

Aus dem medizinischen Zentrum für Radiologie

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,

Standort Marburg

Klinik für Nuklearmedizin

Direktor: Prof. Dr. med. T. M. Behr



---

**Entwicklung Radiometall-markierter Somatostatin-Analoga  
Internalisierungsversuche mit DOTA- $\beta$ -Ala-TOC an der  
Hamsterglucagonomzelllinie INR1-G9**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Fabienne Caime

aus Magdeburg

Marburg 2010

Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Philipps-Universität Marburg am 24.06.2010  
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. T. M. Behr

Korreferent: PD Dr. V. Ellenrieder

*„Die Neugier steht immer an erster Stelle eines Problems, das gelöst werden will.“*

(Galileo Galilei 1564-1642)

# INHALTSVERZEICHNIS

---

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Neuroendokrine Tumoren</b>	<b>1</b>
1.1.1	Epidemiologie und Stadieneinteilung	1
1.1.2	Klinik	2
1.1.3	Diagnostik	3
1.1.4	Therapie	5
<b>1.2</b>	<b>Somatostatin und seine Analoga</b>	<b>8</b>
1.2.1	Somatostatin und die Somatostatin-Rezeptorfamilie	8
1.2.2	<sup>111</sup> In-DTPA-[D-Phe <sup>1</sup> ]-Octreotid (Octreoscan®)	10
1.2.3	<sup>90</sup> Y-DOTA-[D-Phe <sup>1</sup> -Tyr <sup>3</sup> ]-Octreotid (DOTATOC)	12
1.2.4	DOTA-β-Ala-TOC	15
<b>1.3</b>	<b>Internalisierung</b>	<b>16</b>
1.3.1	Regulatorische Peptide	16
1.3.2	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	17
1.3.3	Prinzip der Internalisierung	21
<b>1.4</b>	<b>Szintigraphie</b>	<b>21</b>
1.4.1	Grundlagen	21
1.4.2	Tracer	22
1.4.3	Peptidszintigraphie	23
<b>1.5</b>	<b>Die Radiopeptidtherapie</b>	<b>26</b>
1.5.1	Therapeutische Anwendung von Somatostatin-Analoga	26
<b>1.6</b>	<b>Konzeption und Zielsetzung</b>	<b>28</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>29</b>
<b>2.1</b>	<b>Materialien und Geräte</b>	<b>29</b>
2.1.1	Zellkultur	29
2.1.1.1	Zelllinie	29
2.1.1.2	Kultivierung der Zellen	29

2.1.1.3	Kulturmedium	30
2.1.1.4	Passagieren adhärenter Zellen	30
2.1.1.5	Kryokonservierung	30
2.1.2	Versuchsmaterialien und Geräte	31
2.1.3	Peptide und <sup>111</sup> In	32
2.1.4	HPLC	32
2.1.5	weitere Materialien	32
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>33</b>
2.2.1	Markierung der Peptide und Qualitätskontrolle	33
2.2.2	Versuchsablauf	34
2.2.2.1	Internalisierungsversuche	34
2.2.2.2	Externalisierungsversuche	36
2.2.2.3	Veranschaulichung der Ergebnisse im Diagramm	37
2.2.3	HPLC	37
2.2.3.1	Grundlagen	37
2.2.3.2	Versuch	39
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>40</b>
<b>3.1</b>	<b>Bindungsstudien</b>	<b>40</b>
3.1.1	Internalisierungsversuche	40
3.1.1.1	DOTATOC	40
3.1.1.2	DOTA-β-Ala-TOC	43
3.1.1.3	Zusammenfassung	48
3.1.2	Externalisierungsversuche	52
3.1.2.1	DOTA-β-Ala-TOC	52
3.1.2.2	Zusammenfassung	54
<b>3.2</b>	<b>HPLC</b>	<b>55</b>
3.2.1	Qualitätskontrolle	55
3.2.2	Externalisierungsversuche	56
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>59</b>
<b>4.1</b>	<b>Bindungsstudien</b>	<b>59</b>
4.1.1	Zellkultur	59
4.1.2	Markierung der Peptide	59
4.1.3	Internalisierungsversuche	61

4.1.4	Externalisierungsversuche	63
<b>4.2</b>	<b>HPLC</b>	<b>64</b>
4.2.1	Qualitätskontrolle	64
4.2.2	Externalisierungsversuche	64
<b>4.3</b>	<b>Fazit</b>	<b>64</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>66</b>
5.1	Einführung	66
5.2	Zielsetzung	66
5.3	Ergebnisse	67
5.4	Schlussfolgerung	67
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>68</b>
<b>7</b>	<b>ABBILDUNGS-, TABELLEN- UND FORMELVERZEICHNIS</b>	<b>76</b>
7.1	Abbildungsverzeichnis	76
7.2	Tabellenverzeichnis	77
7.3	Formelverzeichnis	78
<b>8</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>79</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG</b>	<b>81</b>
9.1	Verzeichnis meiner akademischen Lehrer	81
9.2	Danksagung	82

# 1 Einleitung

## 1.1 Neuroendokrine Tumoren

### 1.1.1 Epidemiologie und Stadieneinteilung

Neuroendokrine Tumoren stellen mit einer Inzidenz von 1-4/100.000 eine sehr seltene Tumorentität dar (NEWTON et al, 1994). Die Patienten befinden sich meist zwischen der 2. und 7. Lebensdekade. Ein Geschlechterunterschied ist nicht erkennbar.

Unabhängig ihrer Lokalisation werden neuroendokrine Tumoren (NET) in funktionell aktive und funktionell inaktive Tumore unterteilt, wobei die funktionell aktiven Tumoren eine Vielzahl verschiedener Peptidhormone (z.B. Insulin), biogene Amine (z.B. Serotonin) sowie Aminosäuretransmitter (z.B. GABA) produzieren können. Diese Übersekretion kann zu den klassischen klinischen Syndromen wie dem Zollinger-Ellison-Syndrom oder dem Karzinoid-Syndrom führen (ARNOLD et al, 2002).

Man unterscheidet eine sporadische und eine seltene hereditäre Form, wobei bei der genetisch determinierten Multiplen Endokrinen Neoplasie (MEN) Typ 1 die Betroffenen im Laufe ihres Lebens verschiedene Neoplasien, vorzüglich der Hypophyse, des Pankreas und der Nebenschilddrüsen entwickeln. Eine Mutation des Tumorsuppressorgens MEN1 auf Chromosomen 11q13 liegt hierbei zugrunde. Die sporadisch auftretenden neuroendokrinen Tumoren sind dagegen meist isoliert im Pankreas, Dünndarm oder Magen lokalisiert (ARNOLD et al, 2002).

Sie machen den größten Anteil endokrin aktiver Tumoren im Gastrointestinaltrakt aus. Ihre Malignität hängt von der Lokalisation und Größe des Primärtumors, der Art der endokrinen Zellen, sowie der endokrinen Aktivität ab. Schwerpunktmäßig wird in Mesenteriallymphknoten, die Leber, die Lunge und das Peritoneum metastasiert.

Im Gegensatz zu epithelialen Tumoren im Gastrointestinaltrakt besitzen NET meist eine eher langsame Proliferationsrate (RINDI et al, 1998). Daher weisen Patienten mit endokrinen Tumoren des GIT ohne Metastasierung

eine 5-Jahresüberlebensrate von fast 100%, bei Metastasierung immer noch eine 5-JÜR von über 50% (MIGNON, 2000).

### **1.1.2 Klinik**

Das klinische Erscheinungsbild neuroendokriner Neoplasien kann einmal durch die Lokalisation der Tumoren und ihrer Metastasen, zum anderen aber durch die erhöhte Konzentration biogener Amine im Blut geprägt werden (SCHYRA et al, 2003). Die Symptomatik wird durch die sezernierten Hormone der endokrin aktiven Tumoren verursacht. Tumoren ohne endokrine Aktivität fallen erst durch ihr infiltratives oder obstruierendes Wachstum oder durch bereits vorhandene Fernmetastasen auf.

Das Intervall zwischen Krankheitsbeginn und Diagnosestellung ist beim insulinproduzierenden Tumor am kürzesten. Nicht selten kommt es aufgrund der Hypoglykämien zu Vigilanzstörungen bis hin zur Bewusstlosigkeit. Die hypoglykämieinduzierten Symptome wie Tachykardie, Tremor, Schwitzen und Heißhunger werden durch eine gewichtssteigernde Nahrungszufuhr versucht zu kompensieren. Bei rezidivierenden atypischen Ulzera der Kardia oder des Magenkorpus entlang der großen Kurvatur beziehungsweise des Duodenums kann man auf das Vorliegen eines Zollinger-Ellison-Syndroms infolge vermehrter Gastrinsekretion schließen. Bei den eher seltenen Glucagonomen werden unspezifische Symptome wie Diabetes mellitus, rezidivierende Beinvenenthrombosen, Diarrhoen, eine nekrotisierende Dermatitis und eine Glossitis beobachtet. Erst durch das infiltrative und verdrängende Wachstum NET des Pankreas fällt es klinisch selten durch einen Ikterus auf. Das Karzinoid-Syndrom mit Flush, Diarrhoen und Bronchokonstriktion tritt bei weniger als 5% der Patienten auf und ist meistens mit dem Vorliegen von Lebermetastasen assoziiert. Wenn Lebermetastasen vorliegen bedeutet dies, dass Serotonin (welches die Symptome verursacht) in den großen Kreislauf gelangt ist. Die überwiegende Mehrzahl der Patienten leidet unter weniger spezifischen Beschwerden wie zum Beispiel Schmerzen, Obstipation, Gewichtsverlust, aber auch an der zum Karzinoidsyndrom zählenden Diarrhoe (SCHYRA et al, 2003). Es



tritt gehäuft bei Primärtumoren des Dün- und Dickdarms auf und wird hervorgerufen durch Serotonin und Neuropeptide wie Tachy- und Bradykinin. Bei einem Drittel der metastasierten NET erleiden die Patienten eine Rechtsherzinsuffizienz als Folge einer Endokardfibrose. Die karzinoidassoziierte Endokardfibrose entwickelt sich durch die Wirkung von unter anderem Serotonin und Neuropeptid K in der Regel rechtsherzbetont. Betroffen sind ca. 35% der Patienten mit metastasiertem Karzinoid (MATON, 1988).

