels Immunfluoreszenz



4.3 Tierexperimente

4.3.1 Manifestierung der Peritonealkarzinose

Die Migration der MDA-Tumorzellen nach i.p. Applikation in das Mesothel mit konsequenter Tumormanifestierung verlief histologisch ähnlich der von HSC-Zellen (vgl. Tab. 4, 5 und Fischer, 2001). Unterschiede zeigten sich makroskopisch besonders bei etablierter Peritonealkarzinose. Bei MDA-Karzinose fanden sich regelmäßig solide, bis stecknadelkopfgroße weißlich-glasige Metastasen am Mesenterium (Abb. 7a dicker Pfeil). Der Lobus quadratus der Leber war häufig mit einer mehr oder weniger dicken, weißen Tumorzellschicht überzogen (Abb. 7a und b dünner Pfeil) und das Zwerchfell von scholligen Metastasen belegt. Im Aszites schwammen solide, elfenbeinfarbene, ovoide Tumorchips oft in Nähe des Milzhilus oder zwischen den Leberlappen. Bei der HSC-Peritonealkarzinose fehlte diese deutliche Abgrenzung zum umgebenden Gewebe. Die Metastasierung erfolgte am ersichtlichsten am und im Peritoneum und war bei der Sektion an der Verdickung des Mesothels und glanzloser Rauigkeit der Serosa zu erkennen. Sowohl im Beckenfett als auch im Pankreas waren glasige,

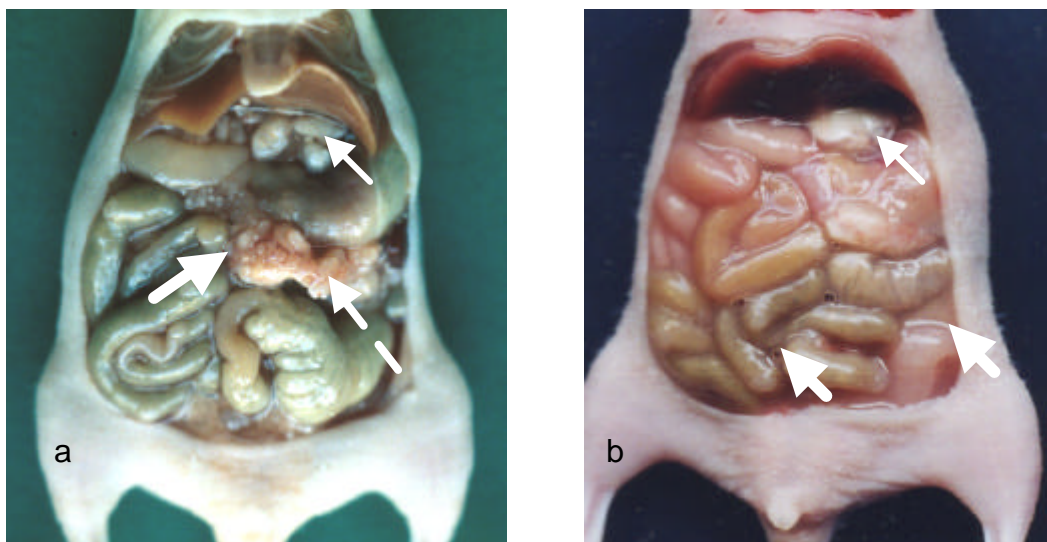


Abb. 7: Peritonealkarzinose bei Nacktmäusen a) etwa 5 Wochen nach MDA-d9-Inokulation mit miliaren Tumorknötchen im Pankreas (gestrichelter Pfeil) und großen Tumorschollen (dünner Pfeil); b) 3 Wochen nach HSC-Zellinokulation: trüber Aszites zwischen den Darmschlingen (dicke Pfeile) und Tumorzellschicht, die den Lobus quadratus der Leber ummantelt (dünner Pfeil)

fettähnliche Tumorknötchen zu finden. Die HSC-Zellen im Aszites agglomerierten häufig zu lockeren grauen Flocken (Abb. 7b).

Tab. 4: Zeitlicher Verlauf der Tumormanifestierung bei Nacktmäusen nach i.p. Injektion von 1×10^7 HSC-Zellen

Tage p. i.	makroskopischer Befund	histologischer Befund
2	kutane Petechien, Kotformung ungenügend, Dünndarminhalt gelblich, Ernährungszustand geringgradig reduziert	peritoneale Metastasen parapankreatisch; Darm histologisch ohne besonderen Befund
4	ohne besonderen Befund	peritoneale Metastasen perihepatisch, mesenterial, diaphragmal, perisplenisch; stärker ausgeprägt als bei 2d; subserös
6	Peritoneum erscheint rauh durch Auflagerung; an Jejunum und dessen Mesenterium einzelne miliare Metastasen	peritoneale Metastasen perihepatisch, mesenterial, diaphragmal, parapankreatisch, perisplenisch; Serosa perforierend; ausgeprägte Peritonealkarzinose
8	mehrere hirsekorngroße, glasige Knötchen im Pankreas; einzelne inselartige Metastasen auf der Facies lateralis der Milz; zahlreiche punktförmige Metastasen auf dem Zwerchfell; Leberhilus mit Tumorzellen belegt	ausgedehnte Peritonealkarzinose; Metastasen diaphragmal, parapankreatisch, mesenterial

Tab. 5: Zeitlicher Verlauf der Tumormanifestierung bei Nacktmäusen nach i.p. Injektion von 1×10^7 MDA-WT-Zellen

Tage p. i.	makroskopischer Befund	histologischer Befund
3	ohne besonderen Befund	kleinste Tumordinfiltrate im Peritoneum; Tumorzellhaufen parapankreatan
6	Peritoneum erscheint samtig durch metastatische Auflagerung; solide Metastase an Leberpforte	winzige Tumorknötchen im peritonealen Mesothel und in der Jejunawand; metastatische Auflagerung an der Leberpforte
9	einzelne weißlich-glasige Zubildungen an Curvatura minor des Magens, \varnothing 2mm	kleine Tumordinfiltrate im Peritoneum und peripankreatan
12	weißliche Knötchen in Pankreas und parapankreatanem Fett	Tumordinfiltrate im Peritoneum
15	geringgradige Aszitesbildung, hellrötlich, trüb; Peritoneum im Thorakalbereich durch Auflagerung matt; Tumorzellüberzug am Lobus quadratus der Leber	kleine subseröse Tumordinfiltrate, größere peritoneale Metastasen, solide Tumorzellcluster am Leberhilus
18	kleine Tumoren an der Leberpforte	Tumorknötchen im Peritoneum, an der Leberpforte und parapankreatan
21	Lobus quadratus von weißer Tumorzellschicht ummantelt; Pankreas von Metastasen durchsetzt; am Milzhilus bohnenförmiger Tumor 0,8 cm lang; wenige frei flotierende ovoide Tumorchips bis stecknadelkopfgroß im Peritonealraum und zwischen den Leberlappen	zahlreiche unterschiedlich große Tumordinfiltrate an der Leber mit Tumornekrosen

4.3.2 Techniken zur In-vivo-Darstellung der Peritonealkarzinose

4.3.2.1 Sonographie

Der Querschnitt einer Maus 33 d nach i.p. Inokulation von MDA-d9 Zellen ist in Abb. 8a gezeigt. Unmittelbar caudal der Leber nahe am Magen (dicker Pfeil) und dorsal der Vena porta sind jeweils komplexe Echostrukturen zu sehen von unregelmäßig aufgebautem Gewebe mit gleichzeitig reflexarmen und -reichen Bezirken (dünner Pfeil). Es handelt sich dabei um Metastasen von MDA-d9-Zellen. Zwei Tage nach der Aufnahme wurde der Aszites auch adspektorisch erkennbar. Bei der anschließenden Sektion lagen 2,4 ml Aszites (vgl. Abb. 9b) und 830 mg Tumorgewebe im Abdomen vor. Die Abb. 8b zeigt ein noch unverändertes Abdomen einer Maus 1 Woche nach MDA-d9-Inokulation.

Abbildung 9 zeigt Longitudinalschnitte des Abdomens von zwei verschiedenen Mäusen. Links ist jeweils der gasgefüllte Magen (dicke Pfeile) als stark echogene Struktur zu erkennen. Flüssigkeit in der Bauchhöhle stellte sich prinzipiell als echoarmes Areal um die aufgeschwemmten Darmschlingen dar. Der Unterschied in der Konsistenz der beiden Asziten war am Kometenschweifartefakt, dem schmutzigen

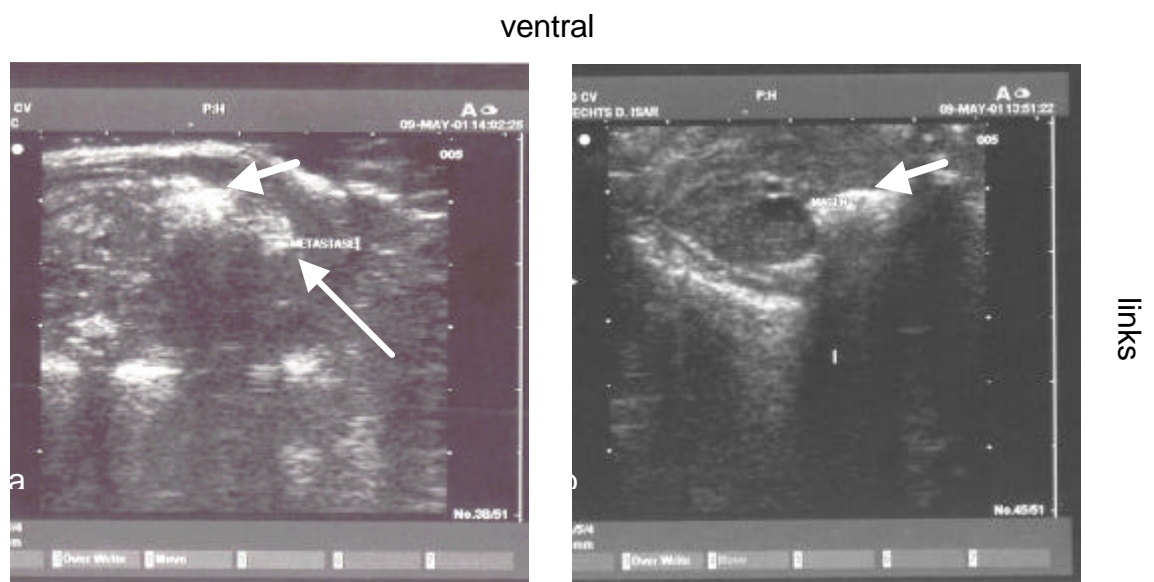


Abb. 8: sonographische Querschnitte von zwei verschiedenen Nacktmäusen knapp caudal des Diaphragmas a) mit MDA-d9-Peritonealkarzinose, b) noch unverändertes Abdomen einer Maus 1 Woche nach MDA-d9-Zellinokulation

ventral

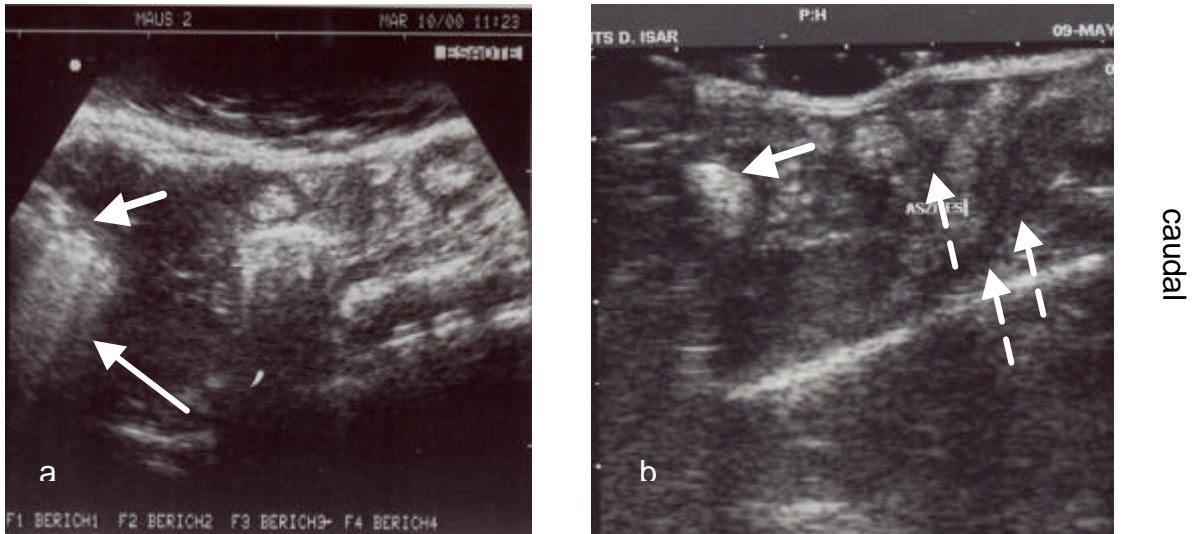


Abb. 9: sonographische Longitudinalschnitte des Abdomens von Nacktmäusen: a) zellreicher, b) zellarmer Aszites

Schallschatten dorsal des Magens in Abb. 9a zu erkennen (dünner Pfeil). Anders als mit diesen korpuskulären Elementen zeichnete sich der zellarme Aszites in Abb. 9b als homogener, dunkler Saum um die Darmschlingen ab (gestrichelte Pfeile). Es handelt sich dabei um dieselbe Maus wie in Abb. 8a. Der Aszites war zum Zeitpunkt der Sonographie adspektorisch noch nicht zu diagnostizieren.

Die Ultraschalldiagnostik diene vor allem dem Nachweis von Aszites. Mikrometastasen im Abdominalraum von Mäusen im Ultraschallbild zu erkennen, erwies sich als schwierig, während in Flüssigkeit schwimmende Darmschlingen und Zellen im Aszites als schwebende Echokomplexe schon nach kurzer Einarbeitung diagnostiziert werden konnten.

4.3.2.2 Kernspintomographie

Ziele der kernspintomographischen Aufnahmen in diesem Tiermodell waren die optische Darstellung der Peritonealkarzinose in vivo und die Dokumentation einer möglichen Regression der Tumorextension nach ^{213}Bi -Immuntherapie.

Ähnlich der menschlichen Peritonealkarzinose manifestierten sich in Mäusen nach Tumorzellinokulation dicke Tumorschollen an der Facies abdominalis des Diaphragmas. Im T_2 -gewichteten Kernspintomogramm (Abb. 10) rechts wurde dies

sichtbar durch Abhebung der Leber vom Zwerchfell nach kaudal (dicke Pfeile). Die Dislokation der Jejunalschlingen war zum einen bedingt durch metastatische Knötchen und Verwachsungen im Mesenterium (dünner Pfeil), zum anderen führte auch die umfangreiche Flüssigkeitsansammlung im Abdomen, die sich in der T₂-Wichtung weiß darstellt, zu einer Aufschwemmung der Darmschlingen. Das Pankreas war durch knotige Metastaseninfiltration erheblich umfangsvermehrt (gestrichelter Pfeil). Die Peritonealkarzinose im engeren Sinn zeigte sich rechts unmittelbar kaudal des Rippenbogens in einer flächigen, protuberanten Verdickung der peritonealen Serosa (gepunkteter Pfeil).

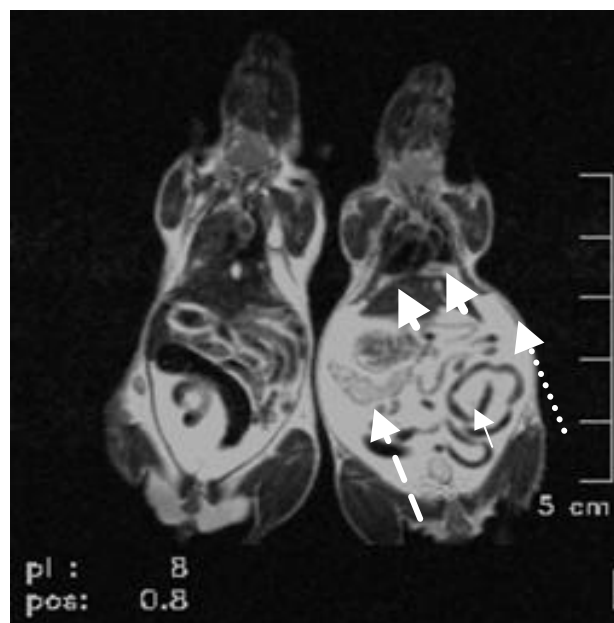


Abb. 10: Kernspintomogramm (T₂-gewichtet) einer gesunden Nacktmaus (links) und einer Nacktmaus 6 Wochen nach MDA-d9-Zellinokulation (rechts) mit ausgeprägter Peritonealkarzinose. Die Pfeile weisen auf Symptome der Peritonealkarzinose (s. Text).

Hämoglobinfreier und hämoglobinhaltiger Aszites unterscheiden sich deutlich im Kernspintomogramm wie in Abb. 11 ersichtlich. Eine Erklärung dafür könnten mögliche Interaktionen von Fe²⁺ im Hämoglobin und seinen eisenhaltigen Abbauprodukten mit Wasserstoff sein. Die paramagnetischen Eigenschaften von Deoxyhämoglobin werden im BOLD-Effekt (blood oxygenation level dependent) als körpereigenes Kontrastmittel genutzt [Ogawa et al., 1993]. Bei der Bildgebung im Peritonealkarzinosemodell wird dadurch jedoch die Ansprechbarkeit der Organe und Mikrometastasen erschwert.

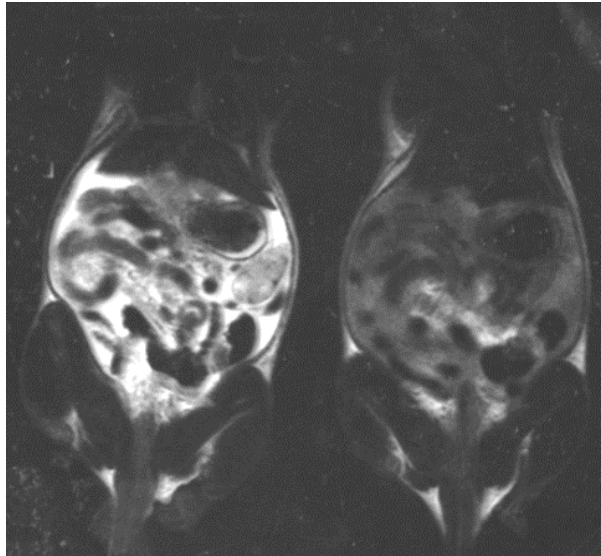


Abb. 11: Kernspintomogramm von Nacktmäusen mit Aszites nach Tumorzellinokulation: links blutfreier Aszites, rechts hämoglobinhaltiger Aszites

Mittels Kernspintomogramm ließ sich die Peritonealkarzinose erstmals 26 d nach Tumorzellinokulation (10^7 MDA-d9-Zellen) nachweisen (Abb. 12a). Bei der linken Maus in Abb. 12a und 12b ist die Leber geringfügig vom Diaphragma disloziert. Bei der rechten Maus ist diese Dislokation deutlich ausgeprägt begleitet von einer stärkeren

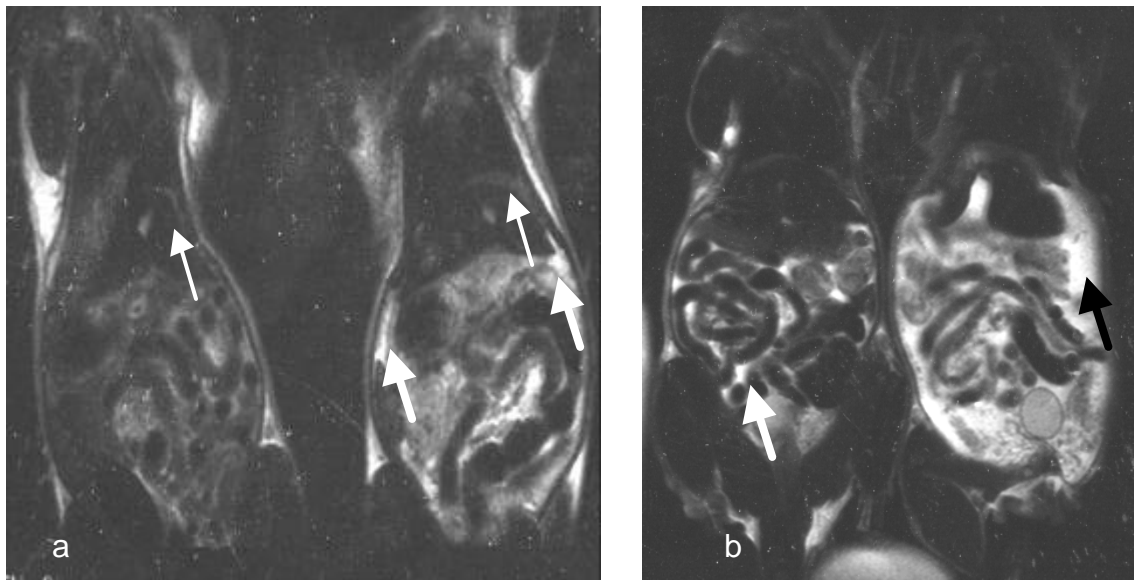


Abb. 12: Kernspintomogramme des Abdomens von Nacktmäusen 26 d (Teilbild a) und 33 d (Teilbild b) nach MDA-d9-Inokulation; a) Dislokation der Leber vom Zwerchfell durch Tumorzellschicht (dünne Pfeile); Aszites bei der rechten Maus (dicke Pfeile) b) Aszites bei beiden Mäusen (dicke Pfeile)

Aszitesansammlung ventral. Beiden Tieren der Abb. 12a wurden am Tag 30 nach MDA-d9-Inokulation 7,4 MBq ^{213}Bi -d9MAK i.p. appliziert. 3 Tage später wurde erneut eine Kernspintomographie durchgeführt (Abb. 12b). Innerhalb dieser Zeitspanne konnte in dem Stadium keine Reduktion der Karzinose nachgewiesen werden. Auch bei der linken Maus hatte sich Aszites gebildet. Bei den Sektionen am Tag 35 (rechte Maus) bzw. am Tag 40 (linke Maus) nach Tumorzellinokulation bestätigten sich die kernspintomographischen Befunde.

4.3.2.3 In-vivo-Fluoreszenzanalyse „Optical Imaging“

Der Vergleich von Abb. 13a und 13b zeigt die Ausbreitung der mit Fluoreszenzfarbstoff markierten HSC-Zellen im Abdominalraum 1 bzw. 15 min nach Inokulation. In der ersten Minute nach Zellinokulation stellen sich zwei Zellsuspensionspools dar, die durch einen Spülkanal miteinander verbunden sind. Nach 15 min ist die Zellsuspension homogener im Abdominalraum verteilt mit erkennbarer cranialer Begrenzung durch das Zwerchfell. Zu beiden Zeitpunkten war das Fluoreszenzsignal an der Injektionsstelle am intensivsten (Pfeile).

Abb. 14 zeigt die Verteilung der mit Vybrant Did-dye[®] markierten HSC-Zellen 10 d nach Inokulation in derselben Nacktmaus wie in Abb. 13 nach Eröffnen des

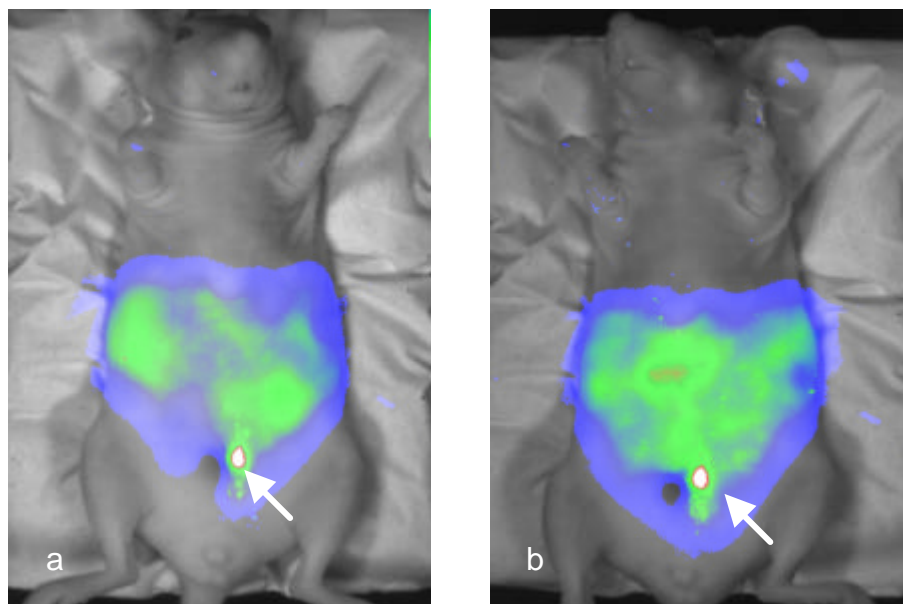


Abb. 13: Optical Imaging einer narkotisierten Nacktmaus a) 1 min und b) 15 min nach i.p. Inokulation von HSC-Zellen, die mit Vybrant Did-dye[®] in vitro markiert worden waren. Die Pfeile kennzeichnen die Inokulationsstelle

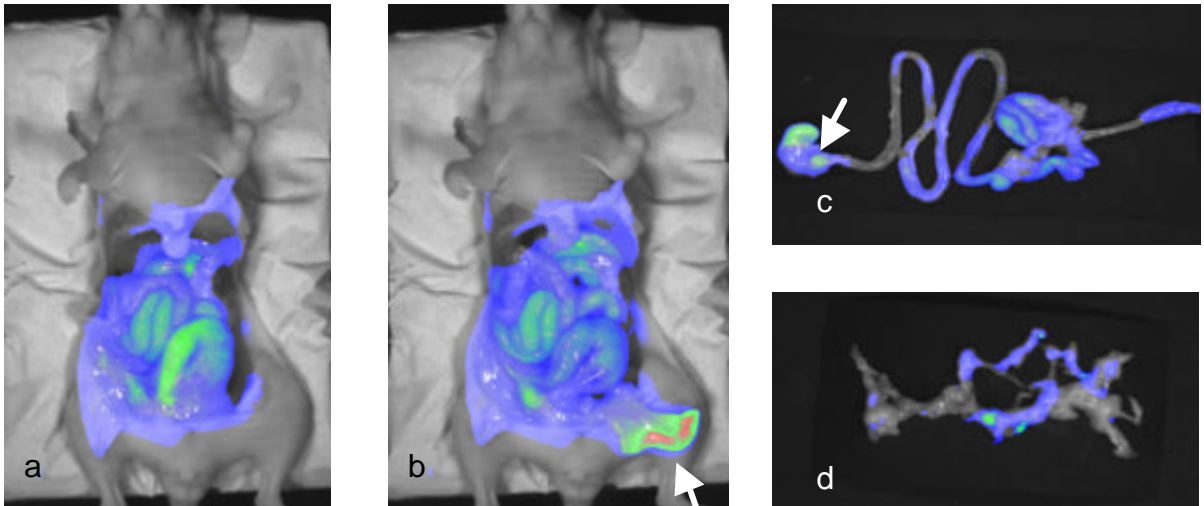


Abb. 14: Optical Imaging 10 d nach i.p. Inokulation von mit Vybrant Did-dye[®] markierten HSC-Zellen; Situs eines Nacktmaus mit entfernter Bauchdecke a) Bursa omantalis noch den Blinddarm bedeckend, b) Bursa omentalis (Pfeil) auf linken Oberschenkel zurückgelegt; c) Gastrointestinaltrakt mit Fluoreszenz im Magen (Pfeil) d) Pankreas mit Infiltration fluoreszenzmarkierter HSC-Zellen

Abdominalraums. Die intensivste Fluoreszenz konnte über dem Blinddarm angeregt werden (Abb. 14a). Beim Abheben der Bursa omentalis vom Darmkonvolut stellte sich heraus, dass der Fluoreszenzfarbstoff im Großen Netz retiniert wurde. Nicht geklärt wurde, ob intakte HSC-Zellen mit dem Vybrant Did-dye[®]-Fluoreszenzfarbstoff im Zytoplasma in die Bursa omentalis migriert waren oder ob der Farbstoff aus den HSC-Zellen diffundiert war. Der Gastrointestinaltrakt in Abb. 14c zeigt eine schwache Fluoreszenz im Magen, die sich als Eigenfluoreszenz des Tierfutters herausstellte. Die Fluoreszenz im Pankreas zeichnet den Manifestationsschwerpunkt der Peritonealkarzinose nach i.p. Tumorzellinokulation nach und ist daher mit hoher Wahrscheinlichkeit auf tumoröse Infiltrierung zurückzuführen.