### **1.1.3 Diagnostik**

#### *Nachweis erhöhter Hormonproduktion*

Bei 30% aller gastrointestinalen NET findet man im Urin eine erhöhte 5-Hydroxyindolessigsäure, als Nachweis auf eine vermehrte Serotoninproduktion. Bei einem Insulinom bestimmt man den Blutzucker, den Plasmainsulinspiegel und das C-Peptid im 72-Stunden-Hungerversuch. Mit einem Quotient aus Insulin (mU/l) und Blutglukose (mg/dl) von mehr als 0,3 ist ein insulinproduzierender Tumor nachgewiesen.

Wenn der Gastrinspiegel über 50-100 pg/ml liegt, besteht Verdacht auf ein Gastrinom. Hierbei wird der Sekretintest durchgeführt, der beweisend ist, wenn der bereits basal erhöhte Gastrinwert nach Stimulation um mindestens 100% ansteigt.

#### *Bildgebende Verfahren*

Die Lokalisation eines endokrin aktiven Tumors erweist sich oft als schwierig. Die oft weniger als 1 cm großen Tumoren werden durch CT und Sonographie nur in 20-45% der Fälle dargestellt. Durch Anwendung der Endosonographie erhöht sich die Zahl vor allem bei Insulinomen auf 70%. MRT-Untersuchungen führen zu 40% zum Tumornachweis (ARNOLD et al, 2004 und KRENNING et al, 1995). In vielen Fällen gelingt aber nur die Lokalisation von dem zum Teil gegenüber dem Primärtumor oft deutlich größeren Fernmetastasen.

Eine große Anzahl neuroendokrin aktiver Tumoren besitzen Somatostatin-Rezeptoren, an die auch radioaktiv markierte Somatostatin-Analoga

binden. Primärtumoren und ihre Metastasen können somit durch eine Gammakamera in planarer und SPECT-Technik in 80% der Fälle nachgewiesen werden (siehe auch Abbildung 4: Sensitivität der Indium-DTPA-Phe1-Octreotid-Szintigraphie sowie Befunde der in VITRO-SSTR-EXPRESSION bei verschiedenen Tumoren (nach BEHR et al, 2001)). Die Sensitivität der Somatostatin-Rezeptor-Szintigraphie für NET nimmt mit zunehmendem Entdifferenzierungsgrad des NET ab. So zeigt die Somatostatin-Rezeptor-Szintigraphie in einer Studie an 63 Patienten eine Sensitivität von 95% für hoch differenzierte neuroendokrine Tumore (Gastrinome nahe 100%), von 86% für hoch differenzierte neuroendokrine Karzinome und 60% für niedrig differenzierte neuroendokrine Karzinome (CIMETAN et al, 2003). Beim Insulinom zeigt die Somatostatin-Rezeptor-Szintigraphie - im Gegensatz zu allen anderen NET des GET - eine deutlich geringe Sensitivität von lediglich 10 – 50%. Dies ist durch die beim Insulinom häufig fehlende Expression der Somatostatin-Rezeptoren Typ 2 oder 5 bedingt.

Nur eine Kombination mehrerer konventioneller bildgebender Verfahren erreicht ein befriedigendes Ergebnis zur präoperativen Lokalisationsdiagnostik von NET. Fast alle dieser Tumoren können durch eine intraoperative Sonographie identifiziert werden (GROSS et al, 2003).

#### *Nachweis von Tumormarkern*

Bei endokrin aktiven Tumoren empfiehlt es sich den Hormonspiegel im Blut und im Urin zur Verlaufdiagnostik zu bestimmen. Weiterhin kann Chromogranin A zum Verlauf der Erkrankung herangezogen werden, da NET immunreaktives CgA kosezernieren (SOLCIA et al, 2000). Die Lebenserwartung von Patienten mit einem Chromogranin A-Spiegel von mehr als 75 nmol/l ist signifikant reduziert.

Je nach endokriner Aktivität des Tumors können Hormone wie Gastrin oder Serotonin, in seltenen Fällen – etwa bei der MEN – auch Calcitonin oder Substanz P als Tumormarker zur Verlaufskontrolle herangezogen werden.

Der Tumormarker NSE wird in der Klinik fast doppelt so häufig verwendet wie Chromogranin A. Das NSE kann auch bei Neuroblastomen stark und

in etwas geringerem Grade bei medullären Thyroidtumoren erhöht sein. Bei Phäochromozytomen kann das NSE ebenfalls erhöht sein. Weiterhin werden zum immunhistologischen Nachweis Synaptophysin und Chromogranin A verwendet. Der Proliferationsmarker Ki67 hat sich in den letzten Jahren als Prognosemarker etabliert.

#### **1.1.4 Therapie**

Die Therapie von NET stellt eine interdisziplinäre Aufgabe dar. Bei Tumoren ohne Fernmetastasen ist die chirurgische Resektion Therapie der ersten Wahl und einzige kurative Therapieoption. Die Tumorverkleinerung durch chirurgisches Debulking oder arterielle Embolisation der Lebermetastasen hat einen hohen Stellenwert bei den langsam wachsenden NET.

Bei unvollständiger chirurgischer Entfernung sollte eine medikamentöse Langzeittherapie zur Symptomreduktion und Proliferationshemmung durchgeführt werden. Zur symptomatischen Behandlung stehen heute Somatostatin-Analoga (z.B. Octreotid), welche die Hormonfreisetzung beim Karzinoid-Syndrom reduzieren und zu einer Wachstumsretardierung führen, sowie Protonenpumpeninhibitoren zur Kontrolle des Zollinger-Ellison-Syndroms zur Verfügung (METZ et al, 1995).

Die dritte Therapiemöglichkeit ist die immunstimulierende Therapie mit  $\alpha$ -Interferon. In 20-40% der Fälle konnte eine Stabilisierung des Hormonspiegels und in 12-20% der Fälle eine Tumolvolumenreduktion beobachtet werden (ARNOLD et al, 1996). Eine antiproliferative systemische Chemotherapie ist bei inoperablen Tumoren indiziert. Die Mehrzahl der NET spricht allerdings nicht auf eine Chemotherapie an. Maligne endokrine Tumoren des Pankreas sprechen auf eine Kombination aus Streptozotozin und Doxorubicin oder Streptozotozin und 5-Fluorouracil an, wohingegen NET nichtpankreatischen Ursprungs auf Chemotherapie praktisch nicht ansprechen. Eine deutliche Verbesserung durch diese Kombinationstherapie findet man beim metastasierten Insulinom und VIPom. Patienten mit extrapankreatischen Karzinoid profitieren nicht von einer Chemotherapie (MORTEL et al, 1991).

Auch nach chirurgischer Tumorresektion kann durch eine antiproliferative Kombinationstherapie mit Somatostatin und Interferon- $\alpha$  eine weitere Tumorreduktion erreicht werden (ARNOLD et al, 2005).

Als Rezeptor-bindendes Radioligandentherapeutikum dienen beispielsweise  $^{90}\text{Y}$ - oder  $^{177}\text{Lu}$ -markierte Somatostatin-Analoga. In Studien zeigt sich eine klinische Verbesserung, sowie eine Reduktion der TumorgroÙe bei den Patienten (OTTE et al, 1993).

$^{90}\text{Y}$ -DOTATOC wurde in Studien an den Zentren Rotterdam und Basel untersucht. Es wurde ein Stillstand des Tumorwachstums bei 69% von Patienten mit unterschiedlichen neuroendokrinen Tumoren und verschiedenen vorhergegangenen Therapien beobachtet, allerdings über einen kurzen Beobachtungszeitraum von zwei bis zwölf Monaten. Eine komplette Rückbildung fand sich bei fast fünf Prozent, eine partielle Rückbildung bei 18% und ein Fortschreiten bei acht Prozent der Patienten (WALDHERR et al, 2005).

$^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC ist wirksam bei Patienten mit neuroendokrinen Tumoren, aber auch Paragangliomen und Meningeomen. Die Ansprechrate ist allerdings geringer als bei neuroendokrinen Tumoren des Gastrointestinaltraktes (VAN ESSEN et al, 2006). Eine Therapie mit  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC bei Patienten, welche vorher mit  $^{90}\text{Y}$ -DOTATOC behandelt wurden sind und bei denen ein Rezidiv auftritt ist effektiv und gut verträglich (FORRER et al, 2005). In Tierversuchen mit Ratten zeigte sich durch eine kombinierte Therapie mit  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE und  $^{90}\text{Y}$ -DOTATOC eine höhere Wirksamkeit als bei der alleinigen Gabe einer der beiden Substanzen (DE JONG et al, 2005). DOTATATE oder auch DOTA-[Tyr<sup>3</sup>]Octreotat genannt, hat eine etwa neunmal höhere Affinität zu sstr 2 als DOTATOC. Zusammen mit  $^{177}\text{Lu}$  wird es als  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Tyr<sup>3</sup>-Octreotat eingesetzt (KWEKKEBOOM et al, 2003)

Derzeit als für eine Radioligandentherapie geeignet angesehen sind Patienten mit multiplen inoperablen Metastasen, bei denen ein Zytostatikatherapie keinen Erfolg brachte. Der Tumor und deren Metastasen müssen sstr 2- und/oder sstr 5-Rezeptoren exprimieren. Das ist noch wichtiger für die Therapie als die Radiosensibilität des Tumors (REUBI et al, 2005).

Ähnlich wie bei der lokalen Chemoembolisation und Chemoperfusion gibt es für fortgeschrittenen Tumoren der Leber und Lebermetastasen die Therapiemöglichkeit der selektiven internen Radiotherapie (SIRT), bei der Kunstharzkügelchen (Sphären) mit Radionukliden (z.B.: Yttrium-90) beladen werden und über die Leberarterie in die Leber gelangen. Diese Methode wird vor allem bei Patienten durchgeführt, welche für eine Operation oder systemische Chemotherapie ungeeignet sind.

### *Sandostatin*<sup>®</sup>

Das synthetisierte Somatostatin-Analogon Octreotid hat eine 30fach verlängerte biologische Halbwertszeit als Somatostatin-14 oder -28 ( $t_{1/2} = 3 \text{ min}$ ). Es kann subkutan appliziert werden und zur passageren Hemmung der durch überschießende Hormonproduktion verursachten Symptomatik eingesetzt werden. Die Diarrhoen und die Flushsymptomatik von Patienten mit Karzinoidsyndrom können bei einer Tagesdosierung von bis zu 3 mal 200 µg reduziert werden. Bei Patienten mit hormonell aktiven Tumoren des Verdauungssystems am Beginn 0,05 mg s.c. (unter die Haut) ein- bis zweimal pro Tag. Unter Berücksichtigung der Verträglichkeit und der Wirkung kann die Dosierung schrittweise auf dreimal 0,1 - 0,2 mg täglich gesteigert werden. Ausnahmsweise kann mehr (bis zu 1,5 mg täglich) erforderlich sein. Die Erhaltungsdosis wird vom behandelnden Arzt individuell angepasst. Die Dauer der Behandlung liegt so lange ein Ansprechen der Therapie nachweisbar ist. Es steht auch ein Depotpräparat zur Verfügung. Nach intramuskulärer Verabreichung hat es eine Wirkdauer von drei bis vier Wochen. Die Wirksamkeit kann am Abfall der entsprechenden Hormonwerte kontrolliert werden. Beim Glucagonom ist die Octreotidtherapie erste Wahl. Das Insulinom weist eine geringere Somatostatin-Rezeptordichte auf und ist somit nur bei der Hälfte der Patienten zur Vermeidung von Hypoglykämien anwendbar. Nur 50% der Insulinome exprimieren überhaupt Somatostatin-Rezeptoren.

Die Hinweise verdichten sich, dass Sandostatin<sup>®</sup> eine antiproliferative Wirkung hat. Bei einer Langzeittherapie mit Octreotid wird die exokrine Pankreasfunktion gehemmt, der Glukosestoffwechsel gestört und durch Hemmung der Gallenblasenentleerung werden vermehrt Gallensteine

gebildet. Daher sollte bei diesen Patienten alle drei Monate eine Sonographie der Gallenblase erfolgen. Als Hauptnebenwirkungen werden Diarrhoen und Steatorrhoen benannt.

## 1.2 Somatostatin und seine Analoga

### 1.2.1 Somatostatin und die Somatostatin-Rezeptorfamilie

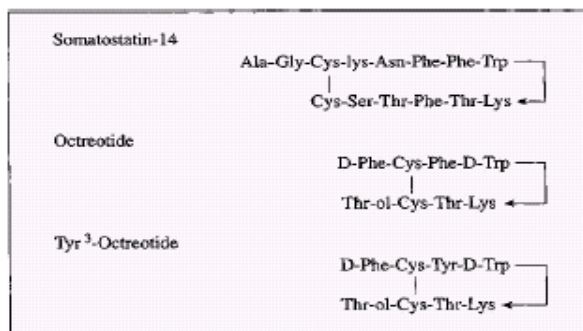


Abbildung 1: Struktur des natürlichen Somatostatin-14 und seiner stabilisierten Analoga (BEHR et al, 2001)

Somatostatin (SMS) ist ein zyklisches Peptidhormon, das 1973 zum ersten Mal aus Rinderhypothalamus-Gewebe isoliert wurde und in zwei natürlich vorkommenden, biologisch aktiven Formen existiert. Sowohl das aus 14 Aminosäuren bestehende Somatostatin-14 als auch das Somatostatin-28 werden biosynthetisch aus dem Polypeptid-Vorläufer Prosomatostatin hergestellt.

Bei der Entdeckung des Hormons wurde festgestellt, dass es die Ausschüttung von Wachstumshormon GH (growth hormon) inhibiert. Der Neurotransmitter Somatostatin ist im gesamten Gastrointestinaltrakt in endokrinen Zellen und Nerven lokalisiert. Er ist ein Inhibitor für die Gastrin-, Glucagon- und Insulinfreisetzung einschließlich Magen- und Pankreassekretion. Dem Somatostatin lassen sich eine Vielzahl physiologischer Funktionen zuschreiben. Es spielt eine Rolle bei der Hormonsekretion, sowie der Mitose. Ein antiproliferativer Effekt ließ sich bisher nur in der Zellkultur erkennen. Auf zellulärer Ebene inhibiert es die Aktivität der Adenylatcyclase sowie den Strom der Kalziumionen, während der Strom von Kaliumionen potenziert wird.

Die unterschiedlichen Funktionen von Somatostatin lassen sich mit einer Familie von fünf Plasmamembran-Rezeptoren (sstr 1-5) in Verbindung bringen, die von einer Vielzahl von normalen und malignen Zellen exprimiert werden (ALUMETS et al, 1977). Dies gilt insbesondere für den Somatostatin-Rezeptor Subtyp 2 (sstr 2). Im Zusammenhang mit der Tatsache, dass sstr 2 die Wachstumshormon-Sekretion und damit die Zellproliferation steuert, wird die Bedeutung des Rezeptors als „target“ für die Krebstherapie deutlich. Vom sstr 5 vermutet man, dass er für die Inhibition der Insulinausschüttung verantwortlich ist, was ihn für die Behandlung von insulinabhängigem Diabetes interessant macht (JOHANSSON et al, 1981). Der sstr 3 wird für die Inhibierung von Magensäure- und Acetylcholinsekretion verantwortlich gemacht. Die Wirkstoffforschung der letzten Jahre auf dem Somatostatin-Gebiet hatte deswegen als primäres Ziel, sstr 2- und sstr 5-selektive Liganden, aber auch Pan-sstr-Liganden zu finden, die eine lange Halbwertszeit in vivo besitzen (JANECKA et al, 2001).

Die genannten Rezeptoren gehören zur Klasse der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Die natürlichen Mitglieder der Somatostatin-Rezeptorfamilie binden an alle fünf Subtypen und besitzen eine kurze Halbwertszeit von ca. 2 Minuten. Synthetische Analoga hingegen weisen häufig eine starke Selektivität für ein oder mehrere Subtypen auf. Es wurde festgestellt, dass bei einem Austausch des L-Trp<sup>8</sup> gegen ein D-Trp<sup>8</sup> die Affinität um das 6-8-fache ansteigt, und dass die Aminosäuren Phe<sup>6</sup>, Phe<sup>7</sup>, D-Trp<sup>8</sup>, Lys<sup>9</sup> und Phe<sup>11</sup> essentiell für die agonistische Suppression der GH-Freisetzung sind. Durch Verschiebung der Cysteine auf die Position Cys<sup>6</sup> und Cys<sup>11</sup>, die Beibehaltung des D-Trp<sup>8</sup> und die Einführung eines C-terminalen Threoninols oder Threonins (=DOTATATE) und N-terminalen D-Phe<sup>5</sup> gelang es, einen peptidischen Agonisten zu finden, der eine hohe Protease-/Peptidase-Stabilität besitzt und der im Vergleich zu SMS-14 die GH-Sekretion um den Faktor 45-70 stärker inhibiert (BAUER et al, 1982). Das sogenannte Octreotid 244 (SMS-201-995) wird in der Klinik als antineoplastischer Wirkstoff zur Behandlung von Akromegalie eingesetzt. Das metabolisch stabilisierte Octreotid hat eine hohe Affinität zum sstr 2 und sstr 5-Rezeptor-Subtyp auf. Die Affinität zum sstr 3 wird als mäßig

beschrieben. Der sstr 1 wird im Gegensatz zu den anderen Subtypen nicht in relevantem Ausmaß internalisiert.

Es finden sich auch hohe Sensitivitäten der Somatostatin-Rezeptor-Szintigraphie mit Octreotid bei Hypophysentumoren, Paragangliomen, Neuroblastomen und anderen Tumoren neuronalen Ursprungs, Meningeomen und granulomatösen Erkrankungen. Octreotide und DOTATOC besitzen die höchste Affinität zu sstr 1 und sstr 5 (REUBI et al, 1997).

Tumor	SRS-1	SRS-2	SRS-3	SRS-4	SRS-5
Neuroblastom		100%			
Meningeom		100%			
Medulloblastom		100%			
Mammakarzinom	3%	97%			
Lymphome		100%			
Nierenzellkarzinom		100%			
Paragangliom	20%	80%			
kleinzelliges Bronchial Ca.		100%			
Hepatom		100%			
Prostatakarzinom	100%				
Sarkome	89%	11%			
inaktive Hypophysenadenome	3%	50%	57%		13%
aktive Hypophysenadenome		92%			33%
Gastropankreatische Tumore	27%	68%			18%
Phäochromozytom	26%	58%			5%
Magenkarzinom	60%	20%			40%

Tabelle 1: Tumoren und ihre Somatostatin-Rezeptoren

### 1.2.2 <sup>111</sup>In-DTPA-[D-Phe<sup>1</sup>]-Octreotid (Octreoscan<sup>®</sup>)

<sup>111</sup>Indium-DTPA-[D-Phe<sup>1</sup>]-Octreotid (Mallinckrodt Imaging Solutions, Platten, NL) ist ein radioaktiv markiertes Somatostatin-Analogon und wurde zur Diagnostik und Therapieplanung neuroendokriner Tumoren entwickelt. Es hat die Eigenschaft, dass es spezifisch an Somatostatin-Rezeptoren Subtyp 2 und 5 bindet. Octreoscan<sup>®</sup> ist in Europa das erste zugelassene Radiopharmakon zum Nachweis und Staging Somatostatin-Rezeptor-exprimierender Tumoren. Dieses Medikament ist sicher und hat praktisch keine bekannten Nebenwirkungen. Gleichzeitig ist es sensitiver als herkömmliche Methoden zur Diagnostik bei neuroendokrinen Tumoren



vor allem Karzinoiden und gibt Informationen über die Rezeptordichte eines Tumors, was für die Therapie von Bedeutung sein kann (JAMAR et al, 1994).