4.3.3 Verteilung der Radioimmunkonjugate im murinen Organismus

Bei der Entwicklung eines neuen Therapeutikums ist die Anreicherung und Retention der Wirksubstanz in den Zielorganen und die Verteilung im Organismus von großer Bedeutung sowohl für den Therapieerfolg als auch für das Ausmaß der Nebenwirkungen.

4.3.3.3 Szintigraphie

Die Verteilung ^{111}In -markierter RIK wurde in vier Mäusen in Abständen von 2 h, 24 h und 52 h nach einmaliger Applikation von 740 kBq (20 μCi) ^{111}In -d9MAk szintigraphisch dargestellt. Dadurch wurde eine Analyse der Kinetik möglich in Abhängigkeit von

1. Absenz oder Existenz von Tumoren;
2. Absenz oder Existenz der E-Cadherin-Mutation bei etablierter MDA-Peritonealkarzinose;
3. Absenz oder Existenz von Aszites bei MDA-d9-Peritonealkarzinose

Die Zugehörigkeit zu den interessierenden Karzinostypen bzw. -stadien aller vier Tiere wurde unmittelbar nach der 3. Szintigraphie durch Sektion verifiziert.

Zwei Stunden nach i.p. Applikation zeigt sich die Verteilung des ^{111}In -d9MAk in allen Tieren nahezu unabhängig von Karzinosestadium und -typ (Abb. 15a). Lediglich Maus II (MDA-d9-Zellen mit Aszites) zeichnete sich durch größeres Abdominalvolumen und durch erkennbar niedrigere Aktivitätskonzentration im Blut aus. Dadurch ließen sich weder die blutreichen thorakalen Organe noch die Kontur der Maus im Szintigramm darstellen. Dagegen ließ sich bei Tier IV (gesund) und bei Maus I (MDA-WT) der Verlauf der Arteriae carotides optisch verfolgen.

Bereits 24 h nach Injektion des ^{111}In -d9MAk war ein Verteilungsstatus erreicht, der auch nach 52 h nahezu unverändert war. Bei den Mäusen I und IV stellten sich die blutreichen thorakalen Organe gleichermaßen intensiv dar. Der Umriss beider Tiere ist gut zu sehen. Bei Maus III reicherte sich ebenfalls im Blut viel ^{111}In -d9MAk an. Schwächer war jedoch hier die Aktivität in peripheren Gefäßen. Bei Maus II retinierte Aszites den Großteil der i.p. applizierten Aktivität über den gesamten Untersuchungszeitraum, so dass ins Blut nur wenig RIK übertrat. Die blutreichen thorakal gelegenen Organe wurden daher schwächer szintigraphisch dargestellt als bei den anderen drei Tieren, ebenso wie die Gesamtkontur dieser Maus.

Ergebnisse

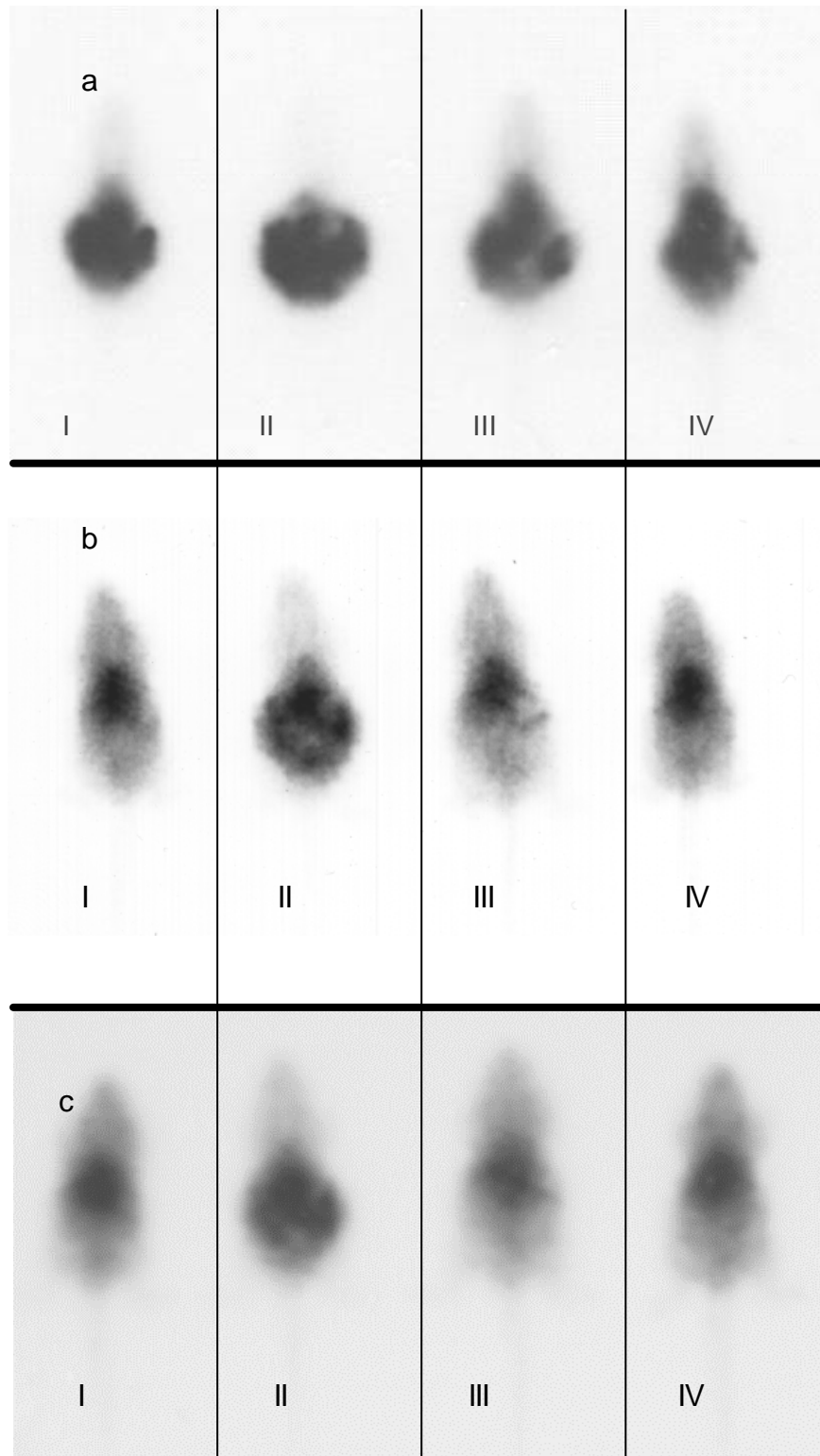


Abb. 15: Szintigramme 2 h (a), 24 h (b) und 52 h (c) nach i.p. Injektion des ^{111}In -d9MAk in Mäuse mit MDA-WT-Peritonealkarzinose ohne Aszites (I), mit MDA-d9-Peritonealkarzinose mit Aszites (II), mit MDA-d9-Peritonealkarzinose ohne Aszites (III) und eine unbehandelte Maus (IV); Ansicht von ventral

4.3.3.2 Biodistribution und Biokinetik

Um die Verteilung der RIK in Mäusen mit Peritonealkarzinose zu untersuchen, wurden den Tieren 1×10^7 HSC-, MDA-d9- oder MDA-WT-Zellen i.p. inokuliert. Nach adspektorisch erkennbarer Manifestierung von Peritonealkarzinose oder Aszites wurde den Tieren RIK i.p. oder i.v. appliziert. In der Regel 1 h oder 3 h später wurden die Mäuse getötet, die Organe entnommen und die Radioaktivität bestimmt. Auch in tumorfreien Mäusen wurde die Biodistribution untersucht.

Die Verteilung des radionuklidmarkierten d9MAk (6H8) in tumorfreien Mäusen ist bereits beschrieben worden. Demnach wird die Verteilung nicht wesentlich von dem eingesetzten Radionuklid (^{213}Bi oder ^{125}I) oder von der Chelatierung des Ak beeinflusst. Unterschiede in der Biodistribution ergaben sich jedoch durch die Affinität von freiem ^{213}Bi zu den Nieren [Fischer, 2001]. Da in der vorliegenden Studie bei dem Markierungsprozeß von ^{213}Bi durchwegs Markierungsausbeuten über 95% erreicht wurden (s. 4.1), spielte freies ^{213}Bi hier eine untergeordnete Rolle. Desweiteren werden RIK mit ^{125}I enzymatisch dehalogeniert. Freies ^{125}I wird jedoch mit hoher Affinität in der Schilddrüse angereichert oder über die Nieren ausgeschieden, so dass der Großteil nur kurz im Blutkreislauf vorhanden ist. Deshalb wurden in den folgenden Abbildungen zum Teil Biodistributionsdaten von Tieren, die ^{213}Bi -markierte MAk für Biodistributionsstudien erhalten hatten, mit solchen, bei denen ^{125}I an den MAk gekoppelt war, in einer Gruppe dargestellt.

Die Anreicherung des ^{213}Bi -d9MAk war in den Tumoren, die d9-E-Cad exprimieren, am höchsten. Stark abhängig war die Bindung an den Tumor aber auch von der Anzahl von Tumorzellen im Aszites: frei flotierende MDA-d9-Zellen in der Bauchhöhle binden einen erheblichen Anteil des RIK. So fanden sich nach Zentrifugation des MDA-d9-zellhaltigen Aszites 21,4 % der Aktivität im Zellpellet, während der zellfreie Überstand lediglich 9,9 % ID/g aufwies. Bei Fehlen der Spezifität (Abb. 16 „MDA-WT mit Aszites“) wird gleichfalls RIK im Aszites retiniert. In diesem Fall ist jedoch im Überstand (46% ID/g) ein fast doppelt so hoher Prozent-Satz als im Pellet (26% ID/g) zu finden. Die Tumoranreicherung in aszitesfreien Mäusen mit MDA-d9-Tumoren betrug 17% ID/g und somit den deutlich höchsten Wert von allen untersuchten Geweben. Trotz der Retention eines sehr hohen Anteils von 36 % ID/g Aszites im Abdomen, weisen die Tiere mit MDA-WT-Peritonealkarzinose eine vergleichsweise hohe Konzentration des

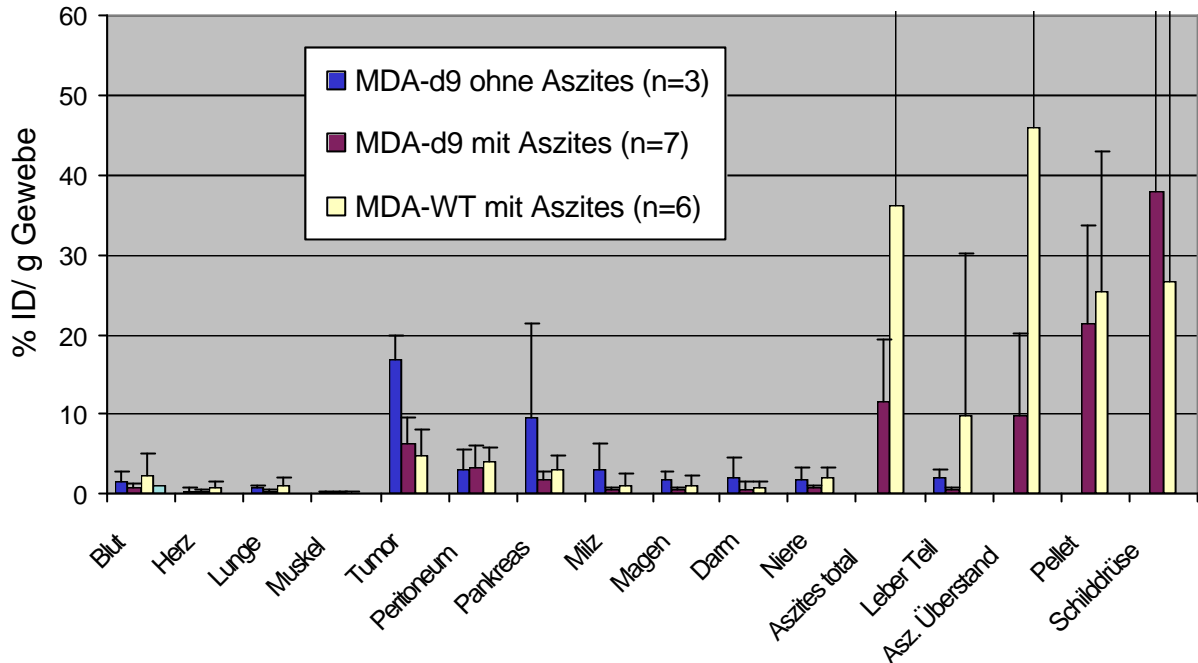


Abb. 16: Verteilung von ^{213}Bi - oder ^{125}I -markiertem d9MAK 1 h nach i.p. Applikation in Mäusen mit Peritonealkarzinose aus MDA-d9-Zellen mit oder ohne Aszites bzw. aus MDA-WT-Zellen mit Aszites

RIK in Blut (2,33 % ID/g) und Nieren (1,89 % ID/g) auf. Die Vergleichswerte bei MDA-d9-Karzinose betragen 0,65 % ID/g bzw. 0,70 % ID/g. Bei den Werten der Aktivität im Aszites drängt sich auf, einen Zusammenhang der hohen SD mit der Variationsbreite der Zellzahl im Aszites (s. 4.4.2) zu sehen.

Die Ähnlichkeit des Verteilungsmusters zwischen Milz, Magen und Darm, sowie zwischen Lunge und Herz (Abb. 16) zeichnete sich in allen Biodistributionsstudien ab, so dass in allen folgenden Darstellungen nur noch die Anreicherung in einem Organ aus diesen beiden Gruppen gezeigt wird. Die Tumorzellen zeigten makroskopisch zu Peritoneum und Pankreas die größte Affinität. Entsprechend hing die Aktivitätsanreicherung in diesen Organen in hohem Maße von deren tumoröser Infiltrierung ab. Offensichtlich wurde dies auch in relativ hoher SD. Auch hier werden zur besseren Übersichtlichkeit im Folgenden nur noch die Werte des Peritoneums abgebildet.

Im HSC-45-Modell wurde die Spezifität der Bindung an mutiertes E-Cadherin mit d9MAK und unspezifischem MAK gleicher Immunglobulinklasse untersucht (Abb. 17).

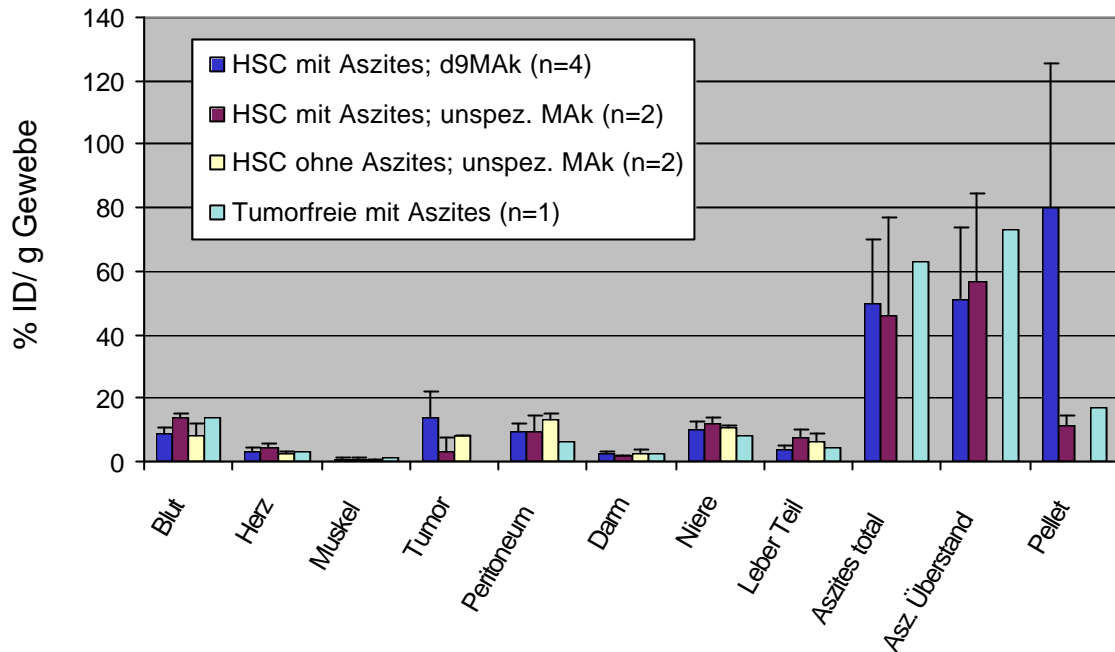


Abb. 17: Verteilung von ^{213}Bi markiertem d9MAk und unspez. Ak 3 h nach i.p. Injektion in Mäusen mit Peritonealkarzinose aus HSC-Zellen mit oder ohne Aszites und einer Maus mit Aszites ohne Tumor

Auch hier zeigte sich bei Einsatz des d9MAk (6H8) eine deutlich höhere Anreicherung im Tumor als bei unspezifischem MAk. Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit unspezifischem MAk (7H1) war beim 6H8 sowohl der Quotient aus Pellet / Überstand als auch der aus Tumor / Blut = 1. Die Retention des RIK durch den Aszites war auch bei der tumorzellfreien Maus beträchtlich und spiegelte sich selbst beim unspezifischen RIK im Tumor wider.

Der Wert des Tumor/Blut-Quotienten unterschied sich sehr stark nach i.p. bzw. i.v. Injektion des RIK (Abb. 18): 1 h nach i.p. Injektion betrug er 1,8, nach i.v. Applikation 0,2. Die im letzten Fall sehr hohen Konzentrationen des RIK im Blut - beim intakten Ak 23,7 % ID/g, bei Fab' 13,8 % ID/g - spiegelten sich in den Werten der stark durchbluteten Organe wie Herz, Muskel und Leber wider. Die leichte Zugänglichkeit zu den Antigenen der Tumorzellen bei lokoregionaler Applikation resultierte nach 1h in etwa doppelt so hoher Anreicherung des Radionuklids als nach i.v. Applikation in Tumor und tumorös infiltrierter Peritonealserosa sowohl bei intaktem d9MAk als auch bei Fab'.

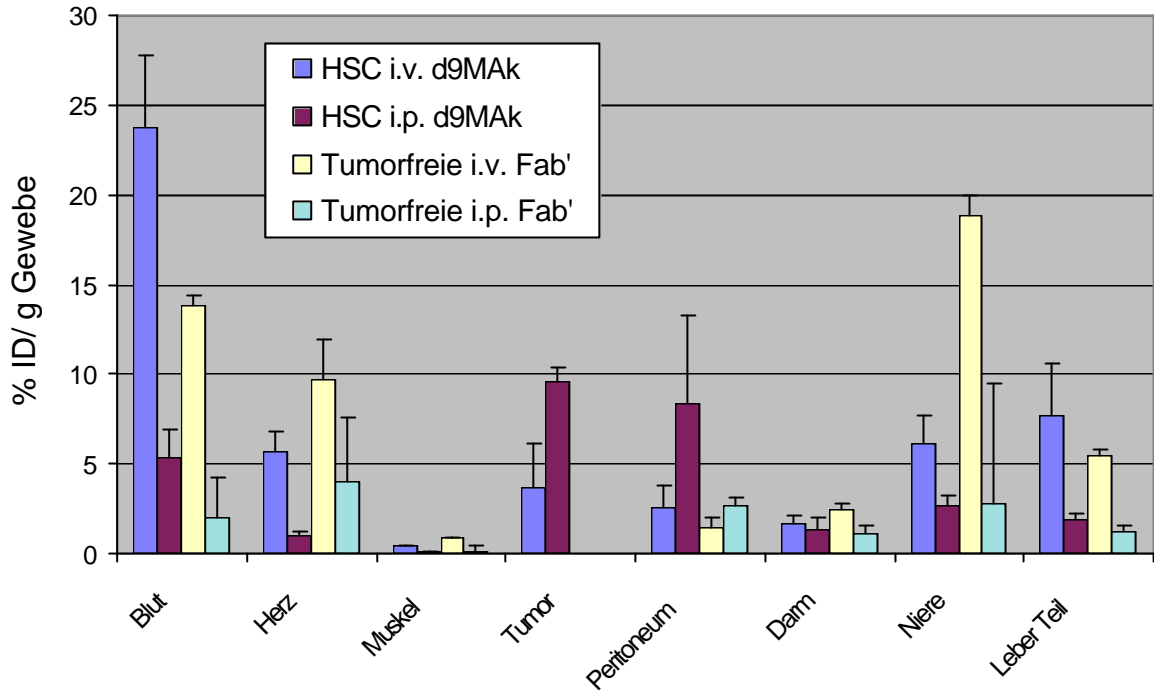


Abb. 18: Verteilung von ^{213}Bi - oder ^{125}I -markiertem d9MAk sowie von ^{125}I -markierten Fab' (Fragmenten des 6H8) 1 h nach i.p. oder i.v. Injektion in Mäusen mit Peritonealkarzinose aus HSC-Zellen ohne Aszites; n= 3

Eine Erklärung für den auffallend hohen Wert von 18,9 % ID/g Nieren für Fab' nach i.v. Injektion kann eine raschere Ausscheidung der Fab' über die Nieren im Kontrast zu der intakter Ak bieten mit anschließender Reabsorption durch die Tubusepithelzellen und Retinierung der Fragmente in den Nieren. Durch bislang unbefriedigende Chelatierungsergebnisse von Fab' (s. 4.1) lag nach deren Injektion als Radionuklid-Carrier aber auch deutlich mehr freies ^{213}Bi bzw. ^{125}I im Injektionsbolus vor. Dies hätte jedoch auch nach i.p. Injektion der Fab' Auffälligkeiten in der RIK-Verteilung nach sich ziehen müssen, so dass vermutlich der Effekt der Reabsorption überwiegt, die nach i.v. Applikation des RIK zügiger abläuft als nach i.p. Applikation. Der Unterschied der Nierenanreicherungswerte zwischen tumorfreien (Abb. 18) und tumortragenden Mäusen (Abb. 19) nach Applikation der radionuklidmarkierten Fragmente könnte damit zusammenhängen, dass bei tumortragenden Mäusen ohne Aszites die Blutkonzentrationen des RIK mit 4,17 %ID/g mehr als doppelt so hoch sind als bei tumorfreien Tieren mit 2,02 %ID/g.

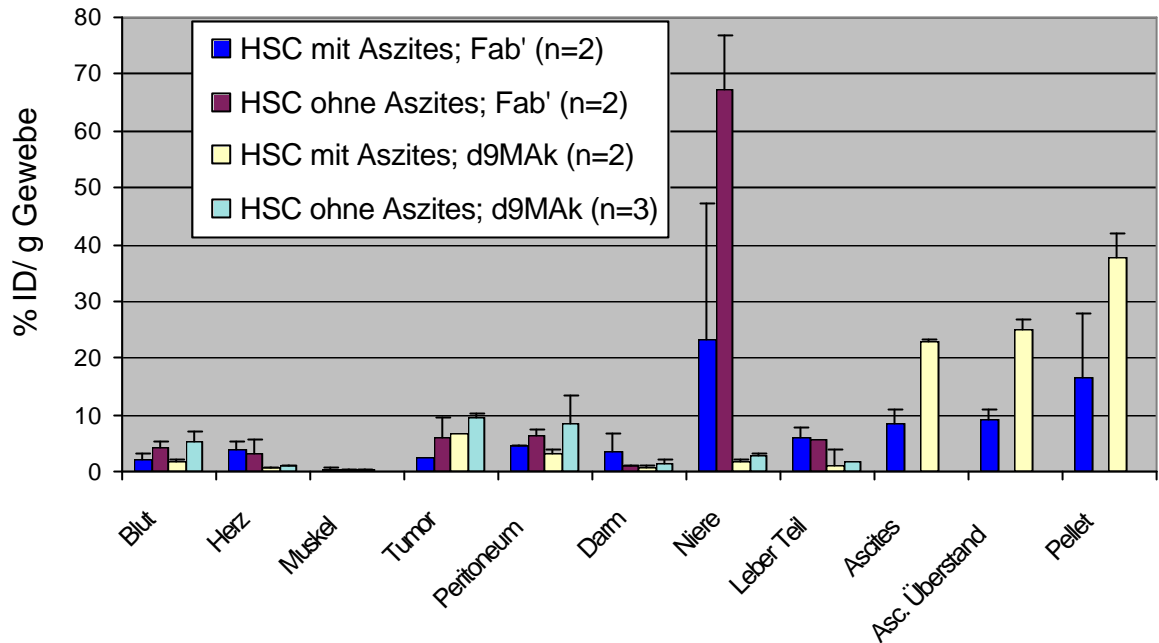


Abb. 19: Verteilung von ^{213}Bi - oder ^{125}I -markiertem d9MAK (6H8) sowie Fab' (Fragmenten des 6H8) 1h nach i.p. Injektion in Mäusen mit Peritonealkarzinose aus HSC-Zellen mit oder ohne Aszites

Wie Tab. 6 zeigt, nimmt im HSC-Modell nach i.p. Injektion die Aktivitätskonzentration in den Organen umso stärker zu je länger sich das RIK im Organismus befindet. Die stärkste Zunahme bis 3 h p.i. ist dabei in den Nieren zu sehen. In diesem Organ setzt sich jedoch der Anstieg der Radioaktivität nicht wie in Muskel, Darm und Leber bis 54 h nach Injektion fort. Eine Erklärung dafür ist, dass für die Werte in der rechten Spalte ^{111}In zur Markierung des d9MAK benutzt wurde. Obwohl ^{111}In wie ^{213}Bi zu den Radiometallen zählt, scheinen sich neben der Stabilität auch die Mechanismen der Ausscheidung zu unterscheiden. Auch im Pankreas nimmt die Anreicherung innerhalb der ersten 3 h zu, allerdings hängt sie hier wie im Peritoneum von dem Grad der tumorösen Infiltrierung ab. Die Aktivitätskonzentration im Ascites hängt von der Zahl der MAk bindender, flotierender Tumorzellen und natürlich auch von seinem Gesamtvolumen ab.