Die größten Erfahrungen hat man mit Karzinoiden, welche eine hohe Rezeptordichte besitzen und daher einen hohen Anreicherungscontrast mit einer Sensitivität von über 90% aufweisen (JAMAR et al, 1994).

Problematisch wird die Darstellung von kleineren Herden (< 1 cm) und die der Leber, bei der aufgrund erhöhter Untergrundaktivität ein geringerer Kontrast entsteht. Bei anderen Tumoren (Phäochromozytom, medulläres Schilddrüsenkarzinom, Neuroblastom) ist die Sensitivität von der variablen Rezeptorexpression abhängig. Die Gastrin-Rezeptor-Szintigraphie und das DOPA-PET sind allerdings sensitiver. Zur Durchführung der <sup>111</sup>Indium-DTPA-[D-Phe<sup>1</sup>]-Octreotid-Szintigraphie siehe 1.4.3.

Octreoscan<sup>®</sup> kann auch zur Diagnostik bei der Vorbereitung einer rezeptorvermittelten Radionuklidtherapie verwendet werden. Octreoscan<sup>®</sup> kann durch die Auger-Elektronen von In-111 in hohen Aktivitäten ebenfalls zur Therapie eingesetzt werden. In einer Studie von Buscombe (BUSCOMBE 2003) wurden 16 Patienten, welche an neuroendokrinen Tumoren erkrankt waren, mit hohen Aktivitäten Octreoscan<sup>®</sup> behandelt. Sie erhielten nach zehn Behandlungen über 2 ½ Jahre eine maximale Gesamtaktivität von 36,6 GBq. Im Abstand von sechs Monaten wurde ein CT durchgeführt, sowie Blut- und Urinwerte gemessen, um die Toxizität an Niere, Leber, Schilddrüse und Knochenmark zu ermitteln. Nach den ersten sechs Monaten profitierten 70% von der Therapie. Nach 18 Monaten hatten noch 31% der Patienten einen anhaltenden Nutzen von der Therapie. Eine Toxizität konnte nicht gemessen werden (BUSCOMBE et al, 2003).

Im Allgemeinen ist aber ein Auger-Emitter mit kurzer Reichweite nicht effektiver für die Therapie von größeren Tumoren. Hierfür besser geeignet sind betastrahlende Isotope wie <sup>90</sup>Y und <sup>177</sup>Lu.

### 1.2.3 $^{90}\text{Y}$ -DOTA-[D-Phe<sup>1</sup>-Tyr<sup>3</sup>]-Octreotid (DOTATOC)

DOTATOC besteht aus zwei Komponenten, die durch eine kovalente Bindung chemisch gekoppelt sind. Die zwei Komponenten sind der Komplexbildner DOTA (1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure) und das Octreotid-Analogon Tyr<sup>3</sup>-Octreotide (TOC) (D-phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr(ol)). DOTA ist ein Chelatbildner und über eine der vier Säuregruppen ist es mit dem N-terminus des Oktapeptides TOC verbunden. TOC ist deshalb dem Somatostatin-Analogon Octreotid in seiner Struktur sehr ähnlich. Die Aminosäure Phenylalanin des Octreotids ist im TOC durch Tyrosin ersetzt. Die Aminosäure Tyrosin verhindert eine vorzeitige Metabolisierung des TOC im Körper und erhöht die Affinität zum sstr 2. Das aus acht Aminosäuren aufgebaute Octreotid besitzt mit 1 ½ bis 2 Stunden eine deutlich längere Serumstabilität als das endogene Somatostatin, welches aus 14 bzw. 28 Aminosäuren besteht.

Die besondere Stabilität der verschiedenen DOTA-Komplexe mit einer Reihe von dreiwertig geladenen Metallionen, z.B. sämtliche Lanthanide, Indium, Yttrium, Gallium, Wismuth etc. machen diesen Chelator attraktiv für radiopharmazeutische Anwendungen.

Wenn kurzlebige Isotope in DOTATOC cheliiert werden, die Gamma-Strahlen aussenden (z.B.: <sup>111</sup>Indium) kann es zur Diagnostik entsprechender neuroendokriner Tumoren und deren Metastasen mittels bildgebender Verfahren wie planare Szintigraphie und SPECT (z.B. In-111) oder PET (z.B. Ga-68) markiert werden.

Wird DOTATOC mit einem Beta- oder Alpha-Strahler markiert, so können die Tumorzellen durch die abgegebene Betastrahlung vernichtet werden. Dieses wird als Radiopeptidtherapie bezeichnet. Da die Reichweite der Betastrahlung nur wenige Millimeter beträgt, wird das umliegende Gewebe weitgehend verschont. Eine Therapie mit jeglichen Radioliganden ist nur sinnvoll, wenn der Tumor über die notwendigen Rezeptoren and der Zelloberfläche verfügt. Eine häufige Nebenwirkung ist die strahlenbedingte Nephrotoxizität, da die Elimination über die Nieren erfolgt und somit einer hohen Aktivität ausgesetzt sind, die durch Infusionen mit basischen Aminosäuren, Aminoazuckern oder deren Derivaten, z.B. Lysin und Arginin,

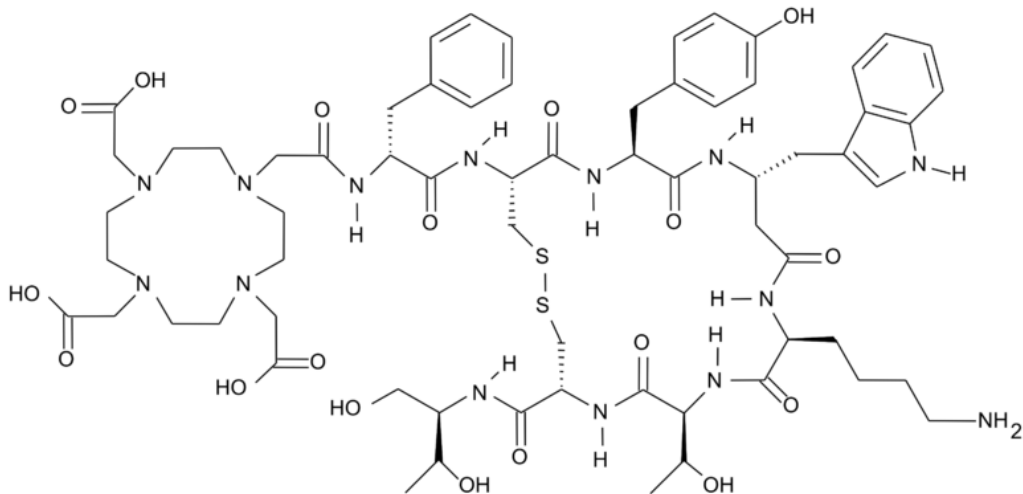
reduziert werden kann (BEHR et al, 1995 und PIMM et al, 1994). Zwar ist keine kurative Therapie möglich, die Lebensqualität der Patienten kann aber deutlich verbessert werden. Die Anwendung erfolgt also palliativ.

Für endokrine Tumoren liegt die Ansprechrate bei 36%. Eine Komplettremission (CR) wurde in 2% der Patienten und eine partielle Remission (PR) bei 22% der Patienten, stable disease (SD) in 49% und eine Progression (PD) bei in 15% der Fälle gefunden (WALDHERR et al, 2001).

In dieser Phase II Studie von (WALDHERR et al 2001) wurde das Ansprechen der Tumoren und palliative Effekte (z.B. Schmerzlinderung, Hormonsekretion etc.) von Y-90-DOTATOC untersucht. 41 Patienten mit neuroendokrinen Tumoren oder Bronchialtumoren erhielten über sechs Wochen vier Injektionen mit insgesamt  $6000 \text{ MBq/m}^2$  DOTATOC alle sechs Wochen.

Die erste erfolgreiche Studie über DOTATOC wurde 1997 (OTTE et al) veröffentlicht. Dabei wurde das  $\beta$ -emittierende Isotop  $^{90}\text{Yttrium}$  an DOTATOC gekoppelt. In dieser Studie wurde es zur Behandlung abdomineller Metastasen neuroendokriner Primärtumoren unbekannter Lokalisation verwendet. Die Tumoren sprachen darauf an und es erfolgte eine Symptomlinderung. Bei 20 der 29 mit DOTATOC behandelten Patienten zeigte sich ein stable disease, bei zwei Patienten eine partielle Remission, bei vier Patienten reduzierte sich die Größe des Tumors um über 50% und bei drei Patienten kam es zur Progression.

DOTATOC kann auch mit  $^{111}\text{Indium}$  markiert werden und dient somit der Diagnostik. Der „Niere-zu-Tumor“ Uptake war hierbei 1,9mal geringer verglichen mit Octreoscan<sup>®</sup> (OTTE et al, 1997). Bei einer Radio-Liganden-Therapie ist die Niere der höchsten Strahlendosis ausgesetzt, da die Eliminierung über die Nieren erfolgt. Sie ist somit das dosislimitierende Organ. Eine maximale tolerierte Strahlendosis von 23 Gy in den Nieren ist ein bei externer Radiatio bekanntes Limit. Bei diesen verteilt in 2 Gy Fraktionen besteht zu 5% das Risiko eine chronische Niereninsuffizienz zu entwickeln. Im gleichen Zeitraum liegt das Risiko einer chronischen Niereninsuffizienz mit 28 Gy und 5 Gy Fraktionen bei bereits 50% (EMAMI, 1991). Die mittlere Toleranzdosis ist somit stark dosisleistungsabhängig.

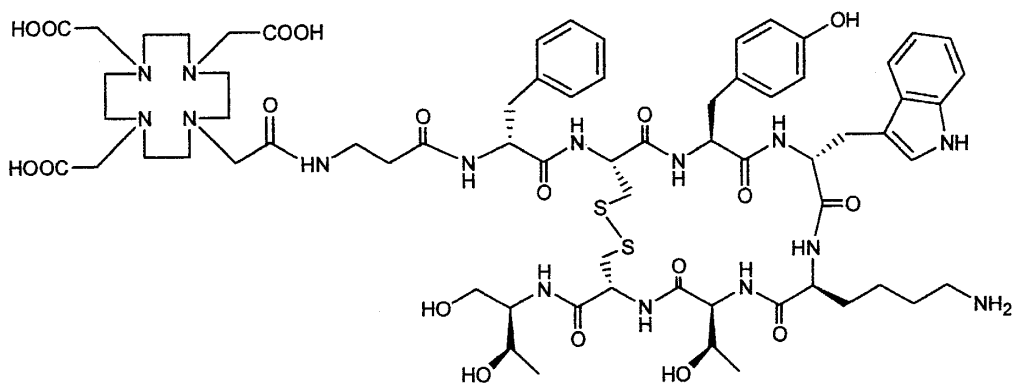


Formel 1: Strukturformel von DOTATOC

DOTATOC kann weiterhin zur Diagnostik neuroendokriner Tumoren genutzt werden, indem es mit  $^{68}\text{Ga}$  markiert wird und als  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC im PET verwendet wird. In Studien zeigte sich, dass  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TOC PET im Vergleich zu herkömmlichen Verfahren wie CT oder Somatostatin-Rezeptor-Szintigraphie eine signifikant höhere Detektionsrate ausweist (GABRIEL et al 2007).

### 1.2.4 DOTA- $\beta$ -Ala-TOC

DOTA- $\beta$ -Ala-TOC wurde in Basel von Prof. Mäcke entwickelt. Dieses Radiopeptid hat vor allem eine hohe Affinität zum sstr 2 (MAECKE et al). DOTA (1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure) ist ein starker Komplexbildner. Die Alanin-Gruppe hat den Sinn den Abstand zwischen Chelator und der Stelle, welche am Rezeptor bindet, zu vergrößern. Dadurch soll sich die Affinität zum Rezeptor vergrößern.



Formel 2: Strukturformel von DOTA- $\beta$ -Ala-TOC

### 1.3 Internalisierung

#### 1.3.1 Regulatorische Peptide

Regulatorische Peptide besitzen ein niedriges Molekulargewicht und bestehen meist aus weniger als 40 Aminosäuren. Aufgrund des niedrigen Molekulargewichtes können sie leichter in Gewebe diffundieren. Sie werden hauptsächlich im Gehirn und im Gastrointestinaltrakt (GIT) synthetisiert, aber auch in peripheren Nerven und dem Immunsystem. Aufgrund ihres hydrophilen Charakters ist es ihnen nicht möglich, eine intakte Blut-Hirn-Schranke zu überwinden (JAKUBKE, 1996). Es entstehen somit für das ZNS und den GIT zwei unabhängige Regulationssysteme, die die gleichen Botenstoffe benutzen können, sich aber gegenseitig nicht störend beeinflussen. Die Peptidasen und Proteasen im Körper führen zu einer raschen biologischen Inaktivierung und somit zu einer kurzen biologischen Halbwertszeit. Außerdem werden die Moleküle durch glomeruläre Filtration schnell eliminiert. Die kurze Präsenz regulatorischer Peptide im Körper stellt ein Problem für die Radiopharmakonapplikation dar. Die extrem kurze Halbwertszeit (bezogen auf die Serumstabilität) reicht nicht aus, um die Zielrezeptoren über den Blutweg zu erreichen (BEHR et al, 2001).

Das erklärt die Notwendigkeit zur Entwicklung metabolisch stabilerer Peptide (JAKUBKE, 1996). Stabilität kann erreicht werden z.B.: durch den Ersatz von physiologischen L-Aminosäuren durch deren D-Isomere, Einführung von Pseudopeptid-Verbindungen und N-terminaler Pyroglutamatreste. Ein Beispiel ist das im Vergleich zu SMS-14 oder -28 metabolisch stabilere Octreotid.

Hochaffine Rezeptoren für diese Peptide werden auf vielen Tumoren (über)-exprimiert.

<u>Somatostatin-Rezeptor</u>	neuroendokrine Tumoren (Karzinoide etc.) kleinzelliges Bronchialkarzinom medulläres Schilddrüsenkarzinom verschiedene Tumore des Nervensystems Lymphome (NHL, Morbus Hodgkin)
<u>VIP-Rezeptor</u>	Adenokarzinome (Magen, Kolon, Pankreas, Lunge etc.) kleinzelliges Bronchialkarzinom neuroendokrine Tumoren, Lymphome
<u>CCK-2-Rezeptor</u>	medulläres Schilddrüsenkarzinom kleinzelliges Bronchialkarzinom Stroma-Ovarial-Karzinom Astrocytom, potenziell gastrointestinale Adenokarzinome wie Magen-, Kolon-, Pankreaskarzinom
<u>CCK-1-Rezeptor</u>	gastroenteropankreatische Tumoren Meningiome Neuroblastome
<u>Substanz-P-Rezeptor</u>	medulläres Schilddrüsenkarzinom kleinzelliges Bronchialkarzinom Mammakarzinom peri- und intratumorale Gefäße
<u>Bombesin/GRP-Rezeptor</u>	kleinzelliges Bronchialkarzinom Kolon Karzinom Glioblastome
<u>Neurotensin-Rezeptor</u>	Pankreaskarzinom Prostatakarzinom kleinzelliges Bronchialkarzinom
<u>GnRH-Rezeptor</u>	Mammakarzinom Prostatakarzinom
<u>GLP-1-Rezeptor</u>	Insulinome medulläres Schilddrüsenkarzinom

Abbildung 2: Rezeptoren für regulatorische Peptide, die auf humanen Tumoren exprimiert werden (nach BEHR et al, 2001)

### 1.3.2 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Die regulatorischen Peptide binden an transmembranständige G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. G protein-coupled receptors (GPCRs) stellen die größte Familie der Zelloberflächenrezeptoren mit sieben Transmembrandomänen des menschlichen Organismus dar. Zu ihnen zählen unter anderem die muskarinergen Acetylcholin-Rezeptoren, die Gruppe der Adrenozeptoren, die Serotonin- (außer 5-HT<sub>3</sub>), die Morphin-, die Purin- und die Dopamin-Rezeptoren. So vielfältig wie die GPCRs selbst sind auch ihre Liganden. Durch den Empfang verschiedenster extrazellulärer Signale, wie zum Beispiel Hormone, Neurotransmitter, Wachstumsfaktoren, visuelle, olfaktorische und gustatorische Signale, und

deren Übertragung in das Zellinnere, sind GPCRs beteiligt an der Kontrolle physiologischer Vorgänge und unseres Verhaltens.

Aufgrund des großen Spektrums der durch sie regulierten Effekte stellen GPCRs bedeutende pharmakologische Zielstrukturen dar.

Seit 1986 die Klonierung des  $\beta$ -Adrenozeptors gelang, ist die Strukturaufklärung der meisten dieser Rezeptoren heute abgeschlossen. Der Rezeptor besteht aus einer einzigen Polypeptid-Kette von 400-500 Aminosäuren, welche die Zellmembran mit ihrer 7 transmembranären  $\alpha$ -Helices durchquert. GPCRs besitzen einen heptathelialen Aufbau als gemeinsames strukturelles Grundprinzip, weshalb sie auch Sieben-Transmembran-Rezeptoren (7TM-Rezeptoren) genannt werden. Dieser Aufbau ist durch sieben hydrophobe, 20-25 Aminosäure lange Abschnitte charakterisiert. Die Transmembranhelices (TM1-7) sind untereinander durch alternierend intra (i1-i3)- und extrazellulär (e1-e3) verlaufende Peptidschleifen miteinander verbunden. An der TM1 befindet sich extrazellulär der glykosylierte Aminoterminus. Der zytoplasmatische Carboxyterminus an TM7 ist über zwei Palmitoylgruppen an der Plasmamembran verankert. Somit entsteht eine vierte intrazelluläre Schleife (i4). (BALDWIN, 1993). Die Bedeutung der dritten intrazellulären Schleife (i3) ist mittlerweile erkannt als die Region, die für die spezifische Interaktion, d.h. Signaltransduktion, mit entsprechenden G-Proteinen in Frage kommt.