Tab. 6: Verteilung von ^{213}Bi - oder ^{111}In -markiertem d9MAk (6H8) 1 h, 3 h und 54 h nach i.p. Applikation in Mäusen mit Peritonealkarzinose (PK) aus HSC- oder MDA-d9-Zellen mit Aszites

Gewebe	% ID/g Gewebe MW \pm SD		
	1h nach ^{213}Bi -d9MAk bei HSC-PK (n=2)	3 h nach ^{213}Bi -d9MAk bei HSC-PK (n=4)	54 h nach ^{111}In -d9MAk bei MDA-d9-PK (n=1)
Blut	1,81 \pm 0,20	9,01 \pm 1,99	7,63
Herz	0,73 \pm 0,10	3,07 \pm 1,40	2,40
Muskel	0,18 \pm 0,16	0,87 \pm 0,44	1,03
Peritoneum	3,11 \pm 0,92	9,59 \pm 2,45	3,71
Pankreas	2,49 \pm 0,66	10,89 \pm 4,26	3,29
Magen	0,74 \pm 0,06	2,90 \pm 1,35	1,79
Darm	0,87 \pm 0,06	2,43 \pm 0,80	3,50
Niere	1,64 \pm 0,38	10,36 \pm 2,24	3,82
Leber	0,92 \pm 2,86	3,89 \pm 1,19	4,37
Aszites total	23,05 \pm 0,05	49,82 \pm 20,47	20,73
Aszitesüberstand	24,87 \pm 1,92	51,25 \pm 22,52	9,90
Asziteszellpellet	37,81 \pm 4,03	80,29 \pm 45,26	54,70
Tumor	6,57 \pm 0,12	13,58 \pm 8,79	24,29

Auffällig ist die starke Anreicherung des RIK im Blut 3 h p.i. bei Mäusen mit HSC-Tumoren. Schon 1 h nach i.p.-Applikation zeigt sich bei HSC-Peritonealkarzinose ohne Aszites 5,39 %ID/g Blut (Abb. 18). Demgegenüber stehen Werte von 1,65 %ID/g Blut

unter gleichen Bedingungen bei MDA-d9-Peritonealkarzinose (Abb. 16) und 2,02 %ID/g Blut bei tumorfreien Mäusen nach Fab'-Applikation (Abb. 18). Aufgrund der geringeren Molekülgröße und besseren Diffusion würde man jedoch bei der Bioverteilung von Fragmenten höhere Werte im Blut erwarten als bei intaktem IgG. Es stellte sich die Frage, ob präparationsbedingte Kontamination die Ursache für die hohen Werte des Blutes von Mäusen mit HSC-Peritonealkarzinose sein könnte. Um dies zu klären, wurden bei 8 Mäusen im Zuge einer Biodistribution 1 h p.i. Blut sowohl in Agonie durch Punktion der Vena jugularis entnommen als auch auf die herkömmliche Methode aus dem eröffneten Thorax nach Anschneiden der Arteria abdominalis. Das Blut aus der Vena jugularis wies eine Aktivitätskonzentration von 3,97 (\pm 2,16) %ID/g, das Blut aus dem eröffneten Thorax 4,27(\pm 3,01)%ID/g auf. Der geringe Unterschied schließt die Methode der Präparation als Ursache für die relativ hohen Aktivitätskonzentrationen im Blut nach i.p. Applikation bei etablierter HSC-Peritonealkarzinose aus. Möglicherweise erklärt sich dieses Phänomen aber mit einer erhöhte Permeabilität der Peritonealserosa, welche durch das von den HSC-Zellen sezernierte Lysozym gereizt worden sein könnte.

4.3.4 Therapeutische Effizienz

Erste orientierende Therapieversuche mit ^{213}Bi -d9MAk sind bereits in einem MDA-Modell von Fischer beschrieben [2001]. Zur Ermittlung des optimalen Therapiezeitpunktes nach Tumorzellinokulation und der optimalen Aktivität wurden vergleichende Versuche für das HSC-Modell und für die MDA-Zellen mit Tierzahlen durchgeführt, die eine statistisch verlässliche Aussage erlauben.

4.3.4.1 Überlebenszeiten nach HSC-Inokulation

Weiblichen, 6 Wochen alten Nacktmäusen wurden 1×10^7 HSC-Zellen i.p. inokuliert. Nach 1 d oder 8 d wurden den Tieren 1,85 MBq (50 μCi), 7,4 MBq (200 μCi) oder 22,2 MBq (600 μCi) von ^{213}Bi -d9MAk oder von ^{213}Bi -markiertem unspezifischen MAk i.p. appliziert. Endpunkte der Beobachtungszeit waren adspektorisch erkennbarer Aszites, Tumorkachexie oder das Allgemeinbefinden beeinträchtigende Tumorgröße. Die Tiere wurden dann getötet und obduziert.

Sämtliche Therapiegruppen mit d9MAk unterscheiden sich im Überleben hochsignifikant ($p < 0,001$) von den untherapierten Kontrollen. Therapie mit ^{213}Bi -d9MAk 1d nach Tumorzellinokulation bewirkt eine etwa 10-fache Lebensverlängerung im Vergleich zu den Kontrollen (Tab. 7a). Selbst im ungünstigsten Fall, einer Therapie mit einer hohen Aktivität von 22,2 MBq 8 d nach Tumorzellinokulation, lebten die Tiere noch 4 mal länger als die Kontrollen.

Die i.p. Applikation von unspezifischem RIK führte nur bei Applikation 24 h nach Zellinokulation zu hochsignifikantem Unterschied zur Kontrollgruppe (Tab. 7b). Bei therapeutischem Einsatz des unspezifischen RIK 8 d nach i.p. Tumorzellinokulation war die Überlebensverlängerung nach Injektion von 22,2 MBq signifikant ($p = 0,011$), bei 7,4 MBq nicht signifikant ($p = 0,079$) im Vergleich zur Kontrolle.

Bei Therapie 24 h nach Tumorzellinokulation hatten Tiere, die nur 7,4 MBq des RIK erhalten hatten – gleichgültig ob d9MAk oder unspezifischen Ak – eine höhere Lebenserwartung als solche, die mit 22,2 MBq des RIK therapiert wurden. Die Wahrscheinlichkeit, dass sich die Kurven nur zufällig unterscheiden, war beim Vergleich zwischen 7,4 MBq ^{213}Bi -d9MAk und 22,2 MBq ^{213}Bi -markiertem unspezifischen Ak $< 2\%$, und der Unterschied somit signifikant. Alle anderen

Therapiegruppen unterschieden sich bei RIK-Applikation nach 24 h nicht signifikant voneinander.

Schon im Kaplan-Meier-Diagramm Abb. 20 erkennbar schlechter fiel die Lebenserwartung der Mäuse bei Therapie 8 d nach Zellinokulation aus. Hier stellte sich eine Applikation von 7,4 MBq oder 22,2 MBq d9MAk gegenüber dem unspezifischen RIK - unabhängig von der Aktivität - als überlegen heraus. Die Überlebenszeit der Tiere nach Applikation der unspezifischen RIK beider Aktivitäten im Vergleich zu den entsprechenden Werten der Therapie nach 24 h war dabei hochsignifikant kürzer mit $p=0,003$ nach 7,4 MBq und $p=0,008$ nach 22,2 MBq. Bei der Therapie mit d9MAk fällt ein größeres Intervall zur Tumorzellinokulation nicht signifikant ins Gewicht.

Interessant ist daher die Gegenüberstellung von Therapiegruppenpaaren, die sich nur in der Spezifität des MAk unterscheiden, also mit je gleichen Aktivitäten und Zeitintervallen zwischen Zellinokulation und Therapie: während bei 24 h-Intervallen in diesem Vergleich kein signifikanter Unterschied trotz größerer Tiergruppen zu ermitteln war, unterschieden sich die Paare bei 8 d-Abstand und 22,2 MBq signifikant ($p=0,046$), bei 7,4 MBq hochsignifikant ($p=0,005$).

In beiden Tiergruppen lag die mittlere Überlebenszeit nach Injektion von 1,85 MBq des ^{213}Bi -d9MAk bzw. unspezifischen MAk >214 , wobei bei spezifischer Therapie noch 7 von 9 Tieren am Tag 238 nach Zellinokulation ohne Krankheitsanzeichen am Leben waren, bei unspezifischer Therapie 8 von 9 Tieren am Tag 233 nach Zellinokulation.

Tab. 7: Mittlere Überlebenszeiten in Tagen (d) nach Therapie mit ^{213}Bi -Immunkonjugat 1 d und 8 d nach Inokulation von HSC-Zellen im Vergleich zu untherapierten Kontrollen; MW \pm SD; [davon zum Zeitpunkt der Drucklegung noch lebend]

a) d9MAk (6H8)

?t zwischen Tumorzellinokulation und Therapie	mittlere Überlebenszeit nach i.p. Applikation von ^{213}Bi -d9MAk mit der Aktivität von		
	1,85 MBq (50 μCi)	7,4 MBq (200 μCi)	22,2 MBq (600 μCi)
Kontrolle	24 d \pm 12,75 (n = 40); [0]		
1 d	=214 d \pm 50,97 (n = 9); [7]	=232 d \pm 106,87 (n = 15); [2]	173 d \pm 128,23 (n = 11); [0]
8 d	nicht bestimmt	=187 d \pm 213,85 (n = 9); [2]	=104 d \pm 75,61 (n = 9); [2]

b) unspezifischer MAk (7H1)

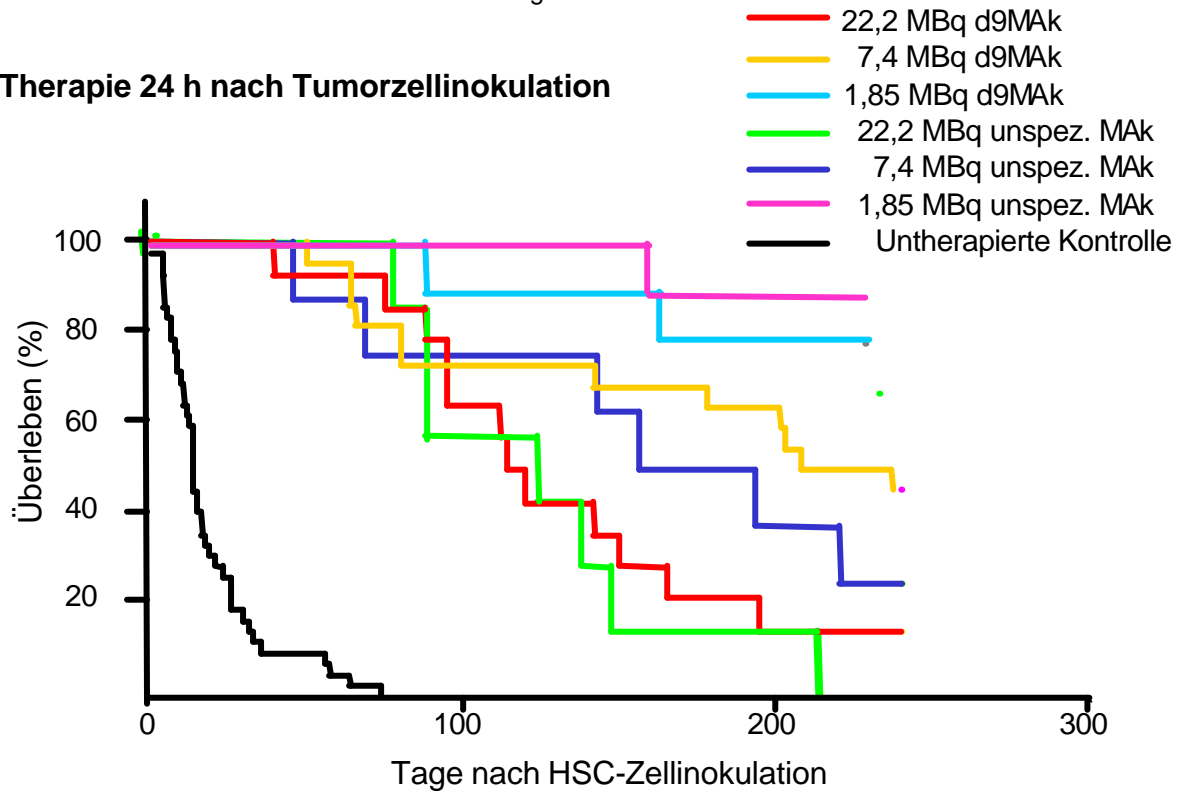
?t zwischen Tumorzellinokulation und Therapie	mittlere Überlebenszeit nach i.p. Applikation von ^{213}Bi -unspez. Ak mit der Aktivität von		
	1,85 MBq (50 μCi)	7,4 MBq (200 μCi)	22,2 MBq (600 μCi)
1 d	=214 d \pm 23,00 (n = 9); [8]	=172 d \pm 79,52 (n = 8); [2]	130 d \pm 47,16 (n = 7); [0]
8 d	nicht bestimmt	46 d \pm 20,79 (n = 5); [0]	60 d \pm 34,48 (n = 5); [0]

Anschaulicher als in Zahlen wird der Einfluß der Therapie auf die Überlebenszeit der Tiere nach Tumorzellinokulation im Kaplan-Meier-Diagramm (Abb. 20). Üblicherweise wird zum laborübergreifenden Vergleich von Therapiestudien im Tiermodell eine Beobachtungszeit von 35 Wochen festgesetzt. Da auch in dieser Studie die meisten Ereignisse in diesen Zeitraum fallen, wurden im Diagramm der Übersichtlichkeit wegen

nur diese ersten 245 d nach Tumorzellinokulation dargestellt. Den Werten in Tab. 7 liegen jedoch längere Beobachtungszeiträume zugrunde. Wie bei menschlichen Therapiestudien wurde das Auftreten von Aszitesbildung, Tumormanifestation oder Symptomen von Langzeitschäden durch Therapienebenwirkungen als Grundlage für weitere Optimierungsschritte der RIT erfasst und so dazu beigetragen, die Versuchstieranzahl langfristig zu reduzieren. Der mögliche Fehler einer Langzeitauswertung in absoluten Zahlen besteht allerdings in einer Überbewertung von Ausreißern. Die Signifikanzen beziehen sich auf die Daten in den Tabellen, sind aber aus den Ereignissen des Überlebens der ersten 245 Tage nach Tumorzellinokulation an Hand der Diagramme schon nachzuvollziehen (Abb. 20).

In den beiden Diagrammen der Abb. 20a und b liegen der Kontrollkurve diesselben Tiere zugrunde. Die relativ hohe Tierzahl in dieser Gruppe (n=40) erklärt sich aus der Annahme, dass minimale Unterschiede in der Wachstumsphase der Tumorzellen in der Kultur möglicherweise starke Schwankungen in der Entwicklungszeit der Peritonealkarzinose in den Mäusen zur Folge haben könnten. In jedem Therapieansatz blieben daher etwa 15% der Tiere nach Zellinokulation unbehandelt. Die beschriebene Annahme konnte nicht bestätigt werden, da sich jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung des Überlebens von Tieren, die Tumorzellen aus einer Charge erhalten hatten, kaum von denen von Tieren mit anderen Chargen unterschieden.

a) Therapie 24 h nach Tumorzellinokulation



b) Therapie 8 d nach Tumorzellinokulation

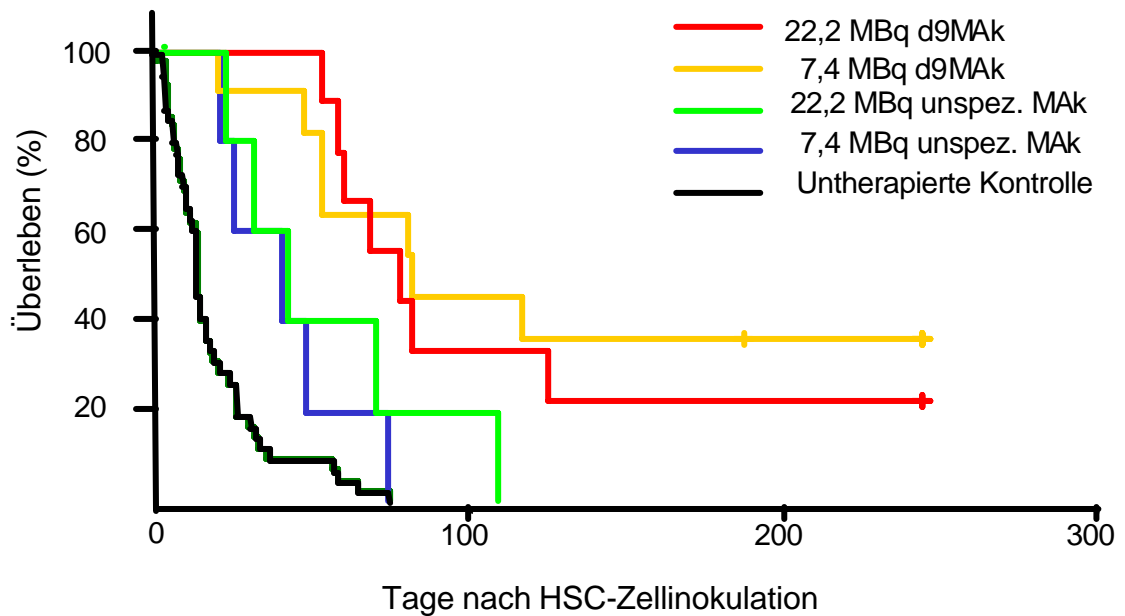


Abb. 20: Kaplan-Meier-Diagramme xenotransplantierte Nacktmäuse nach ^{213}Bi -Immuntherapie mit 1,85 MBq, 7,4 MBq oder 22,2 MBq d9MAk oder unspezifischem MAk a) am Tag 1 nach HSC-Zellinokulation oder b) am Tag 8 nach HSC-Zellinokulation im Vergleich zu untherapierten Kontrolltieren

4.3.4.2 Überlebenszeiten nach MDA-Zellinokulation

Beim MDA-Modell trat ein erheblicher Unterschied zwischen den Zeitpunkten der Manifestation der Peritonealkarzinose von MDA-WT und MDA-d9 auf (Tab. 8). MDA-WT brauchten im Schnitt ca. 1,5 mal so lange wie MDA-d9, um bei untherapierten Kontrolltieren Symptome der Karzinose wie Aszites, Tumorkachexie oder aspektorisch erkennbaren Tumor zu induzieren. Dies erschwerte die Beurteilung der Spezifität der therapeutischen Wirkung.

Eine Therapie mit ^{213}Bi -d9MAk 2 d nach Zellinokulation verlängerte das Leben bei MDA-d9 um einen Faktor von $> 2,5$, bei MDA-WT um das 1,7-fache im Vergleich zu den untherapierten Kontrollen. Bei zunehmendem Abstand zwischen Tumorzellinokulation und Therapie zeigten sich ähnliche Ergebnisse hinsichtlich der mittleren Überlebenszeiten der Tiergruppen wie im HSC-Modell: Je stärker die Peritonealkarzinose bei Therapie bereits ausgeprägt ist, desto kürzer ist das mittlere Überleben der Tiergruppe. Die Applikation von nativem, chelatiertem d9MAk (10 μg pro Maus) zeigte keinerlei therapeutischen Effekt. Die mittlere Überlebenszeit von 29 d entspricht genau derjenigen von untherapierten Kontrollen.

Tab. 8: Mittlere Überlebenszeiten in Tagen (d) nach Inokulation von MDA-d9- bzw. MDA-WT-Zellen und Therapie mit etwa 22,2 MBq (600 μCi) des ^{213}Bi -Immunkonjugats oder nativem d9MAk bzw. ohne Therapie; MW \pm SD

?t zwischen Tumorzellinokulation und Therapie	mittlere Überlebenszeit nach i.p. Applikation von ^{213}Bi -d9MAk bzw. nativem d9MAk		
	MDA-d9-Zellen, ^{213}Bi -d9MAk	MDA-d9-Zellen, nativer d9MAk	MDA-WT-Zellen, ^{213}Bi -d9MAk
Kontrolle	29 d \pm 16,1 (n=15)		47 d \pm 18,7 (n=13)
1 d	79 d \pm 14,1 (n=2)	nicht bestimmt	nicht bestimmt
2 d	76 d \pm 12,2 (n=3)	29 d \pm 13,3 (n=4)	78 d \pm 5,6 (n=4)
8 d	63 d \pm 29,7 (n=2)	nicht bestimmt	nicht bestimmt

4.3.5 Toxizität von $^{213}\text{Bi-d9MAk}$

4.3.5.1 Entwicklung des Gewichts der Mäuse nach Radioimmuntherapie

Der Einfluss der Radioimmuntherapie auf die Gewichtsentwicklung wurde an drei verschiedenen Therapiegruppen im Vergleich zu untherapierten Kontrolltieren bzw. zu Tieren ohne Inokulation von Tumorzellen untersucht. Den Tieren der Kontrollgruppen wurden MDA-WT-Zellen oder HSC-Zellen inokuliert. Die Therapiegruppen wurden 1 bzw. 8 Tage nach Inokulation von MDA-d9- oder HSC-Tumorzellen mit je 7,4 MBq (200 μCi) des $^{213}\text{Bi-d9MAk}$ therapiert (vgl. Abb. 20). Das Gewicht der Tiere vor Inokulation der Tumorzellen wurde als 100% festgesetzt. Die in Abb. 21 zusammengefassten Gewichtsdaten wurden über 56 Tage ermittelt und auf die Ausgangswerte einer jeden Maus bezogen.

Die Körpermasse gesunder, d.h. nicht inokulierter und nicht therapierter Nacktmäuse nahm über den Untersuchungszeitraum kontinuierlich zu auf 120% des Ausgangsgewichtes nach 56 Tagen. Bei den mit MDA-WT-Zellen inokulierten, untherapierten Kontrolltieren zeigt sich zunächst eine Zunahme auf 107%. Ab dem 30. Tag setzte eine abrupte Gewichtsreduzierung ein, die mit dem Beginn von

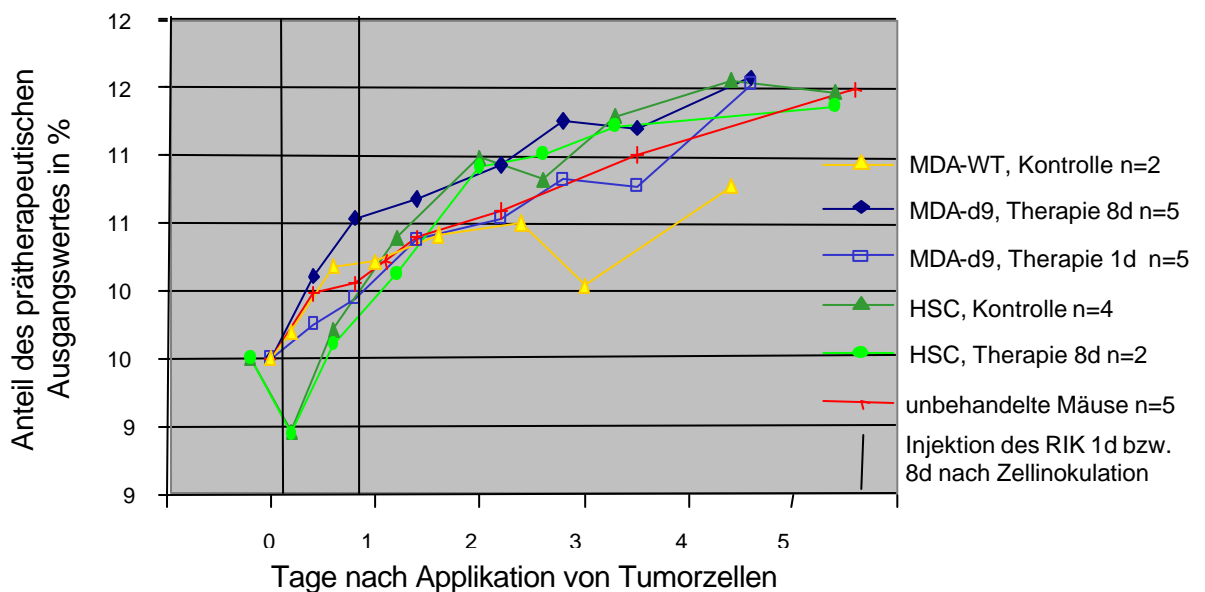


Abb. 21: Gewichtsentwicklung von Nacktmäusen nach RIT mit 7,4 MBq $^{213}\text{Bi-d9MAk}$ 1d und 8d nach Tumorzellinokulation im Vergleich zu nicht therapierten Kontrollen und Mäusen ohne Tumorzellinokulation

Tumorwachstum zu erklären ist. Ähnlich verlief die Gewichtsentwicklung untherapierter Mäuse, denen HSC-Zellen inokuliert worden waren. Hier trat die Gewichtsabnahme bereits vor dem 28. Tag auf (vgl. Überlebenszeiten von Kontrolltieren 4.3.4.1) und wurde dann aber durch die Masse des entstehenden Aszites kompensiert. Ein erheblicher Gewichtsverlust unmittelbar nach Tumorzellinokulation war bei beiden HSC-Gruppen zu beobachten und schlug sich in schlechtem Allgemeinzustand der Mäuse nieder. Ursächlich für diese Beeinträchtigung war vermutlich der von den HSC-Zellen sezernierte, hochvisköse, alkalische Schleim, der möglicherweise wie bei physiologischen Kardiadrüsenzellen auch Lysozym enthält.

Die Injektion des RIK bei der HSC-Therapiegruppe am 8. Tag nach Zellinokulation bewirkte eine marginale Abflachung der Massekurve. Zwei Wochen später wiesen beide Tiergruppen wieder identische Gewichtszunahmen auf. Eine Verlangsamung der Gewichtszunahme ließ sich auch in den Tiergruppen nach MDA-d9-Zellinokulation jeweils ab dem Tag der RIK-Applikation erkennen. Schwankungen der Körpermassen ähnlicher Größenordnung konnten jedoch auch bei tumorzell- und therapiefreien Mäusen beobachtet werden.

4.3.5.2 Verlauf der Leukozytenzahlen

Neben Intestinalepithel und Gonaden zählt das hämopoetische und lymphatische System zu den strahlensensibelsten Geweben des Säugetierorganismus und eignet sich daher besonders als Indikator für toxische Effekte des $^{213}\text{Bi-d9MAk}$.