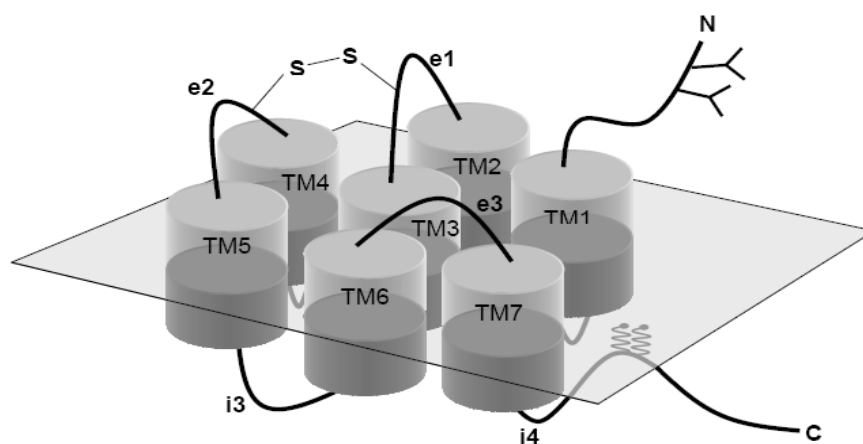


Abbildung 3: Anordnung der Transmembrandomänen von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (nach BALDWIN, 1994)



Eine Agonistenbindung induziert eine Konformationsänderung des Rezeptors, die auf einer relativen Bewegung der Transmembranhelices zueinander basiert. Somit verändert sich seine zytoplasmatische Oberfläche, durch die im inaktiven Zustand verdeckte Bindungsstellen für heterotrimere G-Proteine exponiert werden. Die heterotrimeren G-Proteine werden der Superfamilie der GTPasen zugeordnet. Sie setzen sich aus drei verschiedenen Polypeptiden zusammen, der  $\alpha$ -,  $\beta$ -, und  $\gamma$ -Untereinheit. Die  $\alpha$ -Untereinheit ist am größten und interagiert mit dem GPCR; sie bindet und hydrolysiert GTP. Sie lässt sich nach ihrer Funktion noch in weitere Klassen einteilen. Daneben sind sechs verschiedene  $G\beta$ -Untereinheiten und 12 verschiedene  $G\gamma$ -Untereinheiten bekannt. Sie formen stabile, nicht-kovalente Komplexe miteinander und stellen ein funktionelles Dimer dar.

Auf der Ebene der G-Proteine wird die Rezeptorspezifität durch verschiedene Familien sichergestellt: den  $G_s$ - und  $G_i$ -Proteinen. Die beiden Proteine haben an ihren Effektorsystemen entweder stimulatorische ( $G_s$ ) oder inhibitorische ( $G_i$ ) Wirkungen. Guaninnukleotid-bindende Proteine (kurz G-Proteine) stellen das vermittelnde Glied zwischen den Rezeptoren dieser Klasse und einem nachgestellten intrazellulären Effektorsystem dar.

Ihr Funktionszyklus durchläuft sechs Stufen (1-6). Im assoziierten Zustand der drei Untereinheiten (Ruhezustand) besetzt ein GDP-Molekül eine entsprechende Bindungsstelle an der  $\alpha$ -Untereinheit (1). Bei Bindung eines Liganden an die Rezeptorbindungsstelle (Rezeptor-Aktivierung) wird die Affinität der Untereinheit zur dritten cytosolischen Schleife des Rezeptors erhöht, der  $\alpha\beta\gamma$ -Komplex bindet dort (2). Dies hat zur Folge, dass GDP an der  $\alpha$ -Untereinheit gegen GTP ausgetauscht wird (3), was eine nachfolgende Dissoziation von  $\alpha$ - und  $\beta\gamma$ -Untereinheiten ermöglicht (4). Der  $\alpha$ -GTP-Komplex kann ebenfalls vom Rezeptor dissoziieren und mit einem spezifischen Effektorsystem eine Bindung eingehen, was zu dessen Aktivierung führt (5). Im letzten Schritt wird GTP hydrolysiert (6), und der Rezeptor gelangt wieder in den Ruhezustand (1) (SCHWINDIGER und ROBISHAW, 2001).

Zu den Effektorsystemen der G-Proteine-gekoppelten Rezeptoren zählen einerseits verschiedene Enzymsysteme (z.B.: Adenylatcyclase, Phospholipase C) und andererseits einige Ionenkanäle (z.B.: K<sup>+</sup>- oder Ca<sup>2+</sup>-Kanäle).

Die Rolle des cAMP ist seit langem bekannt. Es wird vom membranständigen Enzymsystem Adenylatcyclase durch Spaltung von ATP produziert und reguliert als „second messenger“ eine Reihe zellulärer Funktionen, wie etwa die kontraktile Proteine der glatten Muskulatur, die Aktivität von Ionenkanälen und einigen Enzymen, die mit dem zellulären Energieumsatz zu tun haben. Der intrazelluläre cAMP-Gehalt vermittelt dabei inhibitorische und aktivierende Prozesse durch direkte Aktivierung von Protein-Kinasen, die eine Phosphorylierung verschiedener zellulärer Proteine bewirken. Grundsätzlich führen G<sub>i</sub>-Proteine zu einer Inhibition der Adenylatcyclase, so dass die cAMP-Produktion reduziert wird. Der Abbau von cAMP erfolgt über Phosphodiesterasen.

Ein weiteres wichtiges intrazelluläres Enzymsystem, welches durch G-Proteine angesteuert wird, ist die Phospholipase C. Bei Aktivierung wird ihr Substrat Phosphoinositol (4,5)bis-Phosphat (PIP<sub>2</sub>) in Diacylglycerol (DAG) und Inositol (1,4,5)tris-Phosphat (IP<sub>3</sub>) aufgespalten, die beide als „second messenger“ bekannt sind. Nach ihrer Bildung werden sie wieder in das Ausgangsprodukt wieder zurückgeführt. IP<sub>3</sub> bewirkt eine Freisetzung von Calcium aus den intrazellulären Speichern. Der „second messenger“ bindet an einen speziellen Rezeptor in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums, dem wichtigsten intrazellulären Calcium-Speicher. Drei Beispiele Calcium-vermittelter Vorgänge sind die Freisetzung von Hormonen, die Kontraktion der glatten Muskulatur, sowie der Erhöhung der Kontraktilität des Herzmuskels. Durch DAG wird vornehmlich die Proteinkinase C (PKC) aktiviert. Die Aufgaben der PKC sind vielfältiger Art, sie aktivieren zelluläre Enzymsysteme und Transportproteine, sie sind an der Aktivierung kontraktile Proteine beteiligt und regulieren die Funktionen von Ionenkanälen.

Der dritte Angriffspunkt der G-Proteine sind Ionenkanäle, die ihre Funktion nicht über „second messenger“ steuern lassen, sondern nach

entsprechender Rezeptor-Aktivierung direkt durch G-Proteine angesteuert werden.

Die Rezeptor-Desensibilisierung stellt einen wichtigen Mechanismus zur Regulation von GPCRs dar. Darunter versteht man die abnehmende Reaktion einer Zelle auf einen langanhaltenden Stimulus. Sie kann beispielsweise durch Phosphorylierung des Rezeptors, durch Rezeptor-Sequestration oder eine Verminderung der Anzahl der Oberflächenrezeptoren (Down-Regulation) geschehen (FERGUSON, 2001).

### **1.3.3 Prinzip der Internalisierung**

Das radioaktiv markierte Peptid hat zwei verschiedene Möglichkeiten an eine Zellmembran zu binden. Zum einen kann es spezifisch mit dem Rezeptor eine Bindung eingehen oder unspezifisch an der Zellmembran haften. Bindet das Peptid am Rezeptor kann dies zur Internalisierung führen. Dabei wird der Ligand-Rezeptor-Komplex endozytiert. Radiometallchelatoren verbleiben intralysosomal in der Zelle und werden kaum externalisiert. Der Rezeptor wird entweder recycelt und gelangt funktionsfähig wieder an die Zelloberfläche oder er wird degradiert. Durch den Internalisierungsprozess kommt es zur Akkumulation des Radionuklids in der Zelle, was somit das szintigraphische Signal bzw. die „Therapeutic ratio“ verstärkt. Die Internalisierung beschränkt sich auf Rezeptorliganden, die agonistische Aktivität besitzen. Bei Antagonisten ist der Anteil des internalisierten Peptids vernachlässigbar (BEHR et al, 2003).

## **1.4 Szintigraphie**

### **1.4.1 Grundlagen**

Die Szintigraphie ist eine nuklearmedizinische Untersuchung, bei der künstlich erzeugte Radionuklide in Form von meist organischen Verbindungen, die einem natürlich im Metabolismus vorkommenden Molekül möglichst ähnlich, gelegentlich sogar identisch sind, in den Körper des Patienten gebracht werden. Nach Applikation reichern sich diese im zu untersuchenden Organ bzw. Gewebe an. Kurzlebige Radionuklide wie <sup>99m</sup>Technetium senden Gamma-Strahlung aus, wenn sie in ihren stabilen Grundzustand übergehen. Es ist ein Betastrahler von einer Halbwertszeit

vom mehreren 100.000 Jahren, was klinisch aber irrelevant ist, da er biologisch längst ausgeschieden worden ist. Die Aktivitätsverteilung, also die räumliche Verteilungsdichte der aus dem Körper tretenden Gamma-Strahlung kann als Bild im Szintigramm dargestellt werden. Die Registrierung der Gamma-Strahlung erfolgt mit einer Gamma-Kamera. Mit der Gamma-Kamera können Funktionsvorgänge im Körper gut dargestellt werden.

Unter die planare Szintigraphie fallen Einzelaufnahmen statischer Aktivitätsverteilung in Teil- und Ganzkörper (z.B.: statische Nierenszintigraphie mit DMSA oder Schilddrüsenszintigraphie mit Perchnetat) und die Sequenzszintigraphie, die Aufnahme mehrerer Bilder nach einem festgelegten Zeitschema sowie die Funktionsszintigraphie. Eine Sequenzszintigraphie, bei der am Computer in allen Aufnahmen gleich eine „region of interest“ (ROI) über einen interessierenden Bereich gelegt und eine Zeit-Aktivitätskurve (Funktionskurve) erstellt wird, nennt man Funktionszintigraphie. Die dreidimensionale Tomographie wird als SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography) bezeichnet.