Die Leukozytenzahl der unbehandelten Kontrolltiere stieg im Untersuchungszeitraum von 50 d kontinuierlich bis auf 143 % des Ausgangswertes an (Abb. 22). Die Leukozytenzahlen in der Tiergruppe, die nativen, chelatierten MAk i.p. erhalten hatte, verliefen ähnlich mit kleinen Schwankungen. Dies liegt möglicherweise an einer Immunreaktion auf das Rattenprotein des d9MAk, die zwar durch die Thymusaplasie der Nacktmäuse schwach ausfiel, durch intakte B-Lymphozyten jedoch noch erfassbar war. Die Abnahme der Werte innerhalb der ersten 3 d nach Applikation des $^{213}\text{Bi-d9MAk}$ zeigte eine Abhängigkeit von den verabreichten Aktivitäten. Der scheinbare Rebound-Effekt bei Applikation von 7,4 und 22,2 MBq ist vermutlich auf eine strahleninduzierte reaktive Peritonitis zurückzuführen. Ab dem 27. Tag nach Aktivitätsinjektion war eine Abschwächung der Reaktion erkennbar. Eine Applikation von 1,85 MBq des $^{213}\text{Bi-d9MAk}$ hatte eine geringgradige Reduktion der

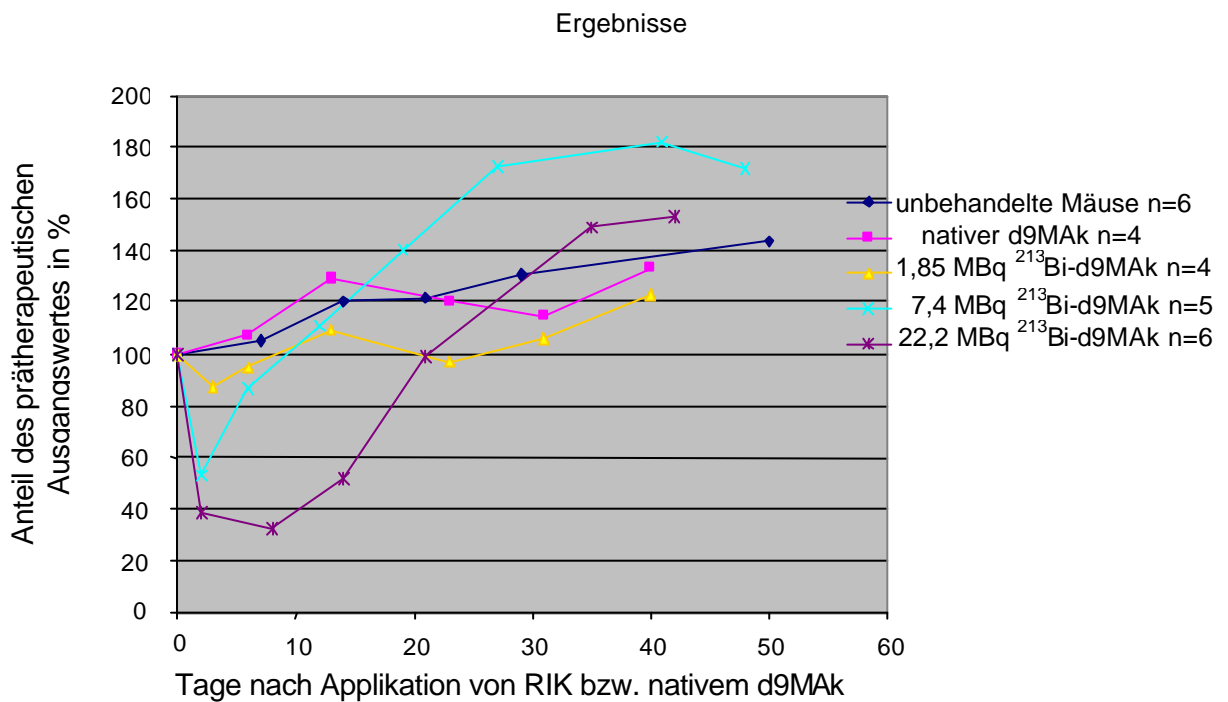


Abb. 22: Leukozytenzahlen tumorfreier Nacktmäuse nach i.p. Applikation von ²¹³Bi-d9MAk (1,85; 7,4; 22,2 MBq), oder von nativem d9MAk

Leukozytenzahl zur Folge mit einer ähnlichen Entwicklung wie nach Injektion von nativem d9MAk. Der Einfluss des Fremdproteins im Radioimmunkonjugat auf das Weiße Blutbild hat bei dieser niedrigen Aktivität scheinbar den Effekt der ²¹³Bi-Radioaktivität überwogen.

4.3.5.3 Chromosomale Aberrationen

Das Genom der Maus ist auf 40 akrozentrische Chromosomen verteilt, die sich in der Länge der Arme nur minimal unterscheiden, so dass ohne Bandenfärbung nur Fragmentaustausch von unterschiedlicher Länge mikroskopisch erkennbar ist.

Zur Bewertung der toxischen Wirkung von ²¹³Bi-d9MAk wurden chromosomale Aberrationen in Zellen des murinen Knochenmarks erfasst, und die Zellen nach 3 Schweregraden eingeteilt entsprechend der Anzahl an chromosomalen Schäden pro Zelle. Als *mäßig* geschädigt wurden Zellen klassifiziert, deren Chromosomen singuläre Veränderungen wie Einzelstrangbrüche oder Fragmentaustausch aufwiesen. *Schwere* Schädigung der Zelle bedeuteten entweder Vorhandensein mehrfacher Einzelstrangbrüche oder komplexer Austauschfiguren (s. Abb. 23). *Multipel* geschädigte Zellen zeigten ein Premature Chromosomal Condensation (PCC)-ähnliches Erscheinungsbild, mehrere Einzelstrangbrüche oder komplexe Austauschfiguren jeweils in Kombination mit massiver Fragmentierung. Alle

Aberrationsklassen bedingen den Zelltod spätestens in der zweiten folgenden Zellteilung.

Für die Erfassung der strahlungsinduzierten Schädigung von Chromosomen in den Knochenmarkszellen wurde nativen Balb/c-Mäusen $^{213}\text{Bi-d9MAk}$ mit Aktivitäten zwischen 1,85 MBq bis 29,6 MBq i.p. appliziert bzw. nativer d9MAk (s. Tab. 9).

Das Knochenmark wurde hinsichtlich chromosomaler Aberrationen 4, 8 und 24 Stunden sowie 3, 5, 7, 28 und 100 Tage nach Injektion der RIK untersucht. 24 h vor der Präparation des Knochenmarks wurde durch i.p. Applikation von ConA die Zellteilung stimuliert. Drei Stunden vor der Präparation wurden die sich teilenden Zellen durch i.p. appliziertes Demecolzin in der Metaphase arretiert.

Bei Fixierung der Chromosomen 4 h nach Applikation des $^{213}\text{Bi-d9MAk}$ traten in allen Gruppen Zellen mit mäßigen chromosomalen Aberrationen auf, wobei die Häufigkeit nicht mit der jeweils applizierten Aktivität korrelierte. Lediglich bei den Kontrolltieren mit Injektion des nativen d9MAk (0 MBq) und bei den Tieren, welchen die höchste Aktivitätsmenge des $^{213}\text{Bi-d9MAk}$ injiziert wurde (29,6 MBq), spiegelten mit 0 bzw. 11 mäßigen und einem schweren chromosomalen Schaden die Häufigkeiten geschädigter Zellen die applizierten Aktivitätsmengen wider.

Tabelle 9b zeigt die Häufigkeiten chromosomaler Aberrationen 8 h nach Injektion des RIK. Hier besteht eine deutliche Abhängigkeit des Auftretens chromosomaler

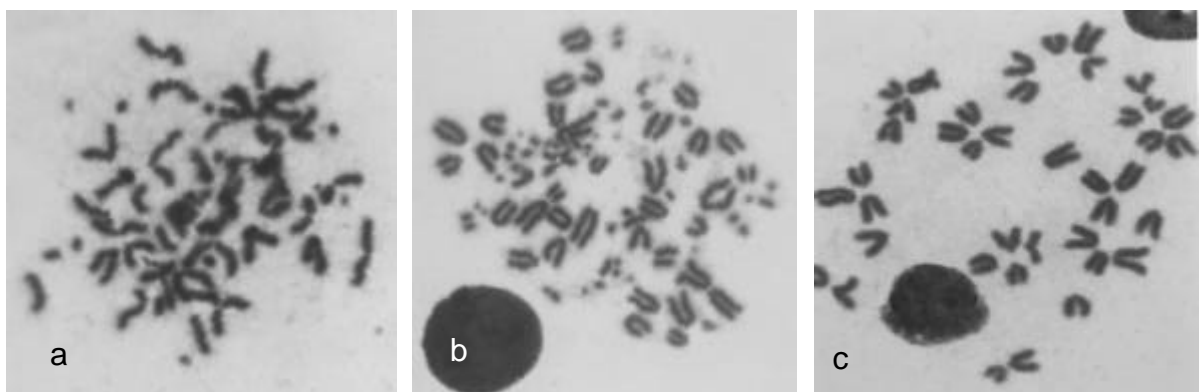


Abb. 23: Karyogramme muriner Knochenmarkszellen 24 h nach i.p. Applikation von $^{213}\text{Bi-d9MAk}$ mit a) schweren Aberrationen: telomere Fragmente b) multiplen Aberrationen: erhebliche Fragmentierung mit PCC-ähnlichem Erscheinungsbild, links unten im Bild ein Interphasekern oder c) nach i.p. Applikation von unmarkiertem d9MAk ohne chromosomale Aberrationen

Aberrationen von der applizierten Aktivität in allen drei Aberrationenklassen. Zum Zeitpunkt 24 h nach Injektion des RIK (Tab. 9c) liegen von allen Schweregraden gestörter Zellen mehr als doppelt so viele vor wie bei entsprechenden Aktivitäten zum Zeitpunkt 8 h (Tab. 9b). Wie in Abbildung 24 deutlich ersichtlich, korreliert der Anteil geschädigter Chromosomen in allen Schweregraden mit der applizierten Aktivität. Mit zunehmender Aktivität nahm der Anteil multipel geschädigter Chromosomen von 25 % nach 7,4 MBq $^{213}\text{Bi-d9MAk}$ auf 38 % nach 22,2 MBq zu. Bei den Zellen mit mäßig geschädigten Chromosomen verhielt es sich umgekehrt. Hier nahm der Anteil von 53 % nach Applikation von 7,4 MBq über 42 % nach Applikation von 14,8 MBq auf 35 % nach 22,2 MBq ab. Zu allen Zeitpunkten war nach Applikation von nativem d9MAK keinerlei Chromosomenschaden nachweisbar. Somit ist gezeigt, dass auch weder ConA noch Demecolzin chromosomale Schäden bewirken.

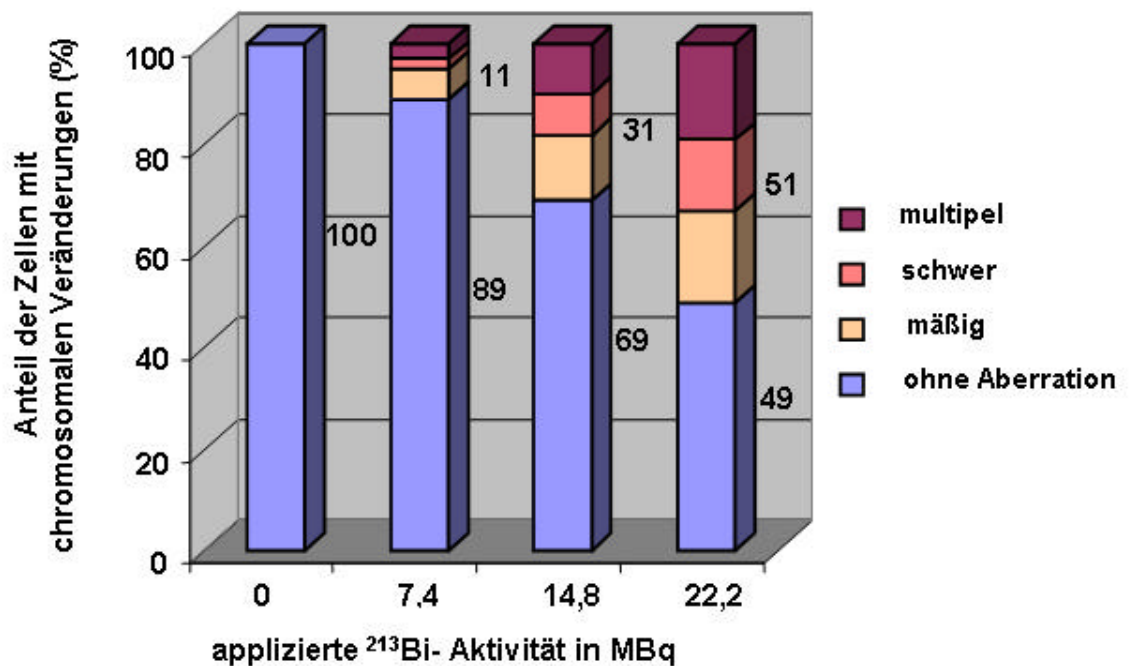


Abb. 24: Häufigkeit chromosomaler Veränderungen in murinen Knochenmarkszellen 24 h nach i.p. Applikation von $^{213}\text{Bi-d9MAk}$

In Knochenmarkszellen, die 4 h und 8 h nach i.p. Injektion des RIK fixiert wurden, traten ausschließlich Schäden vom Chromosomentyp auf, vorwiegend azentrische Fragmente. Die Schäden, die 24 h nach Applikation des RIK beobachtet wurden, waren vom Chromatidtyp. Bereits am 3. Tag nach Injektion des RIK zeigte nur noch bei den Gruppen mit 7,4 und 14,8 MBq jeweils eine einzige Zelle mäßige Aberrationen. Die Knochenmarkszellen aus den Tieren, die 22,2 MBq des RIK erhalten hatten, waren unverändert.

Tab. 9: Häufigkeiten chromosomaler Aberrationen in murinen Knochenmarkszellen nach i.p. Applikation von $^{213}\text{Bi-d9MAk}$ in % der beurteilten Zellen; MW \pm SD

a) 4h nach Injektion des RIK

Schädigungsgrad	in vivo applizierte Aktivität von $^{213}\text{Bi-d9MAk}$					
	0 MBq; n=1 (Kontrolle)	1,85 MBq n=2	7,4 MBq; n=2	14,8 MBq; n=2	22,2 MBq; n=2	29,6 MBq n=1
Mäßig	0	2 \pm 1,4	0,5 \pm 0,7	1,5 \pm 0,7	0,5 \pm 0,7	11
Schwer	0	0	0	0	0	1
Multipel	0	0	0	0	0	0

b) 8h nach Injektion des RIK

Schädigungsgrad	in vivo applizierte Aktivität von $^{213}\text{Bi-d9MAk}$			
	0 MBq; n=2 (Kontrolle)	1,85 MBq; n=1	7,4 MBq; n=2	22,2 MBq; n=1
Mäßig	0	3	5 \pm 1,4	7
Schwer	0	0	0,5 \pm 0,7	5
Multipel	0	0	1,5 \pm 2,1	9

c) 24 h nach Injektion des RIK

Schädigungsgrad	in vivo applizierte Aktivität von $^{213}\text{Bi-d9MAk}$			
	0 MBq; n=5 (Kontrolle)	7,4 MBq; n=5	14,8 MBq; n=5	22,2 MBq; n=4
Mäßig	0	6,0 \pm 2,2	12,8 \pm 2,5	17,5 \pm 5,0
Schwer	0	2,4 \pm 1,1	7,6 \pm 1,1	14,0 \pm 2,6
Multipel	0	2,8 \pm 1,5	10,0 \pm 1,4	19,0 \pm 3,9

4.3.5.4 Überleben nach Applikation von ^{213}Bi -d9MAk ohne vorherige Tumorzellinokulation

Zur Ermittlung toxischer Effekte der RIK wurden in zwei Gruppen von 6 Wochen alten, weiblichen nativen Nacktmäusen 7,4 MBq (200 μCi) bzw. 22,2 MBq (600 μCi) des ^{213}Bi -markierten 6H8 i.p. injiziert. Analog zu den Therapieversuchen wurden die Überlebenszeiten der Tiere erfasst.

Mehrere Studien zur natürlichen Lebenserwartung von Nacktmäusen hatten gezeigt, dass 50% der Tiere mindestens 21 Monate (ca. 640 d) alt werden [Lang und White, 1997].

Das Kaplan-Meier-Diagramm in Abb. 25 illustriert die toxischen Effekte der ^{213}Bi -d9MAk-Applikation auf die Lebenserwartung tumorfreier Nacktmäuse. Zum Vergleich mit Abb. 20a wurden wie dort die Überlebensdaten der Kontrolltiere und der beiden Therapiegruppen nach Applikation von spezifischem MAk mit 22,2 MBq oder 7,4 MBq aufgetragen. Zu berücksichtigen ist die längere Beobachtungszeit als bei den Tieren in Abb. 20. Die Kaplan-Meier-Kurve der Tiergruppe, der 22,2 MBq ^{213}Bi -d9MAk appliziert wurden aber keine Tumorzellen, zeigt einen nahezu identischen Verlauf wie jene der Tiergruppe, welche die gleiche Aktivität nach vorhergehender HSC-Zellinokulation erhalten hatte (vgl. Abb. 20 a). Die durchschnittliche Überlebensdauer lag in diesen Gruppen bei ≥ 186 d ohne Zellinokulation und bei 173 d nach Zellinokulation (Tab. 10 bzw. Tab. 8). Dies legt den Schluß nahe, dass die Letalität der letztgenannten Gruppe nicht im Tumorwachstum, sondern in der Toxizität der Strahlung zu suchen ist. Nach Injektion von 7,4 MBq unterschieden sich die Überlebenszeiten der Tiergruppen mit und ohne Tumorzellen dagegen erheblich (≥ 232 d bzw. ≥ 467 d).

Tab. 10: Mittlere Überlebenszeiten nach Injektion des ^{213}Bi -Immunkonjugats; Mittelwert \pm Standardabweichung; [davon zum Zeitpunkt der Drucklegung noch lebend]

applizierte Aktivität	mittlere Überlebenszeit nach i.p. Applikation von ^{213}Bi -d9MAk
7,4 MBq (200 μCi)	=466,2 d \pm 95,68 (n=10) [6]
22,2 MBq (600 μCi)	=185,5 d \pm 185,09 (n=6) [1]

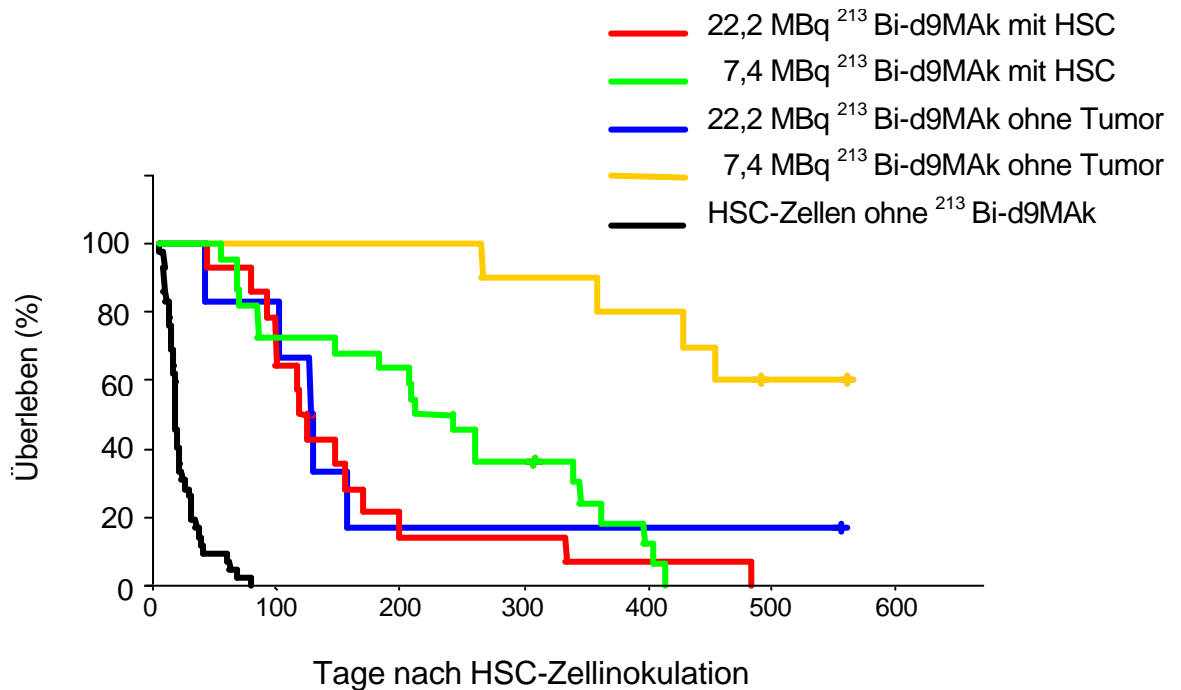


Abb. 25: Kaplan-Meier-Diagramm tumorfreier und xenotransplanzierter Nacktmäuse nach Applikation von 7,4 MBq bzw. 22,2 MBq des $^{213}\text{Bi-d9MAk}$ und einer xenotransplanzierter Kontrollgruppe ohne Therapie

4.3.5.5 Veränderungen von Nierenfunktionsparametern nach Applikation von $^{213}\text{Bi-d9MAk}$

Die Veränderungen von Nierenfunktionsparametern sind vor dem Hintergrund zu sehen, dass das Erkennen der Niereninsuffizienz vom Auftreten der assoziierten Symptome wie Polyurie, Aszites oder Urämie abhängt. Polydipsie konnte beispielsweise unter den Studienbedingungen nicht erfasst werden. Je später eine Reduktion der Nierenleistung erkannt wird, desto stärker wird die Anreicherung harnpflichtiger Substanzen im Blut ausfallen. Zunächst wurden Normwerte für die Nierenfunktionsparameter an 3 gesunden Nacktmäusen bestimmt, da die tierartspezifischen Normwerte in der Literatur in Abhängigkeit vom Tierstamm eine starke Streuung aufweisen. Die Kreatininkonzentration betrug $20,6 \pm 5,1 \mu\text{mol/l}$ ($0,23 \pm 0,06 \text{ mg/dl}$), der Harnstoff-Stickstoff-Wert $2,83 \pm 0,32 \text{ mmol/l}$ ($17 \pm 1,92 \text{ mg/dl}$). Bei den Kreatininwerten der Tiere mit pathologisch veränderten Nieren nach RIT erlaubten die marginalen Abweichungen von den Normwerten keine Interpretation zur Nierentoxizität. Anders verhielt es sich mit den Harnstoff-Stickstoff-Werten: bei Tieren mit makroskopisch veränderten Nieren reichten die Werte von $4,83 \text{ mmol/l}$ (29 mg/dl) bis $9,16 \text{ mmol/l}$ (55 mg/dl), (MW $6,27 \text{ mmol/l}$ ($37,7 \text{ mg/dl}$) $\pm 2,5$).

4.4 Histologie und Zytologie

4.4.1 Histopathologie von Nieren ausgewählter Tiere

Makroskopisch veränderte Nieren von den Tieren, die RIK erhalten hatten ohne vorherige Zellinokulation, wurden unmittelbar nach der Sectio in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet, geschnitten und nach H.E.-Färbung mikroskopisch beurteilt. Als relevante makroskopische Veränderungen der Organe fielen besonders Farbabweichungen von ockerfarbig bis gelblich, Umfangsvermehrungen oder zystische Veränderungen auf.

Alle 5 Tiere, die nach i.p. Applikation von 22,2 MBq (600 μ Ci) des ^{213}Bi -d9MAk gestorben waren, wiesen Aufhellung der Nierenfärbung bis zu gelb auf. Von diesen hatten 4 Tiere zellarmen Aszites entwickelt. Bei 3 von diesen 5 Tieren trat innerhalb von 3-5 Monaten nach Injektion des RIK eine Hyalinisierung der Glomerula mit Sklerose auf. Das Tubulusepithel war in diesen Nieren geschwollen und zum Teil atrophiert. Bei einem Nierenpaar wurde Hydronephrose diagnostiziert mit assoziierter Tubulusatrophie (Abb. 26). Nach Applikation von 7,4 MBq (200uCi) des ^{213}Bi -d9MAk wurden bei 2 von den bisher 4 gestorbenen Mäusen makroskopische Veränderungen erkennbar, die histologisch jedoch nicht bestätigt werden konnten. Aszites trat in einem Fall auf.

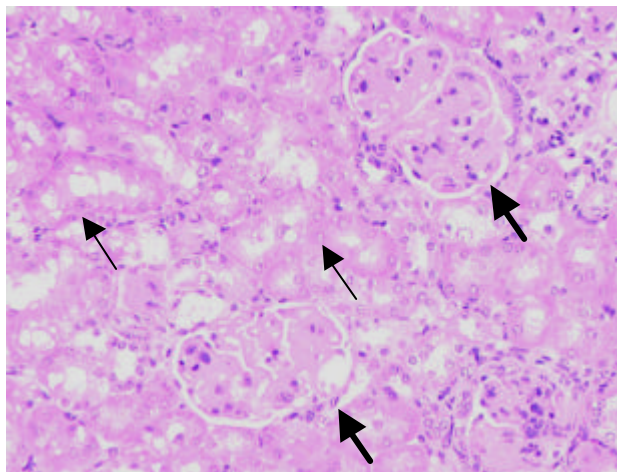


Abb. 26: Darstellung der typischen histopathologischen Nierenveränderungen nach i.p. Applikation von 22,2 MBq ^{213}Bi -d9MAk: hyalinisierte Glomerulaschlingen (dicke Pfeile) und ödematisierte Tubulusepithelzellen mit vergrößerten Kernen (dünne Pfeile); H.E. (160-fache Vergrößerung)

4.4.2 Zahl der HSC45-M2-Zellen im Aszites

Die Tumorzellzahl im Aszites als Indikator des Therapieerfolges in präklinischen Studien und für die Prognose bei der Therapie von Patienten ist von großer Bedeutung, da frei flotierende Tumorzellen das i.p. applizierte RIK abfangen (s. Abb. 12), und so Mikrometastasen an der abdominalen Serosa geringerer Strahlenintensität ausgesetzt sind.

Die Kriterien zur Unterscheidung der Tumorzellen von Mesothelzellen, Monozyten und Makrophagen im gefärbten Aszitesausstrich waren vergrößerte Kern-Plasma-Relation bei Tumorzellen ($>1:2$), chromatische Kerne, erhöhte Plasmabasophilie, unterschiedliche Kerngröße, anomale mitotische Kernfiguren sowie vergrößerte bzw. mehrfach vorhandene Nukleoli. Insbesondere Karzinome schilfern in azinösen, pleomorphen Zellgruppen ab, wobei das Zellplasma „schaumig“ aussehen kann. Die größte Schwierigkeit besteht in der Differenzierung der Tumorzellen von Mesothelzellen. Da letztere als Antwort auf Flüssigkeitsansammlungen in Körperhöhlen aktiv proliferieren, können auch sie vielkernig erscheinen und häufig Mitosefiguren zeigen.

Die Tumorzellzahl im Aszites variierte von $1,11 \times 10^5$ bis $2,28 \times 10^6$ pro ml und zeigte keinerlei Abhängigkeit von der inokulierten Zelllinie oder etwaiger therapeutischer Behandlung der Tiere. Beide Extremwerte waren von Mäusen nach Therapie mit 7,4 MBq $^{213}\text{Bi-d9-MAk}$ zu finden, während unbehandelte Kontrolltiere zwischen diesen Werten lagen. Sowohl nach Therapie mit 7,4 MBq als auch nach 22,2 MBq traten aber auch Asziten auf mit bis zu $1,23 \times 10^6$ verdächtigen Zellen pro ml (vgl. 3.9.1), die sich jedoch in der Papenheimfärbung als nicht tumorös herausstellten.

4.4.3 Expression von d9-E-Cad im xenotransplantierten, soliden Tumor

Für die Darstellung der d9-E-Cad-Verteilung wurden ein s.c. HSC-Tumor aus einer Nacktmaus isoliert, Paraffinschnitte davon angefertigt und diese immunhistochemisch gefärbt. Als Primärantikörper diente d9MAk (6H8).

Die Tumorzellen liegen z.T. in kleineren soliden Verbänden (Abb. 27a dünner Pfeil), z.T. in lockeren Gruppen zusammen (dicker Pfeil). Beachtenswert ist die Einbettung in desmoplastisches Stroma. Wie Abb. 27b zeigt, setzt sich das Karzinom aus kugeligen, neoplastischen Zellen zusammen, deren Membranen immunhistochemisch angefärbt sind. Die intrazytoplasmatischen, blassen, feinvakuolären Schleimmassen drängen den Zellkern an den Rand und führen so zum typischen Bild der Siegelringzelle (Pfeile). Dazwischen finden sich nekrotische Tumorzellen, die nach ihrem Zelltod keine immunhistochemische Reaktion mehr aufweisen.

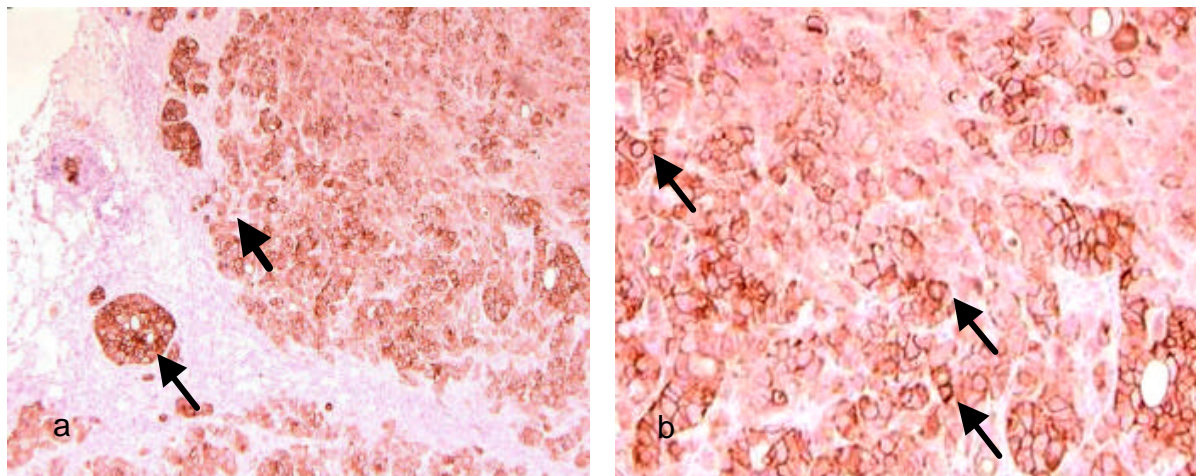


Abb. 27: Immunhistochemische Darstellung der Verteilung des mutierten E-Cadherins am Paraffinschnitt eines soliden HSC-Zelltumors aus einer Nacktmaus a) 100-fache Vergrößerung b) Ausschnitt aus a vergrößert gesamt ca. 400-fache Vergrößerung

4.4.4 Penetrationstiefe von intaktem d9MAk und Fab'-Fragmenten in den Tumor

Zur Bestimmung der Eindringtiefe von intaktem d9MAk oder von d9-Fab'-Fragmenten wurde ein kugelförmiger, im Durchmesser 0,8 cm großer s.c. HSC-Tumor aus der Maus isoliert und 30 min in einer ^{213}Bi -d9MAk- bzw. ^{213}Bi -Fab'-Lösung inkubiert. Als Kontrolle diente Leberparenchym, mit dem genauso verfahren wurde. In der Inkubationslösung mit intaktem d9MAk betrug die spez. Aktivität 114 MBq/79 µg MAk (39 mCi / mg), in der ^{213}Bi -Fab'-Lösung 1,48 MBq/69 µg Fab' (0,58 mCi / mg).

Abb. 28a zeigt zwei verschiedene Verteilungsmuster der RIK. In der oberen Bildhälfte nimmt die Intensität der Schwärzung kontinuierlich ab in Richtung Tumorzentrum (links). In der unteren Bildhälfte wird ein Großteil des ^{213}Bi -d9MAk in den äußeren 500 µm des Tumors (Ausschnitt) gebunden. Weitere 750 µm näher am Tumorzentrum ist die Schwärzung so schwach, dass sie sich von der des Hintergrunds kaum mehr unterscheidet. Abb. 28b stellt den gekennzeichneten Ausschnitt aus Abb. 28a in 400-facher Vergrößerung dar. Auffallend sind Zonen intensiverer Schwärzung mit starker Bindung des ^{213}Bi -d9MAk (dicke Pfeile) unmittelbar neben Bereichen schwächerer Schwärzung (dünne Pfeile).

In Abb. 28c ist ein Ausschnitt der Leber gezeigt nach Inkubation mit intaktem d9MAk. Die nur geringgradige Schwärzung sowohl des Lebergewebes als auch des Hintergrunds weist darauf hin, dass keine Bindung erfolgte. Die Mikroautoradiographie mit ^{213}Bi -Fab' (Abb. 28d) ergab zwar eine schwache aber gleichmäßige Schwärzung des Gewebes, was für ein rasches Eindringen der Fab' ins Tumorgewebe spricht.

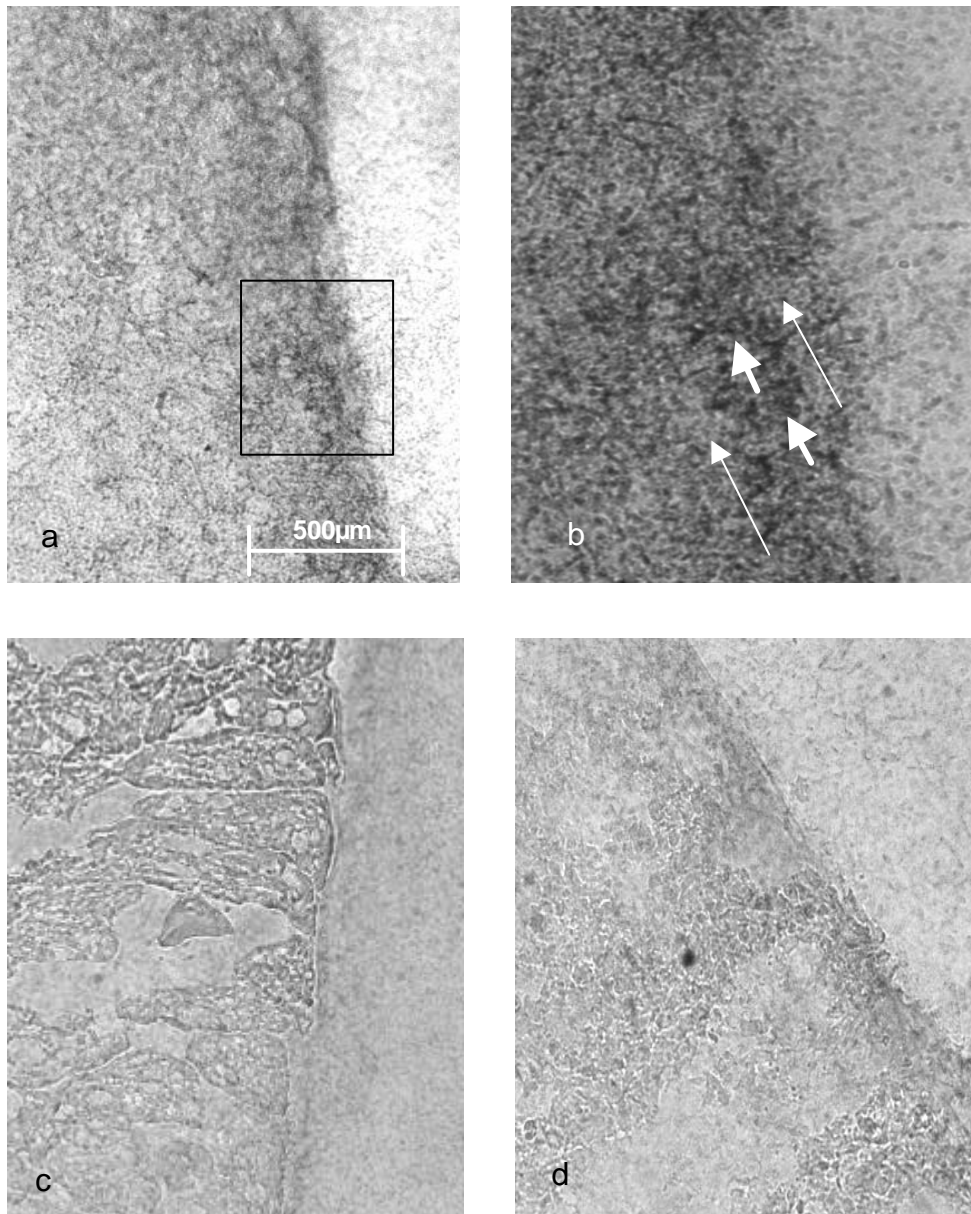


Abb. 28: Mikroautoradiographie nach Inkubation mit ^{213}Bi -d9MAk bzw. ^{213}Bi -d9Fab' a) HSC-Tumor s.c. intakter MAk (160-fache Vergrößerung),

b) HSC-Tumor s.c. intakter MAk (400-fache Vergrößerung),

c) Leber s.c. intakter Ak (160-fache Vergrößerung),

d) HSC-Tumor s.c. Fab' (160-fache Vergrößerung)

5 Diskussion

Im Verlauf des Magenkarzinoms ist eine frühe intraperitoneale Tumorzellaussaat das kritische Moment, das zu Peritonealkarzinose und rapider Verschlechterung des klinischen Status des Patienten führt. Abgesehen von einigen wenigen experimentellen Therapiestrategien steht bis jetzt keine adäquate Therapie der Einzelzellstreuung in den Peritonealraum zu Verfügung. Chemotherapie oder externe Bestrahlung sind wegen der unspezifischen Wirkungsweise mit schweren Nebenwirkungen verbunden. Durch die vorliegende, neue Therapiestrategie, die auf lokoregionaler Applikation tumorspezifischer monoklonaler Antikörper gekoppelt mit dem α -Emitter ^{213}Bi mit hohem linearem Energietransfer basiert, ist eine aussichtsreiche, nebenwirkungsarme Bekämpfung von einzelnen Tumorzellen im Abdominalraum in greifbare Nähe gerückt.

Etablierung der Tumormodelle in Abhängigkeit von den Zelleigenschaften

Mit der Inokulation von menschlichen Magenkarzinomzellen (HSC) in den Abdominalraum von Nacktmäusen und der regelmäßigen Manifestation der Peritonealkarzinose wurde in dieser Studie ein neues Tiermodell für die disseminierte Tumorzellaussaat beim Magenkarzinom entwickelt. Die rasche Manifestation der Peritonealkarzinose nach im Durchschnitt 24 d spiegelt die kurze Verdopplungszeit der HSC-Zellen in vitro von 21,5 h wider. Im Vergleich hierzu beträgt die Verdopplungszeit bei MDA-d9-Zellen 24,5 h und bei MDA-WT-Zellen 30,3 h. Die i.p. Inokulation dieser Mammakarzinomzelllinien führt erst nach 29 d (MDA-d9-Zellen) bzw. nach 47 d (MDA-WT-Zellen) zur Peritonealkarzinose mit Aszites. Je schneller und somit aggressiver die Tumormanifestation abläuft, desto weniger interveniert die individuelle Konstitution der Tiere in den Karzinoseverlauf, so dass die Streuung der Endpunkte somit geringer wird.

Die Bestimmung der Verdopplungszeit wird von der gewählten Meßmethode beeinflusst. Im Unterschied zum unmittelbaren Zählen der Zellen in Zellkulturflaschen geht beim Ablösen der Zellen aus den Flaschen und maschinellm Zählen die Adhärenz der Zellen an Behältnissen und Pipetten als Fehlerquelle in den Vergleich des Wachstums verschiedener Zelllinien ein. Tatsächlich kann ein solcher Effekt bei den stärker adhärennten HSC-Zellen gegenüber den weniger adhärennten MDA-Zellen

beobachtet werden. Den in den Zellkulturflaschen bestimmten Verdopplungszeiten von 22h (HSC-Zellen), 25 h (MDA-d9-Zellen) und 30 h (MDA-WT-Zellen) standen nach Ablösen aus den Flaschen die Werte 37 h, 22 h bzw. 25 h jeweils entsprechend gegenüber.

Der Versuch, die Spezifität der therapeutischen Effizienz des d9MAk nachzuweisen, litt im MDA-Modell an den unterschiedlichen Wachstumscharakteristiken der beiden Zelllinien. Die kürzere Verdopplungszeit der MDA-d9-Zellen (s. 4.3.1) sensibilisiert sie für Strahlung, da sich zu jedem Zeitpunkt ein höherer Zellanteil in Mitose befindet als bei MDA-WT-Zellen. Eine entsprechende Abhängigkeit der Sensibilität wurde auch von Seidenschwang beim Vergleich verschiedener Zelllinien unter Cäsium-137-Bestrahlung festgestellt, wobei sich HSC-Zellen als die strahlensensibelsten erwiesen [Seidenschwang et al., 2002]. Der Unterschied in der Zellvermehrung zwischen MDA-d9- und MDA-WT-Zellen war in vivo noch ausgeprägter. Nach Inokulation der MDA-WT-Zellen überlebten Mäuse um 50% länger als nach MDA-d9-Zellinokulation (s. 4.4.3.2). Eine weitere Schwäche des MDA-Modells ist die geringe Antigenexpression bei MDA-Zellen. Die Bedeutung der Antigendichte an der Zellmembran wird deutlich, wenn man zugrunde legt, dass drei bis fünf α -Teilchen den Zellkern durchqueren müssen, um die Zelle abzutöten [Macklis et al., 1992]. MDA-Zellen exprimieren $5,5 \times 10^4$ d9-E-Cad-Antigenmoleküle, HSC-Zellen hingegen etwa doppelt so viele, nämlich 1×10^5 Antigenmoleküle pro Zelle. Bei ausgewogenem Antigen/Antikörper-Verhältnis ist der Zelltod durch spezifische Bindung des ^{213}Bi -d9MAk bei HSC-Zellen folglich erheblich wahrscheinlicher als bei MDA-d9-Zellen. Überdies sind HSC-Zellen als Magenkarzinomzellen gegenüber der Mammakarzinomzelllinie MDA schon aufgrund ihrer organspezifischen Differenzierung realitätsnäher.

Die beiden von HSC-Zellen sezernierten Tumormarker CEA (carcinoembryonic antigen) und TPA (Tissue polypeptide antigen) bieten für weitere Studien die Möglichkeit, anhand ihrer jeweiligen Werte im Blut den Grad der HSC-Karzinose am lebenden Tier zu erfassen [Yanagihara et al., 1993]. In ersten eigenen Untersuchungen ergab sich bei einer Maus mit HSC-Peritonealkarzinose eine CEA-Konzentration von 43,5 ng/ml im Serum und von 87,8 ng/ml im Aszitesüberstand. Werte, die weniger als 3 ng/ml betragen, gelten als normal.

Zu den Möglichkeiten optischer Darstellung der Peritonealkarzinose in vivo

Die Sonographie stellte sich nach Einarbeitung in die Bildinterpretation als geeignet heraus, bei Mäusen Aszites mit Volumina $\geq 0,5$ ml zu erkennen. Mikrometastasen wurden jedoch nur zufällig diagnostiziert. Ein negativer sonographischer Befund war somit nicht beweisend. Auf ähnliche Schwierigkeiten stießen Lorenz u. Mitarb. [1990] in ihrer Gegenüberstellung verschiedener Bildgebungsverfahren bei menschlicher Peritonealkarzinose. Sie ermittelten als untere Nachweisgrenze für die Sonographie Tumordurchmesser von 1 cm und schlossen daraus, dass die explorative Laparoskopie beim Staging abdominaler Neoplasien nicht zu ersetzen sei.

In Kernspintomogrammen konnten Kennel u. Mitarb. [2000] in Mäuselungen Tumorknötchen schon ab einer Größe von 1 mm diagnostizieren. Dies gelang jedoch nur an toten Tieren, da die Bewegung des Thorax bei der Atmung die Aufnahmequalität negativ beeinflusste. Als Alternative sieht diese Arbeitsgruppe die hoch auflösende Computertomographie (CT) an, mit der Tumorzellverbände ab 100 μm Größe erkannt werden können. Exakte Bewertungen von therapieinduzierter Tumorregression waren auch mit CT-Analyse allein jedoch nicht möglich. Obwohl in den Kernspintomogrammen dieser Studie die exzellente Auflösung sogar die Darstellung der Herzscheidewände atmender Mäuse ermöglichte, war auch im vorliegenden Modell diese Technik zum Erkennen von Mikrometastasen im Abdomen nicht sensitiv genug. Erst größere Tumorzellverbände am Zwerchfell wurden erkennbar. In diesem Stadium tritt oftmals bereits Aszites auf. Dieser ist zwar im Kernspintomogramm leicht zu erkennen, Versuche zur Visualisierung von Tumorregression waren dann jedoch nicht erfolgreich.

Von den im Rahmen dieser Arbeit getesteten Techniken der anatomischen In-vivo-Bildgebung stellte sich das „Optical Imaging“ als das meistversprechende Verfahren heraus. Schon relativ wenige Zellen (5×10^5) führten zu einem starken Fluoreszenzsignal. Die erhaltenen Bilder lassen allerdings keine Schlüsse darauf zu, ob sich der hierbei verwendete Fluoreszenzfarbstoff noch in den Zellen befindet. Seine Anreicherung in den Lymphknoten der Bursa omentalis ließe sich sowohl mit einer tumorösen Infiltrierung der Lymphknoten als auch mit einer lymphogenen Filtration des extrazellulären Farbstoffes erklären. Eindeutig wäre diese Frage durch immunhistochemische Verfahren zu klären. Um Langzeitbeobachtungen der Zellvermehrung und etwaigen posttherapeutischen Tumorregression zu ermöglichen,

sind Modifikationen in der Zellfärbetechnik erforderlich. Die hier verwendete Zytoplasmafärbung hat eine Halbierung der Leuchtkraft der Einzelzelle mit jeder Zellteilung zur Folge. Eine stabile Transfektion eines Gens zur Expression eines Fluoreszenzmoleküls oder von Luziferase dagegen würde mit jeder neu gebildeten Zelle die Lichtintensität eines Tumorknötchens verstärken. Luziferase weist gegenüber Fluoreszenzmolekülen den Vorteil auf, dass eine gelegentlich zu beobachtende Eigenfluoreszenz des Gewebes oder von Futterbestandteilen im Gastrointestinaltrakt nicht angeregt wird. Hingegen ist die Umsetzung des Substrates Luziferin ATP-abhängig, so dass nekrotische Areale von Tumoren oder apoptotische Zellen nicht erkennbar sind.

Untersuchungen zur Bildgebung in Abhängigkeit von der Zellzahl ergaben bei mit Luziferase stabil transfizierten HeLa-Zellen eine hinreichende Detektierbarkeit von 1×10^3 Zellen im Peritonealraum von Mäusen, von 1×10^4 Zellen nach s.c. Implantation und von 1×10^6 Zellen unmittelbar nach i.v. Inokulation [Edinger et al., 1999]. Eine gute Korrelation der Luziferase-Enzymaktivität mit dem resultierenden Biolumineszenzsignal wurde von Iyer u. Mitarb. [2002] erfasst. Dies könnte die Grundlage für quantitative Messungen der Tumorproliferation und Tumorregression nach Therapie im Mäuseabdomen bieten.

Biodistribution der RIK

Bei jedem Pharmakon entscheidet die Kinetik im Organismus primär über seinen potentiellen klinischen Einsatz. Die Biodistribution in der Nacktmaus bietet die Möglichkeit, die Anreicherung des RIK im Tumor und im Normalgewebe zu beurteilen und stellt die Grundlage für die Dosimetrie dar. Insbesondere der Tumor/Blut-Quotient eines RIK repräsentiert die Gegenüberstellung von zu erwartender therapeutischer Effizienz und Toxizität. Die höchsten Werte wurden bei i.p. Injektion des tumorspezifischen RIK in aszitesfreie Mäuse erreicht. Auch bei Mäusen mit Aszites war der Tumor/Blut-Quotient nach i.p. Applikation stets größer als 1, während er bei unspezifischem RIK in jedem Fall unter 1 lag. Nach i.v. Applikation von RIK erwarten Zhang u. Mitarb. [1998] eine homogenere Verteilung im Tumor. Diese Aussage trifft allerdings für i.p. gelegene Tumoren nur bedingt zu. Isolierte und präangiogene Tumorzellverbände im Intraperitonealraum werden von i.v. applizierten RIK kaum erreicht, wie anhand der vorliegenden Tumormodelle gezeigt werden konnte. Eine systemische Applikation von $^{213}\text{Bi-d9MAk}$ resultierte nach 1 h in 6-fach höheren

Konzentrationen im Blut als im Tumor. Die Fab'-Fragmente konnten in dieser Studie unseren Ansprüchen auf Grund der geringen Immunreaktivität nach Kopplung mit ^{213}Bi von nur 27% nicht gerecht werden. Die Tumor/Blut-Quotienten betragen bei Mäusen mit Aszites nur 1,2, bei aszitesfreien Mäusen 1,4, die Konzentrationen in den Nieren 23% ID/g bzw. 67% ID/g und waren damit deutlich zu hoch. Sie resultierten aus einer für Fragmente und Peptide typischen Retention in diesem Organ [Behr et al., 1995a]. Außer in diesen beiden Gruppen mit und ohne Aszites nach ^{213}Bi -Fab'-Applikation zeigte in der gesamten Studie nach i.p. Applikation des spezifischen RIK kein einziges Organ annähernd so hohe Aktivitätskonzentrationen wie der Tumor.

Die Retention der RIK im Abdomen durch Aszites nach i.p. Applikation ist sowohl durch die Szintigramme als auch durch quantitative Biodistributionsdaten belegt und spiegelt sich in niedrigeren Aktivitätskonzentrationen im Blut und in blutreichen Organen wider (Abb. 12, 13, 15). Dieses Phänomen ist auch beim Menschen zu beobachten. In einer Phase-I-Studie mit i.p. appliziertem, ^{90}Y markiertem Ak gegen Ovarialkarzinom zeigte die einzige Patientin mit Aszites etwa nur 1/10tel der Aktivität in Serum und Knochen im Vergleich zu anderen Studienteilnehmerinnen [Hnatowich et al., 1988].

Eine antigenspezifische Retention von RIK im Aszites ohne Separation in Pellet und Überstand konnte in der vorliegenden Studie nicht nachgewiesen werden. Sowohl 1 h als auch 3 h p. i. wies die Konzentration des unspezifischen RIK etwa 40 %ID/g Gesamtaszites auf. Selbst aus tumorzellfreiem Aszites wird innerhalb von 3 h kaum RIK resorbiert. Bei separater Bestimmung der Aktivitätskonzentration in Pellet und im Überstand des Aszites wurde hingegen die Spezifität der Bindung bei d9MAk sowie eine fehlende Bindung bei unspezifischem MAk bestätigt.

Andererseits ist in der Szintigraphie (Abb. 15) bei der aszitesfreien Maus nach MDA-d9-Zellinokulation bereits 24 h nach i.p. Applikation von ^{213}Bi -d9MAk trotz nachgewiesener Peritonealkarzinose mit MDA-d9 zwar noch einiges RIK im Peritonealraum gebunden, ein nicht unerheblicher Anteil aber resorbiert. Die Erklärung hierfür beruht vermutlich auf einem Überschuss an MAk im Vergleich zur Anzahl der dem RIK zugänglichen Antigene. Das nicht gebundene RIK wurde somit zwar langsam resorbiert, wegen der beträchtlichen Größe der Moleküle von etwa 150 kDa [Litterst et al., 1982] aber dennoch gänzlich innerhalb von 24 h. Für die klinische Anwendung des ^{213}Bi -d9MAk ist dies jedoch ohne Bedeutung, da zu diesem Zeitpunkt aufgrund der kurzen HWZ von ^{213}Bi keinerlei Radioaktivität mehr vorliegt.

Der auffällig hohen Blutkonzentration der RIK bei Mäusen mit manifestierter HSC-Peritonealkarzinose scheint ein modellspezifischer Effekt zu Grunde zu liegen. Beim MDA-d9-Peritonealkarzinosemodell wurde nach 1 h bei Tieren ohne Aszites lediglich 1,65% ID/g Blut gemessen, bei HSC-Peritonealkarzinosemodell hingegen unter gleichen Bedingungen 5,39% ID/g. Injektionstechnik und Präparationstechnik bieten hierfür keine Erklärung, da für beide Modelle identisch verfahren wurde. Überdies zeigt der Vergleich zwischen den RIK-Konzentrationen in Jugularblut und in Blut, das durch Eröffnen des Thorax entnommen wurde, kaum einen Unterschied. Vermutlich ist die Ursache für die hohe Blutkonzentration des RIK in der Resorptionsrate zu suchen. Vorstellbar ist, dass das von den HSC-Zellen wie von allen Kardiadrüsenzellen sezernierte Lysozym die "Resorptionsbarriere" Peritonealserosa schädigt, und so RIK aus der Bauchhöhle schneller in den Blutkreislauf gelangt. Ein weiterer Grund für eine gesteigerte Resorptionsrate liegt möglicherweise in einer Aufnahme des RIK in das Blut via vaskularisierte Tumoren, da die Blutgefäße in Tumoren selten in dem gleichen Grad ausgereift sind wie physiologische Gefäße [Yuan et al., 1995]. In unserem Modell liegen jedoch hauptsächlich Mikrometastasen vor. Bis zu einem Volumen von $0,5 \text{ mm}^3$ gelten Metastasen als präangiogen [Wetterwald et al., 2002].

Therapeutische Effizienz

Jede Applikation des spezifischen RIK nach HSC-Inokulation schlug sich in dieser Studie in hochsignifikant längerem Überleben der damit behandelten Tiere im Vergleich zu den untherapierten Kontrolltieren nieder. Auch bei frühzeitiger Therapie (24 h) nach Tumorzellinokulation mit unspezifischem RIK überlebten die Tiere mit hoher Signifikanz länger als die Kontrolltiere. Therapieerfolge mit unspezifischem RIK sind auch an anderer Stelle belegt. In einem murinen i.p.-Tumormodell verlängert ein unspezifischer ^{211}At -markierter MAK nach Injektion von 200 kBq das Überleben der Tiere etwa um die gleiche Zeit wie der MAK gegen tumorassoziiertes Antigen [Larsen et al., 1995]. Einen spezifischen Effekt zeigen i.p. applizierte MAK bei 25 kBq pro Maus.

Nicht immer kann die Ursache so klar erschlossen werden wie in der vorliegenden Studie. Auch bei Miederer u. Mitarb. [2003] gibt es Hinweise auf eine unspezifische Zytotoxizität aufgrund eines Ak-Überschusses. In diese Richtung weist auch der Vergleich der Überlebenszeiten von Tieren, die erst 8 d nach HSC-Inokulation therapiert wurden. Während der Einsatz von spezifischem RIK nach 1d lediglich knapp

1/3 längeres Überleben ermöglicht als unspezifisches RIK (=232 d bzw. =172 d), leben die Tiere bei der spezifischen Therapie 8 d nach Zellinokulation viermal länger als nach der unspezifischen Therapie (=187 d bzw. =46 d). Der einzige Parameter, der die Therapieansätze 1 d und 8 d nach Zellinokulation unterscheidet, ist der Manifestationsgrad der Peritonealkarzinose. Ein einfaches Rechenbeispiel verdeutlicht die Ausgangssituation. Es wurden 1×10^7 Zellen mit je 10^5 Antigenen inokuliert, also 1×10^{12} Antigene. 24 h später wurden etwa $10 \mu\text{g}$ Ak injiziert. Dies entspricht 4×10^{13} Ak-Molekülen. Nach der Verdopplungszeit von 21,5 h stehen etwa 2×10^{12} Antigene einem 20-fachen Ak-Überschuss gegenüber. Innerhalb von 8 d können sich die Zellen und somit die Antigene etwa 9-mal verdoppeln. Die eingesetzte Ak-Menge bleibt gleich. Je größer das Antigen/Ak-Verhältnis ist, desto deutlicher zeigt sich die Spezifität der Bindung. Eine Studie von Zhu u. Mitarb. bestätigt die Bedeutung der Ak-Überdosierung [1997].

In einem weiteren Tiermodell wurden Therapieerfolge unspezifischer RIK beobachtet. Adams u. Mitarb. [2000] applizierten Mäusen mit s.c.-Tumoren ^{213}Bi -gekoppelte spezifische und unspezifische „single-chain Fragmente“ (scFv) intravenös. Bei Aktivitäten von $300 \mu\text{Ci}$ war der Effekt der Wachstumsdepression des Tumors zwischen den spezifischen und den unspezifischen scFv nicht signifikant verschieden. Adams schließt daraus, dass ^{213}Bi für die systemische Applikation eine zu kurze HWZ aufweise. Dieser Schluss ist schwer nachzuvollziehen, da spezifische und unspezifische ^{213}Bi -scFv im Vergleich zu unmarkierten scFv sehr wohl signifikant das Tumorwachstum in dieser Studie verlangsamten.