Weiterhin kann zur Diagnostik neuroendokriner Tumoren ein PET herangezogen werden. Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) ist ein bildgebendes Verfahren, bei dem die Stoffwechselaktivität von Organen und Geweben dargestellt wird. Bei der PET werden bestimmte radioaktive Stoffe (Tracer) verwendet, die dem Patienten vor der Untersuchung gespritzt werden. Diese Stoffe reichern sich an den besonders aktiven Stellen im Körper an. Mit einer Spezialkamera wird diese Strahlung gemessen. Aus den Messergebnissen lässt sich ein dreidimensionales Bild errechnen.

#### **1.4.2 Tracer**

Die prinzipiellen Bestandteile eines Peptid-Tracers sind ein Peptid und ein Radionuklid, die über einen Chelator (z.B. DTPA, DOTA u. a.) miteinander verbunden sind. Als Radionuklid kommen in der Diagnostik Gamma, Röntgen- oder Positronen-Strahler und in der Therapie überwiegend Beta-Strahler zum Einsatz. Der Tracer sollte eine hohe Stabilität im Plasma aufweisen, sowie hochaffin an den Rezeptor binden. Eine weitere wichtige

Voraussetzung für einen optimalen Tracer ist, dass er internalisiert wird und das Radionuklid nicht exozytiert wird in der Zelle. Eine weitere wichtige Voraussetzung für einen optimalen Tracer ist eine insgesamt günstige Bioverteilung (Biodistribution), also an wenig gesundes Gewebe (Leber, Niere, Knochenmark, u.s.w.) zu binden und damit keine relevanten Strahlendosen für gesunde Gewebe zu haben.

Bei Tracern sind im Austausch gegen stabile Atome radioaktive Nuklide chemisch an eine am Stoffwechsel teilnehmende Substanz gebunden. Kennzeichnend ist, dass sich durch das gleichartige chemische Verhalten verschiedener Isotope eines Elements im Organismus nahezu wie die Ursprungssubstanzen) verhalten und dass Organfunktionen und physiologische Gleichgewichte unbeeinflusst bleiben, weil nur geringste Stoffmengen benötigt werden. Die radioaktiven Stoffe werden außer nach biochemischen auch nach physikalischen Eigenschaften ausgewählt. Ein Teil der beim Zerfall emittierten Strahlung muss zur Diagnostik den Körper ungehindert verlassen und mit einem geeigneten Untersuchungsgerät nachgewiesen werden können; außerdem sollte die Strahlenexposition bei der Diagnostik möglichst gering sein. Die Beobachtung der Verteilung des Tracers im Körper von außen erlaubt die Untersuchung von Organ- und Körperfunktionen auf physiologische, nichtinvasive Weise.

### **1.4.3 Peptidszintigraphie**

Für die Szintigraphien ist eine hohe Affinität zum Rezeptor von Bedeutung. Das Peptid sollte möglichst spezifisch an einen konkreten Rezeptor oder dessen Subtyp binden. Die Rezeptorszintigraphie dient der Detektion und dem Staging von gastroenteropankreatischer NET.

Periphere Somatostatin-Rezeptoren befinden sich auch auf Lymphozyten und aktivierten Leukozyten, was zu einer prominenten Anreicherung, dem sogenannten Uptake, in der Milz führt (IVANCEVIC et al, 1997). In Leber und Nieren wird auch geringe sstr-Expression gefunden.

Hohe Sensitivitäten fand man auch bei Hypophysentumoren, Paragangliomen, Phäochromozytomen, Neuroblastomen und auch Meningeomen.

<b>Tumortyp oder pathologische Entität</b>	<b>In-vivo-Szintigraphie</b>		<b>In-vitro-Rezeptor-Status</b>	
<i>Hypophysentumoren:</i>				
<i>GH produzierend</i>	7/10	70%	45/46	98%
<i>TSH produzierend</i>	2/2	100%	n/d	
<i>nicht-funktionell</i>	12/16	75%	n/d	
<i>Karzinome</i>				
<i>Gastrinome</i>	74/78	95%	55/62	88%
<i>Insulinome</i>	13/14	93%	6/6	100%
<i>exokrine Pankreaskarzinome</i>	13/28	46%	18/27	67%
<i>unklassifizierte APUDome</i>	0/24	0%	0/12	0%
<i>Paragangliome</i>	15/20	75%	4/4	100%
<i>Paragangliome</i>	42/42	100%	4/4	100%
<i>Phäochromozytome</i>	13/15	87%	38/52	73%
<i>Neuroblastome</i>	8/9	89%	15/23	65%
<i>differenzierte Schilddrüsenkarzinome:</i>				
<i>Follikulär</i>	5/6	83%	n/d	
<i>Papillär</i>	2/3	67%	n/d	
<i>medulläre Karzinome</i>	24/35	69%	10/26	38%
<i>kleinzellige Bronchialkarzinom</i>	38/38	100%	4/7	57%
<i>Nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome</i>	42/42	100%	0/17	0%
<i>Mammakarzinom</i>	47/69	68%	33/72	46%
<i>Meningiome</i>	14/14	100%	54/55	98%
<i>Astrozytome</i>	4/6	67%	14/17	82%
<i>Non-Hodgkin-Lymphome</i>	93/112	83%	26/30	87%
<i>Morbus Hodgkin</i>	39/40	98%	2/2	100%
<i>Sarkoidose</i>	29/29	100%	3/3	100%
<i>Wegenersche Granulomatose</i>	4/4	100%		
<i>Tuberkulose</i>	9/9	100%	2/2	100%
<i>Sjögren-Syndrome</i>	4/5	80%	n/d	
<i>rheumatoide Arthritis</i>	14/14	100%	6/7	86%

Abbildung 4: Sensitivität der Indium-DTPA-Phe<sup>1</sup>-Octreotid-Szintigraphie sowie Befunde der in vitro-sstr-Expression bei verschiedenen Tumoren (nach BEHR et al, 2001)

### <sup>111</sup>In-Octreotid-Szintigraphie

Hormonell aktive gastro-entero-pankreatische (GEP)-Tumoren können mit bildgebenden Verfahren (Endoskopie, Sonographie, CT, MRT) schwer nachweisbar sein. Da die meisten GEP-Tumoren an ihrer Zelloberfläche Somatostatin-Rezeptoren überexprimieren, können sie mit der Somatostatin-Rezeptor-Szintigraphie lokalisiert werden.

Neben dem Nachweis und Staging von GEP-Tumoren ist diese Szintigraphie auch zur Differentialdiagnose von Meningeomen versus Neurinomen, bei C-Zell-Karzinomen der Schilddrüse und Merkelzell-tumoren der Haut. Weiterhin dient die <sup>111</sup>In-Octreotid-Szintigraphie zum prätherapeutischen Rezeptornachweis vor geplanter Radionuklidtherapie. Eine strenge Indikationsstellung sollte bei Kindern und stillenden Müttern bestehen. Octreoscan<sup>®</sup> ist bei Schwangeren relativ kontraindiziert. Eine subcutane Sandostatatherapie sollte 24 h vor Injektion abgesetzt werden,

eine Depot-Monatsspritze (Sandostatin LAR<sup>®</sup>) idealerweise vier Wochen vorher, da sonst eine kompetitive Hemmung am Rezeptor vorliegt.

Ein Erwachsener erhält eine intravenöse Injektion von 110-220 MBq <sup>111</sup>In-Octreotid, was einer Effektivdosis von 13 mSv bzw. 26 mSv entspricht.

Nach vier Stunden erfolgt die erste Ganzkörperaufnahme bzw. die erste SPECT. Hierbei kommt es zur physiologischen Darstellung von Leber, Milz, Nieren, ableitenden Harnwegen und Gallenblase. In der Milz befinden sich Leukozyten, welche Somatostatin-Rezeptoren besitzen. In den Nieren werden die Peptide in den Tubuli gespeichert. Die Ausscheidung des Octreoscan<sup>®</sup> erfolgt renal über Nieren und ableitende Harnwege sowie hepatisch über Leber und Gallenblase. Bei Fragestellungen im Bereich des Abdomens kann dem Patienten nach der 4 h - Aufnahme ein Laxans verabreicht werden, um falsch positive Ergebnisse durch hepatobiliär ausgeschiedene Aktivität im Darm zu vermeiden. 24 Stunden nach Injektion erfolgt eine erneute Aufnahme (planarer Ganzkörperscan in anteriorer und posteriorer Sicht und zusätzlich SPECT, weil Target-to-background-ratio nach 24 Stunden besser ist), wobei hier zusätzlich Kolon, Hypophyse und Schilddrüse physiologisch zur Darstellung kommen. Da sowohl Schilddrüse als auch Hypophyse Somatostatin-Rezeptoren besitzen stellen sie sich auch schon nach vier Stunden dar. Je später sie aber sichtbar werden, desto besser ist die Target-to-background-ratio. Nach dem Octreoscan<sup>®</sup> nicht mehr im Blut vorhanden ist und zu einem großen Teil schon ausgeschieden worden ist (Background nimmt zeitlich ab), sieht man die restlichen Organe, welche Somatostatin-Rezeptoren besitzen besser. Wenn hohe Untergrundaktivität oder Darmaktivität mögliche Befunde überlagert, ist eine Aufnahme nach 48 Stunden im Bereich des Abdomens notwendig.

In der Abbildung ist eine Somatostatin-Rezeptor-Szintigraphie einer 64jährigen Patientin aufgeführt, die an einem Gastrinom im Duodenum leidet. Man erkennt weiterhin wie sich das Radiopharmakon in Leber, Milz, Niere und Harnblase anreichert.