Die Erklärung ist meines Erachtens bei der spezifischen Aktivität zu suchen. An den d9MAk (6H8) konnten 3-5 Chelate an Lysinreste gekoppelt werden. Dennoch war nur an etwa jedes tausendste MAk-Molekül ein ^{213}Bi -Atom gebunden. Zu beachten ist in diesem Zusammenhang, dass während der Koppelungsreaktion deutlich mehr ^{213}Bi -Atome an Chelate und somit MAk binden, durch die relativ kurze Halbwertszeit an jedem späteren Zeitpunkt jedoch schon Zerfälle stattgefunden haben und sich somit dort ^{209}Pb am Chelat findet.

Bei Ak-Fragmenten stehen aufgrund der geringeren Molekülgröße weniger Lysinreste zur Verfügung. Auch bei den Fragmenten (Fab'), die in dieser Studie verwendet wurden, musste festgestellt werden, dass für eine für die Therapie ausreichende Kopplung von ^{213}Bi zu wenig Chelate an die Fab' gebunden waren. Ein Versuch, mehr

CHX-A''-DTPA pro Fab'-Molekül zu binden, resultierte in der Abnahme der Immunreaktivität der Fab', da Chelat-Moleküle auch an Lysinreste an der Antigenbindungsstelle gebunden hatten und diese so blockierten. Adams verwendete ebenfalls CHX-A''-DTPA als Chelator. Im Schnitt waren 1,1 Moleküle dieses Chelates pro spezifischem bzw. 0,8 pro unspezifischem scFv-Molekül gebunden.

Neben dem Antigen/Antikörper-Verhältnis ist auch die Aktivitätskonzentration ein wichtiges Kriterium für die selektive Zytotoxizität, wie Miederer u. Mitarb. in ihren in-vitro-Arbeiten mit MDA-d9- und MDA-WT-Zellen zeigen konnte [2003]. Der optimal selektive Bereich liegt demnach in vitro bei Aktivitätskonzentrationen zwischen 37 und 740 kBq/ml. Da die HSC-Zellen strahlensensibler sind als MDA-Zellen, kann angenommen werden, dass für diese Zelllinie das Optimum der Aktivitätskonzentration noch niedriger ist. Die niedrigste Konzentration, die in der vorliegenden Studie zur Therapie eingesetzt wurde, betrug 3,7 MBq/ml. Ein jüngster Therapieansatz in einer weiterführenden Studie mit 740 kBq/ml zeigt schon jetzt einen erheblich schlechteren Erfolg. Obwohl beide Parameter, nämlich sowohl das Antigen/Antikörper-Verhältnis als auch die Aktivitätskonzentration, noch optimiert werden können, sprechen die Überlebensdaten für die gewählten Größen zu Ungunsten der Spezifität.

Tumorregression nach Therapie mit ^{213}Bi -d9MAk optisch darzustellen ist nicht gelungen, da die Peritoealkarzinose offensichtlich schon zu weit fortgeschritten war. Dass Therapieversuche bei Vorliegen von Aszites nicht mehr geeignet sind, die Entstehung des Aszites abrupt zu unterbinden, wird deutlich, wenn man die Beobachtungen von Butler u. Mitarb. [1975] berücksichtigt. In einem Rattenmodell konnte er 2,3 bis 3,7 μl Flüssigkeitsabfluss pro Minute und Gramm eines Mammakarzinoms messen. Unreife Blutgefäße sind ein Erklärungsansatz für dieses Phänomen [Yuan et al., 1995].

Die vergleichbaren Überlebensdaten der Tiere nach Therapie mit 22,2 MBq ^{213}Bi -d9MAk 24 h nach Zellinokulation mit denen der Mäuse nach i.p. Applikation von 22,2 MBq ohne vorherige Zellinokulation können nur dahingehend interpretiert werden, dass diese Aktivität i.p. appliziert im Zeitraum von etwa 180 d für Nacktmäuse letal ist. Vergleicht man dies mit den Angaben in der Literatur [Nikula et al., 1999], so zeigen sich die Grenzen der Aussagekraft einer LD_{50} ohne Angabe des zugrunde liegenden Beobachtungszeitraumes. Das Erkennen dieser hohen aktivitätsbedingten Toxizität

gab Veranlassung, die zu applizierende Aktivität auf 7,4 MBq und 1,85 MBq zu verringern, - wie sich zeigte, mit überzeugendem Erfolg.

Toxizität des ^{213}Bi -d9MAk

Radioaktivität kann Karzinome sowohl heilen als auch verursachen. Eine sorgfältige Dokumentation der unerwünschten Nebenwirkungen der Radioimmuntherapie mit ^{213}Bi -d9MAk ermöglicht eine Bewertung gegenüber dem therapeutischen Nutzen für den Patienten.

Bei Nacktmäusen konnte gezeigt werden, dass die Auswirkungen der Verabreichung von 7,4 MBq ^{213}Bi -d9MAk auf die Gewichtszunahme marginal sind. Blutentnahmen und selbst das Loch der Ohrmuscheln zur Identifikation der Tiere hatten stärkere Auswirkungen auf die Körpermasse. Erheblich ist jedoch die Gewichtsreduktion nach Inokulation von HSC-Zellen. Diese Zelllinie geht auf physiologische Kardiadrüsenzellen zurück und sezerniert wie diese alkalischen, lysozymhaltigen Schleim, der wahrscheinlich für die Beeinträchtigung der Tiere ursächlich ist. Ein Gewichtsverlust von etwa 6% innerhalb von 48 h ist vermutlich vorwiegend durch Flüssigkeitsverlust verursacht, da die Tiere zum einen Diarrhoe zeigten und zum anderen hochgradig im Allgemeinbefinden beeinträchtigt waren, so dass sie nur ungenügend Wasser aufnahmen. Der Hautturgor war bis etwa 4 d nach Tumorzellinokulation erkennbar reduziert und erholte sich bei Tieren, die RIT erhielten, etwas schneller als bei untherapierten Tieren. Dies kann an der indirekten Flüssigkeitsergänzung durch den Injektionsbolus liegen, da das RIK jeweils ad 0,5 ml mit PBS verdünnt wurde. Gänzlich ausschließen lässt sich auch ein palliativer Effekt der i.p. applizierten RIK nicht, wie er beispielsweise beim Menschen bei Schmerztherapie mit Yttrium-90, Strontium-89 oder Rhenium-186-markierten Phosphonaten bei multipler Skelettmetastasierung erzielt wird. Im Allgemeinbefinden weniger beeinträchtigte Mäuse würden mehr Futter und Wasser aufnehmen. In der Literatur konnten keine Hinweise auf ähnlich schwerwiegende Auswirkungen von xenotransplantierten Tumorzellen auf das Wirtstier gefunden werden.

Eine weitere Möglichkeit zur Erfassung der Toxizität von RIK bietet die Beurteilung der Knochenmarksschädigung mittels Leukozytenzahlveränderungen. Wong u. Mitarb. [2000] leiten ihren Artikel über die Häufigkeiten stabiler chromosomaler Translokationen bei Patienten nach RIT mit der Aussage ein, dass Schätzungen über

die Knochenmarksdosis nach RIT deshalb so schwierig seien, weil jeglicher widerspruchsfreie Zusammenhang zwischen der RIT-Dosis und der zu beobachtenden Bluttoxizität fehle. Dies wurde in der vorliegenden Studie widerlegt. Im untersuchten Aktivitätsbereich von 1,85 MBq bis 29,6 MBq zeigte sich ein deutlicher, wenn auch nicht direkt proportionaler Zusammenhang zwischen der applizierten Aktivität und der Reduktion der Leukozyten. Dass das Minimum der Leukozytenzahl nach Applikation von 22,2 MBq $^{213}\text{Bi-d9MAk}$ erst um den 10. Tag p. i. erreicht wurde, im Gegensatz zur Situation nach Applikation niedrigerer Aktivitäten, nach denen der Tiefpunkt am 2. Tag auftrat, scheint mit der unterschiedlichen Sensibilität und Lebensdauer der Blutzellfraktionen im Zusammenhang zu stehen. Lymphozyten erleiden nach Bestrahlung die schnellste und zahlenmäßig größte Einbuße. Granulozyten nehmen etwas später langsam an Zahl ab, erst danach setzt eine merkliche Reduktion von Thrombozyten und Erythrozyten ein [Fritz-Niggli, 1988].

Über die Strahlenempfindlichkeit der Lymphzellen bei Mäusen existieren genaue Angaben. Je nach Größe und somit Differenzierungsgrad der Lymphozyten beträgt die Dosis zum Überleben von 37% der bestrahlten Zellen (D_{37}) im Thymus 0,6 Gy für die großen Lymphozyten und 4,3 Gy für die kleinen Lymphozyten. In Lymphknoten liegt D_{37} bei etwa 2 Gy. Die Proliferation immunkompetenter Lymphozyten wird durch 0,7 Gy gehemmt [Cronkite, 1973]. Es wäre also durchaus denkbar, dass durch die Applikation von bis zu 7,4 MBq $^{213}\text{Bi-d9MAk}$ eine Blut- bzw. Knochenmarksdosis erreicht wurde, die zwar die Lymphozyten schädigte und somit zur raschen Veränderung des Blutbildes führte, nicht jedoch die Granulopoese betraf. Mit der Injektion von 22,2 MBq könnte die Dosis erreicht sein, welche auch die Granulopoese schädigt und somit zu einem protrahierten Effekt auf die Leukozytenzahlen führt. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen Ng u. Mitarb. [2001] in einer Studie nach i.p. Injektion von ^{90}Y -markiertem Ak. Sofern keine letalen Strahlendosen verabreicht wurden, waren innerhalb von zwei Monaten in jedem Fall die Normwerte der Leukozytenzahl wieder erreicht.

Mittels Analyse chromosomaler Aberrationen hofft man, auch Langzeitschäden erfassen zu können. Zwar sind viele der Chromosomen- oder Chromatidtyp-aberrationen für die Zelle letal, so dass diese während der ersten folgenden Zellteilung nicht repliziert werden und sich so der Beurteilung entziehen, einige Veränderungen

wie beispielsweise Inversionen oder Translokationen sind jedoch offenbar stabiler und bleiben über mehrere Zellteilungen bestehen [Al Achkar et al., 1988; Lucas, 1996].

Die Untersuchung der chromosomalen Schäden in dieser Studie ergab Zunahmen der Anzahl der geschädigten Zellen und im Schädigungsgrad, also in der Anzahl der geschädigten Chromosomen pro Zelle, von einzelnen mäßigen 4 h nach RIK-Applikation über wenige auch schwere und multiple Aberrationen 8 h nach RIK-Applikation bis zu zahlreichen Aberrationen aller Schädigungsklassen 24 h nach Injektion gleicher Aktivitäten des RIK. Die für diesen Zeitpunkt in der vorliegenden Studie nachgewiesene Abhängigkeit der Quantität chromosomaler Veränderungen von der applizierten Aktivität bietet die Grundlage für biologische Dosimetrie. Die Analyse der Typenverteilung zeigte ausschließlich den Chromosomentyp bei allen Chromosomen, die bis 8 h nach RIK-Applikation fixiert wurden und nur Chromatidtyp bei Fixierung ab 24 h.

Der Typ der Aberration hängt von der Zyklusphase ab, in der die Zellen bestrahlt werden. So werden Chromosomentypaberrationen in der G₁-Phase induziert, Chromatidtypaberrationen im Allgemeinen in der S- und in der G₂-Phase nach Aufspaltung des Chromosoms in zwei Chromatiden (Abb.29). Eine Übersetzung von Chromatidtypaberrationen zu sog. „derived“ Chromosomenaberrationen ist jedoch möglich. Die Zellzyklusdauer von Knochenmarkszellen der Maus beträgt etwa 12 h, wovon die G₁-Phase die längste Zeit in Anspruch nimmt, die S-Phase und G₂-Phase

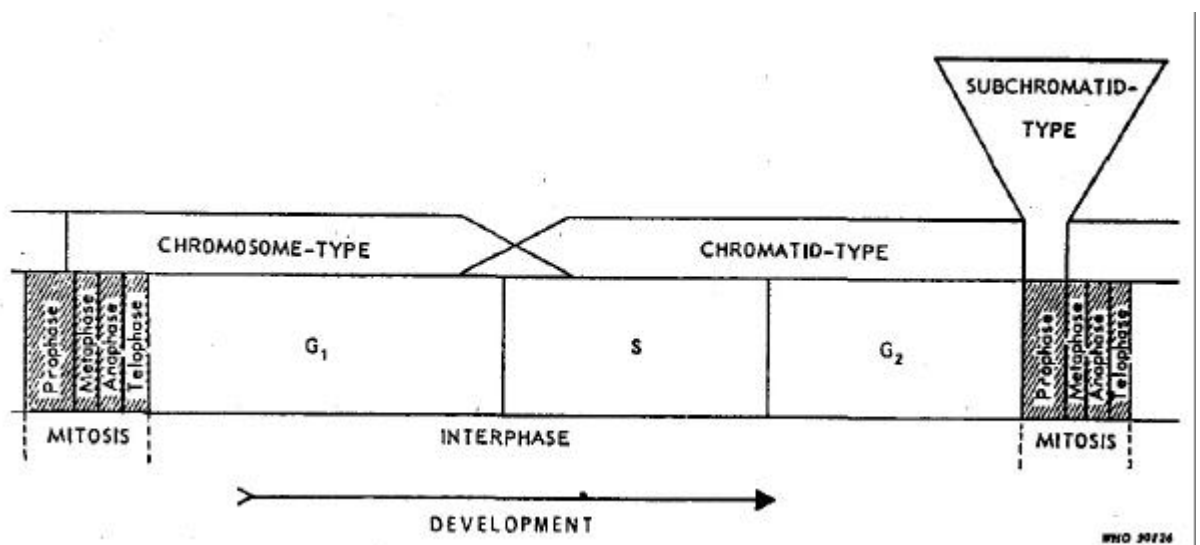


Abb. 29: Zusammenhang zwischen dem induzierten Aberrationstyp und der Zellzyklusphase zum Zeitpunkt der Bestrahlung [aus: Olsson et al., 1972]

hingegen jeweils nur 2 bis 3 h dauern. Da in vivo die Bestrahlung nur durch die HWZ des ^{213}Bi zeitlich begrenzt und die Zellpopulation nicht synchronisiert ist, werden die Zellen während mehrerer Phasen des Zellzyklus bestrahlt. Dennoch müssten erwartungsgemäß 24 h nach RIK-Applikation vorwiegend Chromosomentypaberrationen und innerhalb von etwa 6 h nach Strahlenexposition vorwiegend Chromatidtypaberrationen sichtbar sein, da das Beobachtungsfenster die Mitose ist. Dies steht im Gegensatz zu der oben erwähnten Beobachtung, bei der nach 24 h die Chromatidtypaberrationen dominieren. Physiologisch befinden sich nur 3-4% der Zellen in Teilung. Die Wahrscheinlichkeit für einen Chromosomenschaden ist daher normalerweise erheblich höher als für einen Chromatidtypschaden. Die Applikation von ConA 24 h vor der Fixierung der Chromosomen stimuliert jedoch die Zellteilung. Bei allen Analysen, bei denen die Fixierung der Chromosomen einen Zeitabstand = 4 h zur ^{213}Bi -d9MAk-Applikation aufwies, war also ein deutlich höherer Anteil der Zellen im Moment der Bestrahlung in Teilung, und somit die Wahrscheinlichkeit für Chromatidtypaberrationen erheblich größer.

Der zeitliche Ablauf des Zellzyklus kann durch radioaktive Bestrahlung auf verschiedene Weise beeinträchtigt werden. So kann eine Arretierung des Zellzyklus am G_1/S -Phasenübergang nach Bestrahlung sowohl mit niedrigem als auch mit hohem linearem Energietransfer (LET) beobachtet werden. Die Zahl der betroffenen Zellen korreliert dabei mit der Höhe des LET und der Strahlendosis [Gadbois et al., 1996]. Für diesen „Checkpoint“, an dem die Arretierung geschädigter Zellen stattfindet, gibt es einen Restriktionspunkt, der sich etwa 3 h vor dem G_1/S -Phasenübergang befindet. Ist der Restriktionspunkt überschritten, kann der Durchlauf der S-Phase nicht mehr verhindert werden. Somit werden Aberrationen, die knapp vor der S-Phase, also in der späten G_1 -Phase entstanden sind, weiter prozediert, während Zellen, deren Schädigung in der frühen G_1 -Phase eintrat, möglicherweise eine Verzögerung des Zellzyklus erfahren. Zu einem Block an den „Checkpoints“ führt beispielsweise ein DNS-Schaden. Wenn derart irritierte Zellen die Mitose nicht im Beobachtungszeitraum erreichen, werden ihre Aberrationen auch nicht sichtbar. Allerdings kann eine G_1/S -Phasenarretierung bei DNS-Schäden durch eine Zellstimulierung mit Mitogenen umgangen werden [Harms-Ringdahl et al., 1996]. Eine weitere Arretierung, nämlich in der G_2 -Phase, wird fast ausschließlich nach Hoch-LET-Bestrahlung beobachtet [Kastan et al., 1991].

Eine Theorie dafür, dass in dieser Studie das zeitliche Auftreten von Chromosomen- und Chromatidtypaberration konträr zu den Erwartungen beobachtet wurde, bietet möglicherweise eine Kombination aus Effekten der Zellteilungsstimulation mittels ConA und der Arretierung der Zellen an den Checkpoints. Die Zellen werden durch ConA 24 h vor der Fixierung zur Teilung angeregt und treten aus der längerdauernden G₁-Phase in die S-Phase ein. Bei zeitgleicher Injektion der ²¹³Bi-d9MAk trifft die Radioaktivität daher in den nächsten Stunden vermehrt auf Zellen in S- und G₂-Phase bis nach sieben HWZ, bei ²¹³Bi also etwa nach 5 h und 20 min, weniger als 1% der Aktivität verblieben ist. Nun tritt die G₂-Phasenarretierung ein, um mögliche Reparaturen in der Zelle vorzunehmen. Dies führt zu einer Teilsynchronisation der geschädigten Zellen, da ungeschädigte Zellen kürzer an den Checkpoints aufgehalten werden. Nur langsam werden die Zellen - auch zum Teil noch mit Schäden - in die Mitose entlassen und dort mittels Demecolzin, das den Mäusen 4 h vor Knochenmarkspräparation verabreicht wurde, endgültig arretiert. Weder die Zellteilungsstimulierung noch der Peak der Aktivität im Blut ereignen sich ad hoc, so dass dieser gesamte beschriebene Ereignisverlauf über den Zeitraum von 24 h vorstellbar ist.

Umgekehrt waren diejenigen Zellen, die nach 8 h fixiert wurden, zum Zeitpunkt der Bestrahlung bereits seit etwa 16 h durch ConA zur Teilung stimuliert worden. Die Wahrscheinlichkeit, das Gros der proliferierenden Zellen jetzt in G₀- oder G₁-Phase anzutreffen, ist daher deutlich höher als für Phasen, in denen Chromatidtypaberrationen induziert werden. Nur ein Teil der Zellen, die durch die Radioaktivität geschädigt wurden, wird innerhalb der kurzen Zeitspanne die Mitose erreichen und sich so erfassen lassen. Zwar kann die G₁/S-Phasenarretierung aufgrund der ConA-Mitogenstimulierung umgangen werden, aber S- und G₂-Phase dauern je 2 bis 3 h und schließlich werden einige Zellen in der G₂-Phasenarretierung zurückgehalten. Noch weniger Zellen erreichen 4 h nach der Bestrahlung die Mitose, was sich im von der Dosis scheinbar unabhängigen Auftreten der Chromosomenveränderungen niederschlägt.

Unterstützt werden die Resultate der vorliegenden Studie durch die Beobachtungen von Kadhim u. Mitarb. [2001], die T-Lymphozyten nach Bestrahlung mit einzelnen α -Teilchen hinsichtlich des Aberrationstyps analysierten. Sie beobachteten sogar noch nach 12 bis 13 Zellteilungen eine Häufung von Chromatidtypaberrationen und

schließen daraus, dass abhängig von der Art der Bestrahlung, dem Zelltyp und den genetischen Eigenschaften der Zellen eine besondere Instabilität im Chromosom induziert werden kann.

Eine Bestrahlung mit hohem LET ist charakterisiert durch übermäßig viele komplexe Chromosomenaberrationen, bei denen definitionsgemäß mindestens drei Brüche in zwei oder mehr Chromosomen auftreten [Anderson et al., 2000; Goodhead, 1994]. Infolgedessen ist die Wahrscheinlichkeit für betroffene Zellen, eine Zellteilung zu überleben, stark reduziert. Dies erklärt das Fehlen von Aberrationen im Knochenmark von Mäusen drei Tage nach Applikation von ^{213}Bi -d9MAk.

Um den in der Literatur vielfach erwähnten „Bystander-Effekt“ [Mothersill und Seymour, 1998] zu untersuchen, erscheinen die MDA-d9-Zellen als interessante Studienobjekte, und zwar aufgrund ihrer reduzierten Zell-Zell-Interaktionen im Vergleich zu den strahlensensibleren MDA-WT-Zellen. Wenn man beispielsweise eine Mischkultur aus den beiden Zelllinien mit einer definierten Anzahl an α -Teilchen bestrahlte [Sawant et al., 2002] und nach klonogenem Assay mittels Immunfluoreszenz die jeweilige Identität jedes Klons bestimmte, könnte man beim Vergleich mit den Verhältnissen in Monokulturen der Zelllinien Indizien erhalten, ob bei MDA-d9-Zellen nur der Empfang oder auch das Senden des Signals für den „Bystander-Effekt“ gestört ist.

Die meisten in der RIT etablierten Radionuklide schädigen von allen Organen das Knochenmark am stärksten. Obwohl die Niere zu den mäßig strahlenresistenten Organen zählt, stellt sie in der ^{213}Bi -Immuntherapie das dosislimitierende Organ dar. Ursächlich dafür sind zwei Mechanismen. Zum einen wird freies Bi in Einschlusskörperchen der Nieren gespeichert und zum anderen reabsorbieren die Nieren selektiv niedermolekulare Proteine, insbesondere kleinere Peptide. Der letztgenannte Effekt kann durch Applikation von kationischen Aminosäuren wie D-Lysin abgeschwächt werden [Behr et al., 1997]. Diese Nierenprotektion wird in nuklearmedizinischen Kliniken bei RIT an Patienten schon routinemäßig vorgenommen.

Die pathologischen Auswirkungen der Bestrahlung auf die Niere sind Folge verschiedenster funktioneller und struktureller Störungen. Eine Nierenbelastung mit 5 bis 20 Gy führt beim Menschen nach einem Intervall von 5-8 Monaten zu einer Hypertonie. Erst nach längerem Bestehen der Hypertonie treten Schäden am

Parenchym auf, und nach 20 bis 25 Gy kann sich einige Monate später eine Strahlungs-Nephrose einstellen. Nach Dosen über 30 Gy wurde innerhalb weniger Monate eine Strahlungs-Fibrose beobachtet, die zur Niereninsuffizienz führen kann [Bargon, 1973]. Es verwundert daher, dass Brechbiel nach i.p. Applikation von 37 MBq (1 mCi) eines ^{213}Bi -Immunkonjugates keine "overt toxicity" bei Nacktmäusen beobachten konnte [2001].

Eine mögliche Toxizität von ^{209}Bi , dem stabilen Zerfallsprodukt aus ^{213}Bi , spielt aufgrund der geringen Menge, die bei der RIT eingesetzt wird, keine Rolle, wie ein Rechenbeispiel zeigt: nach der Formel „ $N=(Akt[\text{Bq}] \times t_{1/2}[\text{s}])/\ln 2$ “ errechnet sich bei einer Applikation von 37 MBq (1mCi) ^{213}Bi eine Menge von 50,7 pg Bi. Im Schnitt werden jedoch 10 bis 20 µg Bismut täglich pro Person aufgenommen, ohne die Gesundheit zu beeinträchtigen [Bertholf und Renoe, 1982].

Die Maus im Tiermodell

Die anatomisch-bildgebende Darstellung von Tumormanifestation oder -regression mittels Kernspintomographie oder „Optical Imaging“ sowie die Darstellung durch Szintigraphie sind aufgrund des hohen personellen wie zeitlichen Aufwands in der Regel nur für Einzeltiere praktikabel und nicht für Routineuntersuchungen geeignet. Für die Etablierung eines Tiermodells sind solche Darstellungsmethoden jedoch von erheblichem informativem Wert. So kann an wenigen Tieren in vivo beispielsweise das Ausmaß der Metastasierung im Abdominalraum durch „Optical Imaging“ erfasst oder mittels Szintigraphien eine erste Biokinetik eines Radiopharmakons zumindest semiquantitativ beurteilt werden. Dieses Vorgehen birgt Potential zum Einsparen von Versuchstieren.

Die natürliche Lebenserwartung homozygoter Nacktmäuse setzt Flanagan 1966 mit 8 bis 9 Monaten (244-275 d) fest. Als frühe Todesursache wird auch jetzt noch das sog. "Wasting-disease-like"-Syndrom genannt. Die Pathogenese verläuft über eine Anreicherung von IgM im Kreislauf, die wegen der eingeschränkten Immunkompetenz nicht in hochspezifische IgG-Antikörper übersetzt werden und so zur Autoimmunerkrankung führen. Auslöser für die IgM-Bildung können auch apathogene Keime wie Darmbewohner und -passanten sein. Charles River verzeichnet, dass 50% der Mäuse, die in ihren Stallungen natürlichen Todes sterben, den 21. Lebensmonat (ca. 680 Tage) erreichen. In der vorliegenden Studie wurden Tiere nach Applikation

von 7,4 MBq $^{213}\text{Bi-d9MAk}$ und somit erwiesenermaßen mit vorübergehender Leukopenie über 15 Monate (466 d) beobachtet. Der Keimdruck war offensichtlich sowohl beim Züchter als auch in den Stallungen des Klinikums gering.

Einige weitere Beobachtungen, die im Umgang mit den Mäusen gemacht wurden, seien festgehalten, um unnötige Belastungen der Tiere zu vermeiden. So wird in einigen Labors das Knochenmark der Mäuse zur Chromosomenanalyse mittels s.c. Injektion einer Hefesuspension stimuliert. Dieses Vorgehen ist aufgrund des offensichtlichen Leidens der Mäuse, das sich in schlechtem Allgemeinbefinden, gesträubtem Fell und Lichtscheue ausdrückt, nicht zu vertreten und obsolet, nachdem in der vorliegenden Studie gezeigt werden konnte, dass ConA den gleichen Zweck erfüllt, ohne die Tiere in dem geschilderten Ausmaß im Befinden zu beeinträchtigen.

Bei Blutentnahme an den lateralen Schwanzvenen trat bei 20% der Nacktmäuse Schwanzspitzennekrose auf, und zwar selbst nach einem scheinbar unproblematischen Entnahmevergange. Bei Nacktmäusen ist die Blutentnahme daher aus der Vena jugularis vorzunehmen. Mehrmalige Injektion oder akzidentelle paravenöse Applikation auch von radioaktivem Material zog hingegen keine derartigen Komplikationen nach sich, genauso wenig wie mehrmalige Blutentnahmen an den lateralen Schwanzvenen bei Balb/c Mäusen.

Klinische Anwendung

Rückblickend auf die Summe der Ergebnisse dieser Studie besteht die einzige Konsequenz in der baldigen Anwendung der hier etablierten Therapieform bei Patienten. Welche Therapie kann schon eine Lebensverlängerung um das 10-fache in Aussicht stellen? Bei Vorliegen eines soliden Magenkarzinoms mit d9-E-Cad ist $^{213}\text{Bi-d9MAk}$ das optimale Therapeutikum zur Prävention einer diffusen Tumorzellaussaat und somit einer Peritonealkarzinose.

Geplant ist zunächst eine perioperative Applikation unmittelbar anschließend an die Resektion des Primärtumors. Die praktische Umsetzung kann an den Erfahrungen, die bei der RIT von Ovarialkarzinomen von Hnatowich u. Mitarb. [1988] gemacht wurden, angelehnt werden. In dieser Studie wurden 37 MBq (1 mCi) eines ^{90}Y -Immunkonjugats ad 150 ml mit NaCl-Lösung verdünnt und den Patientinnen i.p. appliziert. Ein größeres Volumen der RIK-Lösung könnte zur besseren Verteilung zwischen den

Darmschlingen führen. Das Entstehen von Spülkanälen muss durch manuelle Bewegung des Darmkonvoluts vermieden werden. Der Aufwand für den Strahlenschutz im Umgang mit ^{213}Bi ist dabei im Vergleich zu den meisten, in der RIT eingesetzten Radionukliden relativ gering. Alpha-Teilchen können schon durch intakte OP-Handschuhe zurückgehalten werden. Lediglich der γ -Anteil der Strahlung muss aus Gründen des Strahlenschutzes berücksichtigt werden. Die vergleichsweise kurze Halbwertszeit von ^{213}Bi ist hinsichtlich des Strahlenschutzes von Vorteil, da das Pflegepersonal nur wenige Stunden lang nach der RIT durch den Patienten mit Strahlung belastet wird. Außerdem weist kontaminiertes OP-Besteck innerhalb eines Tages kaum mehr Radioaktivität auf.

Bei Mäusen wird die maximale RIK-Konzentration im Blut 2 h nach i.p. Applikation erreicht, bei Menschen erst nach 24 h [Rowlinson et al., 1987; Epenetos et al., 1987], also für ^{213}Bi nach etwa 32 Halbwertszeiten. Sieben Halbwertszeiten reichen aus, um die Radioaktivität auf weniger als 1% zu reduzieren. Somit liegt zu der Zeit, in der durch die maximale Anreicherung des RIK im Blut das höchste Toxizitätsrisiko für den Patienten bestehen würde, keine Aktivität mehr vor.

Eine Applikation von ^{213}Bi -d9MAk wäre auch bei schon manifester Peritonealkarzinose von therapeutischem Gewinn. Hierbei sollte aber evtl. vorhandener Aszites vor dem Einsatz des RIK abgesaugt werden, da darin flotierende Tumorzellen ^{213}Bi -d9MAk binden und so die Konzentration der Radioaktivität an chirurgisch schlechter erreichbaren Mikrometastasen senken. Bei etablierter Peritonealkarzinose wären auch Kombinationen aus α - und β -Emitter vorstellbar. Bei Chemotherapien wird beispielsweise längst nicht mehr nur ein Therapeutikum appliziert. Durch Kombination verschiedener Präparate, welche die Tumorzellen zum gemeinsamen Ziel haben, können die jeweilige Einzeldosis reduziert und so die Nebenwirkungen durch geschickte Kombination auf verschiedene Organe verteilt werden. In diesem Punkt können die Radioimmuntherapeuten die Erfahrung der Onkologen nutzen.

Sichtbare Tumorknötchen von 1 mm Durchmesser enthalten bei einem Zelldurchmesser von 20 μm etwa 1×10^5 Zellen. Bei Metastasen dieser Größe haben sich β -Emitter als den α -Emittlern überlegen gezeigt, während Letztere eine einzigartige Potenz im Abtöten von Einzelzellen bewiesen haben. Die Kombination von β - und α -Emittlern in einer Therapie wird auch von O'Donoghue u. Mitarb. als „Cocktail

approach“ vorgeschlagen [1995]. Sie gehen sogar soweit, die Bedeutung des Begriffs auf Gemische aus Fragmenten und intakten IgG auszudehnen.

Über die ersten Heilungsversuche mit ^{213}Bi -d9MAk sollte aber auch das Fernziel „Antikörperbibliotheken“ nicht aus den Augen verloren werden. Durch intensive Forschung zur Identifikation weiterer tumorspezifischer Moleküle könnte das in dieser Studie vorgestellte Prinzip der Therapie von i.p. disseminierten Einzelzellen auch auf Tumoren in anderen präformierten Körperhöhlen ausgedehnt werden.

Wie auch immer die nächsten Schritte zum Einsatz des Radiotherapeutikums ^{213}Bi -d9MAk aussehen werden, sie sollten nicht nur im Tierversuch sondern auch am Patienten durchgeführt werden. Die Fehler der Kindertage der Nuklearmedizin dürfen, wie Bischof-Delaloye schreibt, nicht wiederholt werden, nämlich dass eine einmal experimentell als exzellent bewiesene Methode immer mehr verfeinert wird, anstatt sie in der klinischen Praxis einzusetzen. Sie plädiert an ihre nuklearmedizinischen Kollegen, nicht in Detailversessenheit zu verfallen, sondern die empirisch arbeitenden Onkologen zum Vorbild zu nehmen, und im Tiermodell funktionierende Therapiestrategien in der Klinik zum Wohl des Patienten umzusetzen [2000]. Dort kann sie für den Patienten maßgeschneidert modifiziert werden, schließlich sollen nicht Mäuse, sondern Patienten therapiert werden. Die Übertragung der in dieser Studie gewonnenen Ergebnisse auf die Situation beim Patienten stellt die nächste Herausforderung der Therapie mit ^{213}Bi -d9MAk dar.

6 Zusammenfassung

Bewertung der lokoregionalen Radioimmuntherapie disseminierter Tumorzellen des diffusen Magenkarzinoms mit einem ^{213}Bi gekoppelten tumorspezifischen Antikörper im Mausmodell

Bei diffusen Magenkarzinomen treten in 50% aller Fälle Mutationen im Gen für das Adhäsionsmolekül E-Cadherin auf. Bei einem Fünftel dieser Mutationen ist Exon 9 deletiert, was die Expression einer mutationsspezifischen Proteinstruktur zur Folge hat (d9-E-Cad). Gegen diese tumorspezifische Bindungsstelle wurde ein monoklonaler Antikörper entwickelt (d9MAk). Dieser Antikörper wurde mit Wismut-213 (^{213}Bi) gekoppelt, einem hochenergetischen α -Emitter mit einer Reichweite von 80 μm im Gewebe, einem hohen linearen Energietransfer (LET) von 100 keV/ μm und einer Halbwertszeit von 45,6 min. Um das therapeutische Potential des lokoregional applizierten ^{213}Bi -Immunkonjugats bei disseminierter Tumorzellaussaat gegen die Nebenwirkungen auf den Organismus beurteilen zu können, wurde ein Modell der Peritonealkarzinose bei Nacktmäusen durch intraperitoneale Inokulation von humanen Magenkarzinomzellen mit d9-E-Cad-Expression entwickelt.

Sonographie und Kernspintomographie zeigten für die Visualisierung abdominaler Tumormanifestation und posttherapeutischer Tumorregression eine unzureichende Auflösung, während die In-vivo-Fluoreszenzanalyse „Optical Imaging“ für diese Anwendungen erste, viel versprechende Ergebnisse lieferte. Diese Darstellungsmethode könnte in weiteren Studien für die Peritonealkarzinose optimiert werden. Mittels Biodistributionsstudien wurde die spezifische Bindung des ^{213}Bi -d9MAk an den Tumor sowie die Verteilung im Organismus im Vergleich zu einem unspezifischen Kontrollantikörper untersucht. Die Bioverteilung zeigte neben einer hochspezifischen Bindung des ^{213}Bi -d9MAk in Tumoren mit d9-E-Cad-Expression niedrige Konzentrationen des Radioimmunkonjugates im Blut und in den Organen. Bei vorliegendem Aszites blieb ein Großteil des ^{213}Bi -d9MAk abdominal retiniert. Die Überlebenszeiten der Tiere nach Inokulation von 1×10^7 Tumorzellen wurden in Abhängigkeit von der applizierten Aktivität des ^{213}Bi -d9MAk in verschiedenen Peritonealkarzinosestadien erfasst. Die mittlere Überlebenszeit von Tieren, die intraperitoneal mit 7,4 MBq

^{213}Bi -d9MAk am Tag 1 nach Tumorzellinokulation therapiert wurden, war mit 232 Tagen etwa zehnmal länger als jene von untherapierten Kontrolltieren, die bereits 24 Tage nach Tumorzellinokulation Aszites, große Tumormassen oder Tumorkachexie zeigten. Bei spezifischer Therapie am Tag 8 nach Tumorzellinokulation, also bei fortgeschrittenem Karzinosestadium, verlängerte sich das Überleben der Mäuse auf 187 Tage. Der Unterschied im mittleren Überleben der Tiere nach Applikation von spezifischem ^{213}Bi -d9MAk bzw. von unspezifischem Radioimmunkonjugat war nur bei Therapie am Tag 8 nach Tumorzellinokulation signifikant, da auch unspezifische Radioimmunkonjugate injiziert am Tag 1 nach Tumorzellinokulation deutliche Therapieerfolge bewirkten.

Eine i.p. applizierte Aktivität von 22,2 MBq (600 μCi) führte etwa 180 Tage p. i. zu chronischem Nierenversagen. Ohne Nierenprotektion durch kationische Aminosäuren stellt die Niere somit das dosislimitierende Organ bei der Therapie mit ^{213}Bi -d9MAk dar. Die Bewertung von Veränderungen der Tiergewichte ergab keinen toxischen Einfluss von 7,4 MBq (200 μCi) ^{213}Bi -d9MAk auf den Säugetierorganismus. Die Leukozytenzahlen zeigten eine Abnahme in Abhängigkeit von der applizierten Aktivität, erholten sich aber innerhalb von 30 Tagen. Die Häufigkeit chromosomaler Aberrationen erhöhte sich mit zunehmender Aktivität bis 24 h nach Injektion des ^{213}Bi -d9MAk. Zu späteren Zeitpunkten waren keine chromosomalen Aberrationen mehr nachweisbar.

Das Radioimmunkonjugat ^{213}Bi -d9MAk eignet sich nach den Resultaten dieser Studie hervorragend für die lokoregionale Anwendung bei disseminierter Tumorzellaussaat im Abdominalraum als Folge primären Magenkarzinoms mit Expression der d9-Mutante des E-Cadherins. Hohe therapeutische Effizienz, insbesondere bei Vorliegen von kleinen Tumorzellaggregaten und Einzelzellen, und niedrige Toxizität zeichnen das neue Radiopharmakon aus. Der therapeutische Einsatz des ^{213}Bi -9MAk empfiehlt sich besonders perioperativ bei Resektion eines soliden Magenkarzinoms zur Prophylaxe der Peritonealkarzinose aufgrund traumatischer Tumorzell dissemination.

7 Summary

Evaluation of locoregional radioimmunotherapy of disseminated tumor cells in diffuse type gastric carcinoma with a ^{213}Bi labelled tumorspecific antibody in a mouse modell

In 50 % of diffuse type gastric carcinomas mutations in the adhesion molecule E-Cadherin are found (d9-E-Cad). A monoclonal antibody has been developed that specifically binds to the most frequent of these mutations, i.e. E-cadherin lacking exon 9 (d9MAb). This antibody was labelled with the high-energetic α -emitter Bismuth-213 (^{213}Bi) with a range in tissue of approximately 80 μm having a half-life of 45.6 min. The therapeutic efficacy of the ^{213}Bi -d9MAb was evaluated in an animal model of peritoneal carcinomatosis developed after intraperitoneal inoculation of human gastric carcinoma cells that express mutated d9E-Cadherin in nude mice and compared to overall toxicity.

Sonography and MRI lacked sufficient spatial resolution for small size tumors, whereas "Optical Imaging" turned out as a promising method for visualizing abdominal tumor spread. This technique should be optimized for micrometastasis by further investigations. Biodistribution studies showed a high binding of ^{213}Bi -d9MAb to tumor cells with d9-E-Cad compared with a non-specific control antibody. High retention of ^{213}Bi -d9MAb in tumor cells expressing mutated E-Cadherin was accompanied by low concentrations of the radioimmunoconjugate in blood and organs. In an already flourishing ascites the major portion of ^{213}Bi -d9MAb was retained abdominally.

The survival times determined for different activities of ^{213}Bi -d9MAb applied intraperitoneally at different stages of peritoneal carcinomatosis were as follows: The mean survival of mice that received 7.4 MBq of ^{213}Bi -d9MAb on the first day after inoculation of tumor cells was 232 d, which is about ten times higher than that of control mice without treatment. The control mice developed ascites, large tumors or tumor cachexia within only 24 days. Specific therapy initiated 8 days after tumor cell inoculation, i.e. at a stage of advanced carcinomatosis, resulted in a mean survival of 187 d. In the event of specific and unspecific radioimmunoconjugate the mean survival differed significantly in the long term between tumor cell inoculation and therapy.

An activity of 22.2 MBq (600 μ Ci) applied intraperitoneally resulted in severe dysfunction of the kidneys and thus was found as lethal within 180 days. Unless protected by cationic amino acids the kidneys delimit the maximum dose of radioactivity in ^{213}Bi -d9MAb-therapy. Variations in body mass did not reveal any toxic influence of 7.4 MBq of ^{213}Bi -d9MAb on the organism. A reduction of leucocytes correlated with the activity applied and was compensated within 30 days even after application of 22.2 MBq of ^{213}Bi -d9MAb. The frequency of chromosomal damages in bone marrow cells increased depending on the applied ^{213}Bi activity. Chromosomal aberrations were detectable only at day 1 after ^{213}Bi -d9MAb injection.

In conclusion, ^{213}Bi -d9MAb shows excellent therapeutic properties when applied locally in order to encounter dissemination of tumor cells of gastric carcinoma that express the d9-mutant of E-Cadherin. ^{213}Bi -d9MAb has high therapeutic efficiency with small tumor cell clusters and single tumor cells and is also characterized by low toxicity. This suggests ^{213}Bi -d9MAb as a prophylactic radiopharmaceutical in resection of solid gastric carcinoma to prevent subsequent peritoneal carcinomatosis.

8 Literaturverzeichnis

- Adams GP, Shaller CC, Chappell LL, Wu C, Horak EM, Simmons HH, Litwin S, Marks JD, Weiner LM, Brechbiel MW. Delivery of the alpha-emitting radioisotope bismuth-213 to solid tumors via single-chain Fv and diabody molecules. *Nucl Med Biol.* 2000;27:339-46.
- Al-Achkar W, Sabatier L, Dutrillaux B. Transmission of radiation-induced rearrangements through cell divisions. *Mutat Res.* 1988;198:191-8.
- Allen BJ, Rizvi SMA, Li Y, Tsui W, Raja C, Graham P, Kearsley J, Thompson J. Targeted alpha therapy for melanoma: preclinical studies and Phase I/II clinical trial. Book of Abstracts, 3rd Alpha-Immuno-Therapy-Symposium, Heidelberg. 2002;13.
- Anderson RM, Marsden SJ, Wright EG, Kadhim MA, Goodhead DT, Griffin CS. Complex chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes as a potential biomarker of exposure to high-LET alpha-particles. *Int J Radiat Biol.* 2000;76:31-42.
- Apostolidis C, Carlos-Marquez R, Janssens W, Molinet R, Nikula T, Quadi A. Cancer treatment using Bi-213 and Ac-225 in radioimmunotherapy. *Nuclear News.* 2001;29-33.
- Bargon G. Radiation pathology of the kidney. *Strahlenschutz Forsch Prax.* 1973;13:99-106.
- Bauchinger M, Schmid E, Braselmann H. Time-course of translocation and dicentric frequencies in a radiation accident case. *Int J Radiat Biol.* 2001;77:553-7.
- Becker KF, Atkinson MJ, Reich U, Becker I, Nekarda H, Siewert JR, Hofler H. E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas. *Cancer Res.* 1994;54:3845-52.
- Becker KF, Kremmer E, Eulitz M, Becker I, Handschuh G, Schuhmacher C, Muller W, Gabbert HE, Ochiai A, Hirohashi S, Hofler H. Analysis of E-cadherin in diffuse-type gastric cancer using a mutation-specific monoclonal antibody. *Am J Pathol.* 1999;155:1803-9.
- Becker KF, Kremmer E, Eulitz M, Schulz S, Mages J, Handschuh G, Wheelock MJ, Cleton-Jansen AM, Hofler H, Becker I. Functional allelic loss detected at the protein level in archival human tumours using allele-specific E-cadherin monoclonal antibodies. *Pathol.* 2002;197:567-74.
- Behr TM, Becker WS, Bair HJ, Klein MW, Stuhler CM, Cidlinsky KP, Wittekind CW, Scheele JR, Wolf FG. Comparison of complete versus fragmented technetium-99m-labeled anti-CEA monoclonal antibodies for immunoscintigraphy in colorectal cancer. *J Nucl Med.* 1995a;36:430-41.

- Behr TM, Sharkey RM, Juweid ME, Blumenthal RD, Dunn RM, Griffiths GL, Bair HJ, Wolf FG, Becker WS, Goldenberg DM. Reduction of the renal uptake of radiolabeled monoclonal antibody fragments by cationic amino acids and their derivatives. *Cancer Res.* 1995b;55:3825-34.
- Behr TM, Sharkey RM, Sgouros G, Blumenthal RD, Dunn RM, Kolbert K, Griffiths GL, Siegel JA, Becker WS, Goldenberg DM. Overcoming the nephrotoxicity of radiometal-labeled immunoconjugates: improved cancer therapy administered to a nude mouse model in relation to the internal radiation dosimetry. *Cancer.* 1997;80:2591-610.
- Behr TM, Memtsoudis S, Sharkey RM, Blumenthal RD, Dunn RM, Gratz S, Wieland E, Nebendahl K, Schmidberger H, Goldenberg DM, Becker W. Experimental studies on the role of antibody fragments in cancer radio-immunotherapy: Influence of radiation dose and dose rate on toxicity and anti-tumor efficacy. *Int J Cancer.* 1998;77:787-95.
- Behr TM, Behe M, Stabin MG, Wehrmann E, Apostolidis C, Molinet R, Strutz F, Fayyazi A, Wieland E, Gratz S, Koch L, Goldenberg DM, Becker W. High-linear energy transfer (LET) alpha versus low-LET beta emitters in radioimmunotherapy of solid tumors: therapeutic efficacy and dose-limiting toxicity of ²¹³Bi- versus ⁹⁰Y-labeled CO17-1A Fab' fragments in a human colonic cancer model. *Cancer Res.* 1999a;59:2635-43.
- Behr TM, Sgouros G, Stabin MG, Behe M, Angerstein C, Blumenthal RD, Apostolidis C, Molinet R, Sharkey RM, Koch L, Goldenberg DM, Becker W. Studies on the red marrow dosimetry in radioimmunotherapy: an experimental investigation of factors influencing the radiation-induced myelotoxicity in therapy with beta-, Auger/conversion electron-, or alpha-emitters. *Clin Cancer Res.* 1999b;5:3031s-3043s.
- Behr TM, Memtsoudis S, Vougioukas V, Liersch T, Gratz S, Schmidt F, Lorf T, Post S, Wormann B, Hiddemann W, Ringe B, Becker W. Radioimmunotherapy of colorectal cancer in small volume disease and in an adjuvant setting: preclinical evaluation in comparison to equitoxic chemotherapy and initial results of an ongoing phase-I/II clinical trial. *Anticancer Res.* 1999c;19:2427-32.
- Behr TM, Blumenthal RD, Memtsoudis S, Sharkey RM, Gratz S, Becker W, Goldenberg DM. Cure of metastatic human colonic cancer in mice with radiolabeled monoclonal antibody fragments. *Clin Cancer Res.* 2000;6:4900-7.
- Bertholf RL, Renoe BW. The determination of bismuth in serum and urine by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta.* 1982;139:287-95.
- Bischof Delaloye A. Radioimmunoimaging and radioimmunotherapy: will these be routine procedures? *Semin Nucl Med.* 2000;30:186-94.

- Bloomer WD, Lipsztein R, Dalton JF. Antibody-mediated radiotherapy. *Cancer*. 1985;55:2229-33.
- Boll RA, Mirzadeh S, Kennel SJ, DePaoli DW, Webb OF. Bi-213 for alpha-particle-mediated radioimmunotherapy. *J Labelled Compds Radiopharm*. 1997;40:341.
- Borchardt PE, Quadri SM, Freedman RS, Vriesendorp HM. Intraperitoneal radioimmunotherapy with human monoclonal IGM in nude mice with peritoneal carcinomatosis. *Cancer Biother Radiopharm*. 2000;15:53-64.
- Brechbiel MW, Gansow OA. Backbone-substituted DTPA ligands for ^{90}Y radioimmunotherapy. *Bioconjug Chem*. 1991;2:187-94.
- Brechbiel MW. Chelated metal ions for therapeutic and diagnostic applications. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2001;226:627-8.
- Bruckberger. Situation der Nuklearmedizin. Therapie 1991 in Deutschland. AGLMB, Nieders. Sozialministerium. 1992.
- Buchsbaum DJ. Experimental tumor targeting with radiolabeled ligands. *Cancer*. 1997;80:2371-7.
- Buchsbaum DJ. Experimental radioimmunotherapy. *Semin Radiat Oncol*. 2000;10:156-67.
- Butler TP, Grantham FH, Gullino PM. Bulk transfer of fluid in the interstitial compartment of mammary tumors. *Cancer Res*. 1975;35:3084-8.
- Camera L, Kinuya S, Garmestani K, Wu C, Brechbiel MW, Pai LH, McMurry TJ, Gansow OA, Pastan I, Paik CH, et al. Evaluation of the serum stability and in vivo biodistribution of CHX-DTPA and other ligands for yttrium labeling of monoclonal antibodies. *J Nucl Med*. 1994;35:882-9.
- Caron PC, Co MS, Bull MK, Avdalovic NM, Queen C, Scheinberg DA. Biological and immunological features of humanized M195 (anti-CD33) monoclonal antibodies. *Cancer Res*. 1992;52:6761-7.
- Co MS, Avdalovic NM, Caron PC, Avdalovic MV, Scheinberg DA, Queen C. Chimeric and humanized antibodies with specificity for the CD33 antigen. *J Immunol*. 1992;148:1149-54.
- Cope DA, Dewhirst MW, Friedman HS, Bigner DD, Zalutsky MR. Enhanced delivery of a monoclonal antibody F(ab')₂ fragment to subcutaneous human glioma xenografts using local hyperthermia. *Cancer Res*. 1990;50:1803-9.
- Cronkite EP. Radiosensitivity of lymphocytes. *Strahlenschutz Forsch Prax*. 1973;13:13-23.
- Curie I, Joliot F. Artificial production of a new kind of radioactive element. *Nature*. 1934;133:201.

- Demetrick JS, Liggins RT, Machan L, Davis NL, Burt HM, Hunter WL. The development of a novel intraperitoneal tumor-seeding prophylactic. *Am J Surg.* 1997;173:403-6.
- Dulce MC, Kaiser J, Boese-Landgraf J, Scheffler A, Haring R, Ernst H. [Experiences with intraoperative radiotherapy in gastric carcinoma (Berlin method)] *Strahlenther Onkol.* 1991;167:581-90.
- Edinger M, Sweeney TJ, Tucker AA, Olomu AB, Negrin RS, Contag CH. Noninvasive assessment of tumor cell proliferation in animal models. *Neoplasia.* 1999;1:303-10.
- Ehrlich P: The collected papers of Paul Ehrlich. *In: Himmelweit F. Immunology and Cancer Research, London.* 1957;2:505-518.
- El-Bahrawy MA, Talbot IC, Poulson R, Jeffery R, Alison MR. The expression of E-cadherin and catenins in colorectal tumours from familial adenomatous polyposis patients. *J Pathol.* 2002;198:69-76.
- Emfietzoglou D, Kostarelos K, Sgouros G. An analytic dosimetry study for the use of radionuclide-liposome conjugates in internal radiotherapy. *J Nucl Med.* 2001;42:499-504.
- Epenetos AA, Munro AJ, Stewart S, Rampling R, Lambert HE, McKenzie CG, Soutter P, Rahemtulla A, Hooker G, Sivolapenko GB, et al. Antibody-guided irradiation of advanced ovarian cancer with intraperitoneally administered radiolabeled monoclonal antibodies. *J Clin Oncol.* 1987;5:1890-9.
- Fischer K. Experimentelle Studien zur lokoregionalen Radioimmunotherapie disseminierter Tumorausbreitung am Beispiel des diffusen Magnkarzinoms mit einem tumorspezifischen, an den α -Emitter Bi-213 gekoppelten Antikörper. *Diss. Tierärztliche Fakultät LMU-München.* 2001.
- Flanagan SP. 'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet Res.* 1966;8:295-309.
- Flynn AA, Green AJ, Pedley RB, Boxer GM, Boden R, Begent RH. A mouse model for calculating the absorbed beta-particle dose from (131)I- and (90)Y-labeled immunoconjugates, including a method for dealing with heterogeneity in kidney and tumor. *Radiat Res.* 2001;156:28-35.
- Fraker PJ, Speck JC Jr. Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphrenylglycoluril. *Biochem Biophys Res Commun.* 1978;80:849-57.
- Fritz-Niggli H. *Strahlengefährdung/ Strahlenschutz.* Hans Huber Verlag Bern Stuttgart Toronto. 1988.

- Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, Lochner D, Birchmeier W. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol.* 1991;113:173-85.
- Gadbois DM, Crissman HA, Nastasi A, Habbersett R, Wang SK, Chen D, Lehnert BE. Alterations in the progression of cells through the cell cycle after exposure to alpha particles or gamma rays. *Radiat Res.* 1996;146:414-24.
- Gangwer TE, Goldstein M, Pillay KKS. Radiation effects on ion exchange materials. BNL 50781, 1977;p60.
- Goddu SM, Rao DV, Howell RW. Multicellular dosimetry for micrometastases: dependence of self-dose versus cross-dose to cell nuclei on type and energy of radiation and subcellular distribution of radionuclides. *J Nucl Med.* 1994;35:521-30.
- Goldenberg DM. Targeted therapy of cancer with radiolabeled antibodies. *J Nucl Med.* 2002;43:693-713.
- Goodhead DT. Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *Int J Radiat Biol.* 1994;65:7-17.
- GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science). Empfehlung zur Blutentnahme bei Versuchstieren, insbesondere kleinen Versuchstieren. 1999.
- Hall EJ. Molecular biology in radiation therapy: the potential impact of recombinant technology on clinical practice. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1994;30:1019-28.
- Hall EJ. Radiation, the two-edged sword: cancer risks at high and low doses. *Cancer J.* 2000;6:343-50.
- Hamacher KA, Den RB, Den EI, Sgouros G. Cellular dose conversion factors for alpha-particle--emitting radionuclides of interest in radionuclide therapy. *J Nucl Med.* 2001;42:1216-21.
- Handschuh G, Candidus S, Luber B, Reich U, Schott C, Oswald S, Becke H, Hutzler P, Birchmeier W, Hofler H, Becker KF. Tumour-associated E-cadherin mutations alter cellular morphology, decrease cellular adhesion and increase cellular motility. *Oncogene.* 1999;18:4301-12.
- Harms V. Biomathematik, Statistik und Dokumentation. Harms Verlag, Kiel.1992.
- Harms-Ringdahl M, Nicotera P, Radford IR. Radiation induced apoptosis. *Mutat Res.* 1996;366:171-9.
- Heeger S, Moldenhauer G, Egerer G, Wesch H, Eisenmenger A, Martin S, Nikula T, Apostolidis C, Janssens W, Brechbiel M, Ho AD, Haas R. Alpha-radioimmunotherapy of B-cell non-Hodgkin's lymphoma using Bi-213-labelled anti-CD19- and anti-CD20-CHX-A''-DTPA conjugates. *Book of Abstracts, 3rd Alpha-Immuno-Therapy-Symposium, Heidelberg.* 2002;12.

- Hevesy G. Introduction of tracer techniques using early form of Geiger counter. *Biochem J.* 1923;17:439.
- Hippo Y, Yashiro M, Ishii M, Taniguchi H, Tsutsumi S, Hirakawa K, Kodama T, Aburatani H. Differential gene expression profiles of scirrhous gastric cancer cells with high metastatic potential to peritoneum or lymph nodes. *Cancer Res.* 2001;61:889-95.
- Hnatowich DJ, Chinol M, Siebecker DA, Gionet M, Griffin T, Doherty PW, Hunter R, Kase KR. Patient biodistribution of intraperitoneally administered yttrium-90-labeled antibody. *J Nucl Med.* 1988;29:1428-35.
- Horan PK, Jensen BD, Slezak SE. inventors. Methods for labelling viable cells with cyanine dyes. US patent 4,783,401. 1988.
- Humm JL. A microdosimetric model of astatine-211 labeled antibodies for radioimmunotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1987;13:1767-73.
- Huneke RB, Pippin CG, Squire RA, Brechbiel MW, Gansow OA, Strand M. Effective alpha-particle-mediated radioimmunotherapy of murine leukemia. *Cancer Res.* 1992;52:5818-20.
- Ishikawa Y, Wada I, Fukumoto M. Alpha-particle carcinogenesis in Thorotrast patients: epidemiology, dosimetry, pathology, and molecular analysis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2001;20:311-5.
- Iyer M, Berenji M, Templeton NS, Gambhir SS. Noninvasive imaging of cationic lipid-mediated delivery of optical and PET reporter genes in living mice. *Mol Ther.* 2002;6:555-62.
- Jain RK. Delivery of novel therapeutic agents in tumors: physiological barriers and strategies. *J Natl Cancer Inst.* 1989;81:570-6.
- Jurcic JG, Caron PC, Nikula TK, Papadopoulos EB, Finn RD, Gansow OA, Miller WH Jr, Geerlings MW, Warrell RP Jr, Larson SM, et al. Radiolabeled anti-CD33 monoclonal antibody M195 for myeloid leukemias. *Cancer Res.* 1995;55:5908s-5910s.
- Jurcic JG. Antibody therapy of acute myelogenous leukemia. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals.* 1999;15:319-326.
- Jurcic JG, Larson SM, Sgouros G, McDevitt MR, Finn RD, Divgi CR, Ballangrud AM, Hamacher KA, Ma D, Humm JL, Brechbiel MW, Molinet R, Scheinberg DA. Targeted alpha particle immunotherapy for myeloid leukemia. *Blood.* 2002;100:1233-9.

- Kadhim MA, Marsden SJ, Malcolmson AM, Folkard M, Goodhead DT, Prise KM, Michael BS. Long-term genomic instability in human lymphocytes induced by single-particle irradiation. *Radiation Research*. 2001;155:122-126.
- van Kaick G, Wesch H, Luhrs H, Liebermann D. Radiation-induced primary liver tumors in "Thorotrast patients". *Recent Results Cancer Res*. 1986;100:16-22.
- Kamigaki T, Yamamoto M, Ohyanagi H, Ohya M, Shimazoe T, Kono A, Ohtani W, Narita Y, Ohkubo M, Saitoh Y. Therapy and imaging of pancreatic carcinoma xenografts with radioiodine-labeled chimeric monoclonal antibody A10 and its Fab fragment. *Jpn J Cancer Res*. 1995;86:1216-23.
- Kaplan E, Meier P. Non-parametric estimation from incomplete observations. *Journal of American Statistical Association*. 1958;23:457-481.
- Kasakura Y, Phan A, Ajani J. Adjuvant therapy for resected gastric carcinoma. *Surg Oncol Clin N Am*. 2002;11:431-44, xii-xiii.
- Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res*. 1991;51:6304-11.
- Kennel SJ, Lankford, Mirzadeh S. Vascular targeting for radioimmunotherapy with ²¹³Bi. *Radiochimica Acta*. 1997;79: 87-91.
- Kennel SJ, Stabin M, Yoriyaz H, Brechbiel M, Mirzadeh S. Treatment of lung tumor colonies with ⁹⁰Y targeted to blood vessels: comparison with the alpha-particle emitter ²¹³Bi. *Nucl Med Biol*. 1999a;26:149-57.
- Kennel SJ, Stabin M, Roeske JC, Foote LJ, Lankford PK, Terzaghi-Howe M, Patterson H, Barkenbus J, Popp DM, Boll R, Mirzadeh S. Radiotoxicity of bismuth-213 bound to membranes of monolayer and spheroidcultures of tumor cells. *Radiat Res*. 1999b;151:244-56.
- Kennel SJ, Davis IA, Branning J, Pan H, Kabalka GW, Paulus MJ. High resolution computed tomography and MRI for monitoring lung tumor growth in mice undergoing radioimmunotherapy: correlation with histology. *Med Phys*. 2000;27:1101-7.
- Kennel SJ, Lankford T, Davern S, Foote L, Taniguchi K, Ohizumi I, Tsutsumi Y, Nakagawa S, Mayumi T, Mirzadeh S. Therapy of rat tracheal carcinoma IC-12 in SCID mice: vascular targeting with [²¹³Bi]-MAb TES-23. *Eur J Cancer*. 2002;38:1278-87.
- Khaw BA, Yasuda T, Gold HK, Leinbach RC, Johns JA, Kanke M, Barlai-Kovach M, Strauss HW, Haber E. Acute myocardial infarct imaging with indium-111-labeled monoclonal antimyosin Fab. *J Nucl Med*. 1987;28:1671-8.
- Khaw BA, Strauss HW, Narula J. "Magic bullets:" from muskets to smart bombs!!! *J Nucl Med*. 1993;34:2264-8.

- Khazaeli MB, Conry RM, LoBuglio AF. Human immune response to monoclonal antibodies. *J Immunother.* 1994;15:42-52.
- Kobayashi H, Wu C, Yoo TM, Sun BF, Drumm D, Pastan I, Paik CH, Gansow OA, Carrasquillo JA, Brechbiel MW. Evaluation of the in vivo biodistribution of yttrium-labeled isomers of CHX-DTPA-conjugated monoclonal antibodies. *J Nucl Med.* 1998;39:829-36.
- Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975;256:495-7.
- Kokkola A, Sipponen P. Gastric carcinoma in young adults. *Hepatogastroenterology.* 2001;48:1552-5.
- Kuus-Rachel K, Graver LS, Korawvodin LM et al. Will immunogenicity limit the use, efficacy and future development of therapeutic monoclonal antibodies. *Clinical and Diagnostic laboratory immunology.* 1994;1:365-372.
- Kvinnslund Y, Stokke T, Aurlien E. Radioimmunotherapy with alpha-particle emitters: microdosimetry of cells with a heterogeneous antigen expression and with various diameters of cells and nuclei. *Radiat Res.* 2001;155:288-96.
- Lang PL, White WJ. Growth, development, life span, and select lesion incidence in the aging CD-1® mouse. *Charles River Deutschland.* 1997.
- Larsen RH, Hoff P, Vergote IB, Bruland OS, Aas M, de Vos L, Nustad K. α -particle radiotherapy with ^{211}At -labeled monodisperse polymer particles, ^{211}At -labeled IgG proteins, and free ^{211}At in a murine intraperitoneal tumor model. *Gynecol Oncol.* 1995;57:9-15.
- Ledermann JA, Begent RH, Massof C, Kelly AM, Adam T, Bagshawe KD. A phase-I study of repeated therapy with radiolabelled antibody to carcinoembryonic antigen using intermittent or continuous administration of cyclosporin A to suppress the immune response. *Int J Cancer.* 1991;47:659-64.
- Lim S, Lee HS, Kim HS, Kim YI, Kim WH. Alteration of E-cadherin-mediated adhesion protein is common, but microsatellite instability is uncommon in young age gastric cancers. *Histopathology.* 2003;42:128-36.
- Link EM, Carpenter RN. ^{211}At -methylene blue for targeted radiotherapy of human melanoma xenografts: treatment of micrometastases. *Cancer Research.* 1990;50:2963-2967.
- Litterst CL, Torres IJ, Arnold S, McGunagle D, Furner R, Sikic BI, Guarino AM. Adsorption of antineoplastic drugs following large-volume ip administration to rats. *Cancer Treat Rep.* 1982;66:147-55.

- Lorenz R, Krestin GP, Schmitz-Rixen T, Arnold G. The significance of sonography and computed tomography for the diagnosis of the intraperitoneal spread of tumors. Findings in 307 cases of peritoneal carcinosis. *Rofo Fortschr Geb Rontgenstr Neuen Bildgeb Verfahr.* 1990;152:516-22.
- Lucas JN, Hill FS, Burk CE, Cox AB, Straume T. Stability of the translocation frequency following whole-body irradiation measured in rhesus monkeys. *Int J Radiat Biol.* 1996;70:309-18.
- Ma D, McDevitt MR, Finn RD, Scheinberg DA. Breakthrough of ^{225}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.* 2001a;55:667-78.
- Ma D, McDevitt MR, Finn RD, Scheinberg DA. Rapid preparation of short-lived alpha particle emitting radioimmunopharmaceuticals. *Appl Radiat Isot.* 2001b;55:463-70.
- Macklis RM, Kinsey BM, Kassis AI, Ferrara JL, Atcher RW, Hines JJ, Coleman CN, Adelstein SJ, Burakoff SJ. Radioimmunotherapy with alpha-particle-emitting immunoconjugates. *Science.* 1988;240:1024-6.
- 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;130:220-6.
- Mahe MA, Fumoleau P, Fabbro M, Guastalla JP, Faurous P, Chauvot P, Chetanoud L, Classe JM, Rouanet P, Chatal JF. A phase II study of intraperitoneal radioimmunotherapy with iodine-131-labeled monoclonal antibody OC-125 in patients with residual ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res.* 1999;5:3249s-3253s.
- 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;50:895-904.
- Miederer M, Seidl C, Beyer GJ, Charlton DE, Vranjes-Duric S, Comor JJ, Huber R, Nikula T, Apostolidis C, Schuhmacher C, Becker KF, Senekowitsch-Schmidtke R. Comparison of the radiotoxicity of two alpha-particle-emitting immunoconjugates, terbium-149 and bismuth-213, directed against a tumor-specific, exon 9 deleted (d9) E-Cadherin adhesion protein. *Radiation Research.* 2003;159 (in press)
- Milenic DE, Roselli M, Mirzadeh S, Pippin CG, Gansow OA, Colcher D, Brechbiel MW, Schlom J. In vivo evaluation of bismuth-labeled monoclonal antibody comparing DTPA-derived bifunctional chelates. *Cancer Biother Radiopharm.* 2001;16:133-46.

- Mirzadeh C, Kennel SJ. Optimizations of radiolabeling of immunoproteins with Bi-213. Abstracts of Papers of the American Chemical Society. 1996;212:62-NUCL.
- Morant R. Neoadjuvant and adjuvant chemotherapy of locally advanced stomach cancer. *Onkologie*. 2001;24:116-21.
- Morell A, Terry WD, Waldmann TA. Metabolic properties of IgG subclasses in man. *J Clin Invest*. 1970;49:673-80.
- Mothersill C, Seymour CB. Mechanism and implications of genomic instability and other delayed effects of ionizing radiation exposure. *Mutagenesis*. 1998;13:421-426.
- Müller WA, Luz A, Murray AB, Linzner U. Induction of lymphoma and osteosarcoma in mice by single and protracted low alpha doses. *Health Phys*. 1990;59:305-10.
- Muthuswamy MS, Roberson PL, Buchsbaum DJ. A mouse bone marrow dosimetry model. *J Nucl Med*. 1998;39:1243-7.
- Ng B, Kramer E, Liebes L, Wasserheit C, Hochster H, Blank E, Ceriani R, Furmanski P. Radiosensitization of tumor-targeted radioimmunotherapy with prolonged topotecan infusion in human breast cancer xenografts. *Cancer Res*. 2001;61:2996-3001.
- Nicol PD, Khaw BA. Monoclonal antibody imaging. In: Marcus ML, Schelbert HR, Skorton DJ, Wolfe GL, eds. *Cardiac imaging: a companion to Braunwald's heart disease*. Philadelphia: WB Saunders Co. 1991:1110-1120.
- Nikula TK, McDevitt MR, Finn RD, Wu C, Kozak RW, Garmestani K, Brechbiel MW, Curcio MJ, Pippin CG, Tiffany-Jones L, Geerlings MW Sr, Apostolidis C, Molinet R, Geerlings MW Jr, Gansow OA, Scheinberg DA. Alpha-emitting bismuth cyclohexylbenzyl DTPA constructs of recombinant humanized anti-CD33 antibodies: pharmacokinetics, bioactivity, toxicity and chemistry. *J Nucl Med*. 1999;40:166-76.
- Ninomiya Y, Yanagisawa A, Kato Y, Tomimatsu H. Unrecognizable intramucosal spread of diffuse-type mucosal gastric carcinomas of less than 20 mm in size. *Endoscopy*. 2000;32:604-8.
- O'Donoghue JA, Bardies M, Wheldon TE. Relationships between tumor size and curability for uniformly targeted therapy with beta-emitting radionuclides. *J Nucl Med*. 1995;36:1902-9.
- O'Donoghue JA, Baidoo N, Deland D, Welt S, Divgi CR, Sgouros G. Hematologic toxicity in radioimmunotherapy: dose-response relationships for I-131 labeled antibody therapy. *Cancer Biother Radiopharm*. 2002;17:435-43.

- Ogawa S, Menon RS, Tank DW, Kim SG, Merkle H, Ellerman JM, Ugurbil K. Functional brain mapping by blood oxygenation level-dependent contrast magnetic resonance imaging. A comparison of signal characteristics with biophysical model. *Biophys J.* 1993;64:803-12.
- Olsson O, Strnad F, Vieten H, Zuppinger A. *Handbuch der medizinischen Radiologie Encyclopedia of medical radiology.* Sonderdruck. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York. 1972.
- Onkologische Arbeitsgemeinschaft Saar-Pfalz-Mosel e.V. *Onkologie* 2002/03. Preiß, Dormoff, Hagmann, Schmieder Zuckschwerdt Verlag. 2001.
- Press OW, Shan D, Howell-Clark J, Eary J, Appelbaum FR, Matthews D, King DJ, Haines AM, Hamann P, Hinman L, Shochat D, Bernstein ID. Comparative metabolism and retention of iodine-125, yttrium-90, and indium-111 radioimmunoconjugates by cancer cells. *Cancer Res.* 1996;56:2123-9.
- Primus FJ, Wang RH, Goldenberg DM, Hansen HJ. Localization of human GW-39 tumors in hamsters by radiolabeled heterospecific antibody to carcinoembryonic antigen. *Cancer Res.* 1973;33:2977-82.
- Qiu X, Yang X, Li Q, Wang E. A study of E-cadherin and beta-catenin expression and their correlation with prognosis of nonsmall cell lung carcinoma. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.* 2002;31:318-21.
- Quadi A, Nikula T, Apostolidis C, Carlos R, Janssens W, Molinet R. Chelation and new chelates for Ac-225 and Ra-223. *Book of Abstracts, 3rd Alpha-Immuno-Therapy-Symposium, Heidelberg.* 2002;34.
- Reilly RM. Radioimmunotherapy of malignancies. *Clin Pharm.* 1991;10:359-75.
- Reist CJ, Archer GE, Wikstrand CJ, Bigner DD, Zalutsky MR. Improved targeting of an anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibody in tumor xenografts after labeling using N-succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecarboxylate. *Cancer Res.* 1997;57:1510-5.
- Roth K. *NMR-Tomographie und -Spektroskopie in der Medizin.* Springer Verlag Berlin Heidelberg. 1984.
- Rousseaux J, Rousseaux-Prevost R, Bazin H. Optimal conditions for the preparation of Fab and F(ab')₂ fragments from monoclonal IgG of different rat IgG subclasses. *J Immunol Methods.* 1983;64:141-6.
- Rowlinson G, Snook D, Busza A, Epenetos AA. Antibody-guided localization of intraperitoneal tumors following intraperitoneal or intravenous antibody administration. *Cancer Res.* 1987;47:6528-31.

- Rygaard J. Immunodeficiency in nude mice. *In*: Bastert GBA. Thymusaplastic nude mice and rats in clinical oncology. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York. 1981;3-13.
- Sandmaier BM, Bethge WA, Wilbur DS, Hamlin DK, Santos EB, Brechbiel MW, Fisher DR, Storb R. Bismuth 213-labeled anti-CD45 radioimmunoconjugate to condition dogs for nonmyeloablative allogeneic marrow grafts. *Blood*. 2002;100:318-26.
- Sawant SG, Zheng W, Hopkins KM, Randers-Pehrson G, Lieberman HB, Hall EJ. The radiation-induced bystander effect for clonogenic survival. *Radiat Res*. 2002;157:361-4.
- Schicha H, Schober O. Nuklearmedizin: Basiswissen und klinische Anwendung. 3. Aufl. Schattauer Verlag Stuttgart. 1997.
- Schmid E, Hieber L, Heinzmann U, Roos H, Kellerer AM. Analysis of chromosome aberrations in human peripheral lymphocytes induced by in vitro alpha-particle irradiation. *Radiat Environ Biophys*. 1996;35:179-84.
- Seidenschwang S, Seidl C, Schmid E, Kummermehr J, Apostolidis C, Schwaiger M, Senekowitsch-Schmidtke R. In-vitro Studien zur Quantifizierung der zytotoxischen Wirkung von ²¹³Bi-Immunkonjugaten. Abstractband der 40. Jahrestagung der DGN. Freiburg. 2002;65.
- Senekowitsch R, Schmid P, Mollenstadt S, Kriegel H, Pabst HW. Experimental model for radioimmunotherapy of human ovarian carcinoma with I-131-labeled monoclonal antibody OC 125. *Strahlenther Onkol*. 1989;165:564-6.
- Senekowitsch-Schmidtke R. Antibodies. *In*: Molekular nuclear medicine with antibodies, peptides and nucleotides in diagnosis and therapy- facts and fiction. International Forum Nuclear Medicine. Münz DL. W. Zuckerscherdt Verlag. 2000;5-23.
- Sgouros G, Humm JL, McDevitt MR, Kennedy J, Schumaker R, Larson SM, Scheinberg DA. Bismuth-213 imaging: preclinical characterization of an alpha-particle emitting radionuclide. *J Nucl Med*. 1996;37:78P.
- Sgouros G, Ballangrud AM, Jurcic JG, McDevitt MR, Humm JL, Erdi YE, Mehta BM, Finn RD, Larson SM, Scheinberg DA. Pharmacokinetics and dosimetry of an alpha-particle emitter labeled antibody: ²¹³Bi-HuM195 (anti-CD33) in patients with leukemia. *J Nucl Med*. 1999;40:1935-46.
- Simons TJ. Passive transport and binding of lead by human red blood cells. *J Physiol*. 1986;378:267-86.
- Siewert JR, Sendler A. The current management of gastric cancer. *Adv Surg*. 1999;33:69-93.

- Spivakov BY, Stoyanov FS, Gribov LA, Zolotov YA. Raman laser spectroscopic studies of bismuth(III)halide complexes in aqueous solutions. *J Inorg Nucl Chem.* 1979;14:453-455
- Stinchcomb TG, Roeske JC. Survival of alpha particle irradiated cells as a function of shape and size of the sensitive volume (nucleus). *Radiat Prot Dosim.* 1995;62:157-164.
- Storto G, Buchegger F, Waibel R, Kuenzi G, Offord RE, Schubiger PA, Gillet M, Delaloye AB. Biokinetics of a F(ab')₃ iodine-131 labeled antigen binding construct (Mab 35) directed against CEA in patients with colorectal carcinoma. *Cancer Biother Radiopharm.* 2001;16:371-9.
- Sugarbaker PH. Surgical management of peritoneal carcinosis: diagnosis, prevention and treatment. *Langenbecks Arch Chir.* 1988;373:189-96.
- Sugarbaker PH, Yonemura Y. Clinical pathway for the management of resectable gastric cancer with peritoneal seeding: best palliation with a ray of hope for cure. *Oncology.* 2000;58:96-107.
- Supiot S, Faivre-Chauvet A, Couturier O, Heymann MF, Robillard N, Kraeber-Bodere F, Morandeau L, Mahe MA, Cherel M. Comparison of the biologic effects of MA5 and B-B4 monoclonal antibody labeled with iodine-131 and bismuth-213 on multiple myeloma. *Cancer.* 2002;94:1202-9.
- Syrota A. [Nuclear medicine in vivo and functional imaging. Historical perspective] *Bull Acad Natl Med.* 1996;180:131-40; discussion 140-1.
- Takeichi M. Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr Opin Cell Biol.* 1993;5:806-11.
- Tucker JD, Lee DA, Ramsey MJ, Briner J, Olsen L, Moore DH 2nd. On the frequency of chromosome exchanges in a control population measured by chromosome painting. *Mutat Res.* 1994;313:193-202.
- Van Geel JNC, Fuger JJ, Koch L, inventors. Method for producing actinium-225 and bismuth-213. US patent 5,355,394. 1994.
- Wahl RL. Experimental radioimmunotherapy. A brief overview. *Cancer.* 1994;73:989-92.
- Wetterwald A, van der Pluijm G, Que I, Sijmons B, Buijs J, Karperien M, Lowik CW, Gautschi E, Thalmann GN, Cecchini MG. Optical imaging of cancer metastasis to bone marrow: a mouse model of minimal residual disease. *Am J Pathol.* 2002;160:1143-53.
- Wilder RB, DeNardo GL, DeNardo SJ. Radioimmunotherapy: recent results and future directions. *J Clin Oncol.* 1996 Apr;14(4):1383-400.

- Wong JYC, Chu DZ, Yamauchi DM, Williams LE, Liu A, Wilczynski S, Wu AM, Shively JE, Doroshow JH, Raubitschek AA. A phase I radioimmunotherapy trial evaluating ⁹⁰yttrium-labeled anti-carcinoembryonic antigen (CEA) chimeric T84.66 in patients with metastatic CEA-producing malignancies. *Clin Cancer Res.* 2000;6:3855-63.
- Yang TC, Craise LM, Raju MR. Oncogenic transformation of mammalian cells by ultrasoft X-rays and alpha particles. *Adv Space Res.* 2000;25:2123-30.
- Yanagihara K, Ito A, Toge T, Numoto M. Antiproliferative effects of isoflavones on human cancer cell lines established from the gastrointestinal tract. *Cancer Res.* 1993;53:5815-21.
- Yokota T, Milenic DE, Whitlow M, Schlom J. Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. *Cancer Res.* 1992;52:3402-8.
- Yuan F, Dellian M, Fukumura D, Leunig M, Berk DA, Torchilin VP, Jain RK. Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size. *Cancer Res.* 1995;55:3752-6.
- Yunker VM, Gruntenko EV, Moroskova TS. Leucocyte blood composition in mice C3H/He nu/nu, C3H/He nu/+ and C3H/He [proceedings *Folia Biol (Praha)*. 1978;24:437.
- Zhang M, Yao Z, Saga T, Sakahara H, Nakamoto Y, Sato N, Nakada H, Yamashina I, Konishi J. Improved intratumoral penetration of radiolabeled streptavidin in intraperitoneal tumors pretargeted with biotinylated antibody. *J Nucl Med.* 1998;39:30-3.
- Zhu H, Baxter LT, Jain RK. Potential and limitations of radioimmunodetection and radioimmunotherapy with monoclonal antibodies. *J Nucl Med.* 1997;38:731-41.
- Zweit J. Radionuclides and carrier molecules for therapy. *Phys Med Biol.* 1996;41:1905-14.

DANKSAGUNG

Besonders herzlich bedanke ich mich bei Frau Professor R. Senekowitsch-Schmidtke für die Überlassung des Themas, die Fähigkeit zu begeistern selbst in ergebnisarmen Zeiten und für die Bereitstellung eines gut ausgestatteten Arbeitsplatzes am Institut der Nuklearmedizinischen Klinik und Poliklinik im Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München.

Herrn Doktor C. Seidl danke ich für die hilfreichen Anregungen und Diskussionen während der Erstellung dieser Arbeit und für seine liebenswert ernüchternde Art der Korrektur schriftlicher Arbeiten.

Ebenso möchte ich Herrn Professor K. Tempel für die Betreuung der Doktorarbeit und ihre Vertretung an der Tiermedizinischen Fakultät danken.

Den Mitarbeitern im Labor danke ich für das kollegiale Umfeld und regelmäßige tatkräftige Hilfe bei der Ausführung der Experimente. Mein besonderer Dank gilt dabei Frau C. Bodenstein für die exzellente technische Assistenz und Frau U. Schwaiger für die Pflege der Tiere.

Herrn Professor E. Schmid gilt mein Dank für die Beurteilung der Chromosomen sowie für die aufschlussreichen Gespräche über die Resultate. Frau Haney danke ich herzlich für das einfühlsame Arrangement.

Herrn PD Dr. K.-F. Becker gilt mein Dank für die Bereitstellung der Antikörper und anregende Richtungsweisungen im Umgang damit.

Frau PD Dr. I. Becker, Institut für Pathologie, danke ich für die Unterstützung bei den histopathologischen Auswertungen.

Bei Frau Dr. K. Fischer, Frau S. Daum und Frau S. Alam bedanke ich mich herzlich für die unschätzbare, praktische Starthilfe während meiner Einarbeitungszeit.

Danksagung

Des Weiteren danke ich Herrn Dr. Reidel für die Radiojodmarkierungen, Herrn Dr. Pichler für die Durchführung des „Optical Imagings“, Frau Grahneis und Frau Hoffmann für die Szintigraphie, Herrn Dr. Wieder und Frau Ahrens für die Kernspintomographie, Herrn Dr. Baum und seinem Team um Frau Scherzer für die Messung der Blut- und Nierenfunktionsparameter und den Damen und Herren in der Experimentellen Onkologie und Therapieforschung im Klinikum rechts der Isar für den kollegialen tiermedizinischen Austausch und für die Pflege der Tiere.

Meiner alten und meiner neuen Familie danke ich herzlich für das Stärken und das Freihalten des Rückens und für die sorgfältige Korrektur der schriftlichen Arbeit.

Entscheidende finanzielle Unterstützung erfuhr ich durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Projektnummer: SE 962/2).

Lebenslauf

Roswitha Huber, geboren am 22. März 1973 in Traunstein / Bayern

Schulbildung: 1979 – 1984 Grund- und Teilhauptschule in Surberg

1984 – 1993 Chiemgau-Gymnasium in Traunstein

09.07.1999 Allgemeine Hochschulreife

Studium: 1993 - 1999 Tiermedizinstudium an der
Ludwig-Maximilians-Universität München

22.09.1999 Tierärztliche Approbation

Dissertation: 2000 – 2002 Doktorandin und wissenschaftliche
Angestellte an der Nuklearmedizinischen
Klinik und Poliklinik im Klinikum rechts der
Isar, München, Arbeitsgruppe
Prof. Dr. Dr. Senekowitsch-Schmidtke

Berufstätigkeit: ab 8. 4. 2001 Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der
Nuklearmedizinischen Klinik und Poliklinik
im Klinikum rechts der Isar der Technischen
Universität München