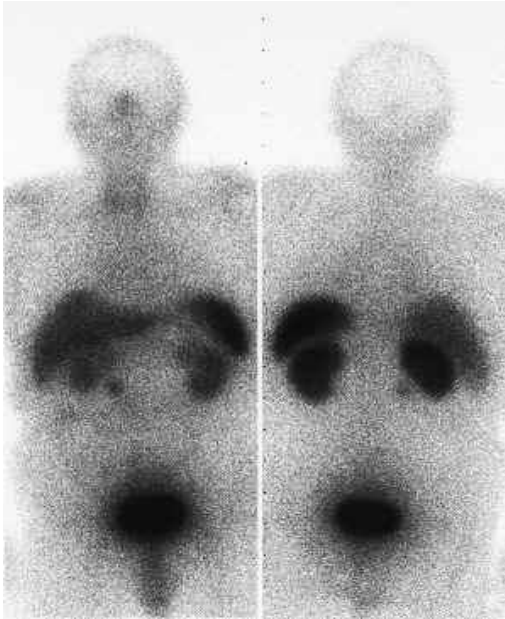


Abbildung 5: Somatostatin-Rezeptor-Szintigraphie einer 64jährigen Patientin mit Gastrinom im Duodenum, Klinik für Nuklearmedizin, Universität Marburg

## 1.5 Die Radiopeptidtherapie

In der Mitte der 80er und in den frühen 90er Jahren entdeckte man, dass bestimmte Tumortypen hochaffine Rezeptoren für regulatorische Peptidhormone (über-)exprimieren. Es handelt sich hierbei um neuroendokrine Tumoren des Gastrointestinaltraktes. Es gibt auch NET außerhalb des Gastrointestinaltraktes, die zum Teil auch Somatostatin-Rezeptoren besitzen.

Regulatorische Peptide zählen zu den kleinen, leicht diffundierenden, natürlichen Substanzen. Nach Bindung an ihren Rezeptor lösen sie eine Vielzahl von Wirkungen aus. Die exprimierten Rezeptoren sind Ziel für radioaktiv markierten Liganden zur Tumordiagnostik und -therapie in der Nuklearmedizin.

### 1.5.1 Therapeutische Anwendung von Somatostatin-Analoga

Die Therapie mit Radiopeptiden bei Patienten mit neuroendokrinen Tumoren nimmt eine wichtige Stellung in der Radioonkologie ein. Beispielsweise sprechen diese Tumoren nur wenig auf eine Chemotherapie an. Bausteine der Endoradiotherapie sind ein Rezeptorbindender Ligand und ein  $\beta$ -strahlendes Radionuklid.



Radiometallmarkierte Analoga besitzen günstige Biodistributions-eigenschaften. Im Gegensatz dazu bestehen bei radioiodierten SMS-Analoga niedrige Target-zu-Background-Verhältnisse. Auch aufgrund ihres lipophileren Charakters eignen sie sich nicht für die Therapie. Lipophile Stoffe haben keine schnelle Nieren-Clearance, weil sie hepatisch eliminiert sind. Daher ist die Target-to-back-ratio schlecht. Außerdem diffundieren hydrophile Stoffe besser ins Gewebe (Mikrozirkulation am Tumor). Sie werden rasch in den Lysosomen metabolisiert und das Mono- oder Diiodotyrosin wird exozytiert (BEHR et al, 2002).

Es wurden Mono- und bifunktionelle Chelatoren entwickelt mit der Aufgabe wie Indium, Yttrium und Lutetium stabil an ein Peptid zu binden, beispielsweise DTPA (Diethylentriaminpentaessigsäure), TTHA (Trithylen-etraminhexaessigsäure), DFA (Deferoxamin), TETA (Triethylen-tetraamin) oder DOTA (1,4,7,10-terazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessig-säure). Um die Chelatoren kovalent an die Peptide zu binden werden aliphatische Seitenketten, Acetamidobenzyl- oder Succinyl-Linker verwendet.

Die durch ihre niedrige Molekularmasse günstige Pharmakokinetik der regulatorischen Peptide ermöglicht eine bessere Target-to-Background-Uptake-Ratio. Bereits heute wird die Somatostatin-Rezeptor-gerichtete Radiopeptidtherapie neuroendokriner Tumoren zur effektiven Therapie dieser relativ strahlenresistenten, soliden Tumoren genutzt.

Die strahleninduzierte Nephrotoxizität nach Therapie mit  $^{90}\text{Y}$ -DOTATOC ist dosisabhängig.

Die Glomeruli der Nieren sind sehr strahlensensibel. Das Problem der Nierenbelastung kann eventuell durch Auger-Elektronenemitter wie  $^{111}\text{In}$  verhindert werden. Das lipophilere  $^{90}\text{Y}$ -DOTALan weist zwar niedrigere Nierendosen auf, erhöht aber die Knochenmarksexposition, da lipophile Stoffe sich unspezifisch besser im Knochenmark anlagern als hydrophile (VIRGOLINI, 2002).

## 1.6 Konzeption und Zielsetzung

Trotz Kontrolle der Tumorsyndrome gibt es derzeit keine kurative Therapie bei Patienten mit metastasierten NET. Daher stellt die Entwicklung neuer Therapiekonzepte zur Behandlung eine Herausforderung dar.

Als ebenso schwierig erweist sich die Diagnostik bzw. das Staging neuroendokriner Tumoren, da NET aufgrund ihres langsamen, teils multifokalen Wachstums oft erst im späten Stadium erkannt werden. Die konventionellen radiologischen bildgebenden Verfahren können diese Tumoren nicht zu einem befriedigenden Anteil diagnostizieren. Die Somatostatin-Rezeptor-Szintigraphie ist hier ein wichtiger diagnostischer Beitrag der Nuklearmedizin. Und diese zu optimieren stehen folgende Parameter zur Verfügung:

Das Indium sollte zu einem hohen Prozentsatz (mindestens 95%) ans Peptid gebunden sein, da freies Indium nur zu einer unnötigen Strahlenexposition beim Patienten führt. Ebenso sollte das Radiopeptid eine hohe Spezifität und Affinität zum Rezeptor aufweisen. Somit wird das markierte Peptid auch nur von den Somatostatin-exprimierenden Zellen aufgenommen. Das Radiopeptid sollte so lange wie möglich internalisiert bleiben. Je weniger externalisiert wird, desto besser kann in den Spätaufnahmen das Somatostatin-Rezeptor-positive Gewebe dargestellt werden.

In dieser Arbeit geht es, zu untersuchen, ob DOTA- $\beta$ -Ala-TOC in vitro gegenüber DOTATOC und Octreoscan<sup>®</sup> überlegen ist.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Materialien und Geräte**

#### **2.1.1 Zellkultur**

##### **2.1.1.1 Zelllinie**

Die verwendete Zelllinie INR1-G9 stammt von einem Hamster-Glucagonom und exprimiert den Somatostatin-Rezeptor 2, der zusammen mit dem sstr 5 klinisch am relevantesten ist (TAKAKI et al, 1986).

##### **2.1.1.2 Kultivierung der Zellen**

Die Langzeitkultivierung der Zelllinie INR1-G9 wurde im Begasungs-Brutschrank (Haraeus Instruments, HERAcell, Kendro) bei 37°C in einer wassergesättigten Luftatmosphäre mit 5% Kohlendioxid durchgeführt. Als Kulturgefäße wurden Kunststoffzellkulturflaschen (550 ml, Cellstar, Greiner Labortechnik, Frickenhausen) verwendet. Es wurde darauf geachtet, die Zellkulturflaschen nicht fest zu verschließen, damit ein Gasaustausch gewährleistet ist. Das sterile Arbeiten mit den Zellkulturen erfolgte an einer Steril-Werkbank mit vertikaler Luftströmung (Haraeus HS 12, Kendro). Das Wachstum der Zellen konnte mit Hilfe des Mikroskops kontrolliert werden.

Brutschrank Haraeus Instruments, HERAcell, Kendro

Zellkulturflaschen, 550 ml, Cellstar, Greiner, Frickenhausen

Sterilbank Haraeus HS 12, Kendro

Mikroskop Olympus LH 50 A

RPMI 1640 Medium, Rosewell Park Memoria Institute

Nystatin in DMSO (0,1 ml = 100 E) 0,05 ml

Glutamin (200 mM) 1,0 ml

FKS (inaktiviert) 10,0 ml

Aqua Bidest ad 100 ml

Lagerung bei 4°C

### 2.1.1.3 Kulturmedium

Als Grundlage für die Kultivierung der verwendeten Zelllinie diente RPMI 1640 Medium (Zusammensetzung siehe oben), welches zusätzlich L-Glutamin und 2,0 g/l Natriumhydrogencarbonat enthielt. Einer 500 ml Mediumflasche wurden 50 ml FCS (fötales Kälberserum) sowie 5 ml Penicillin/Streptomycin zugesetzt. Ein Mediumwechsel erfolgte in Abhängigkeit von Zelldichte und Indikatorumschlag alle zwei bis drei Tage. Jede Zellkulturflasche wurde mit 25 ml frischen warmen Medium gefüllt.

RPMI 1640 Medium, PAN	500 ml
10% FCS (fötales Kälberserum), PAA	50 ml
1% PenStrep, PAA	5 ml

### 2.1.1.4 Passagieren adhärenter Zellen

Die ständige Proliferation und das Wachstum der G9-Zellen führten dazu, diese regelmäßig auszudünnen. Die Zellen wurden in bestimmten Zeitintervallen, die sich individuell nach den Wachstumseigenschaften der jeweiligen Charge richteten, passagiert. Bei Erreichen einer adhärenenten Konfluenz des Zellmonolayer von 80-90% wurden sie mit einer Trypsin-EDTA-Lösung im Brutschrank 3-5 min inkubiert. Jetzt konnten sie mit Hilfe von 10 ml Medium und durch Druck des Pipettenstrahls vom Boden der Flasche gelöst werden. Die resuspendierten Zellen wurden nun auf zwei bis vier neue Zellkulturflaschen überführt. Datum, Zelllinie, Name sowie Anzahl der Passage wurde auf den Flaschen notiert. Überschüssige Zellen konnten für die Langzeitkonservierung tiefgefroren werden (2.1.1.5). Ein Teil der Zellen wurde verworfen.

Trypsin-EDTA, PAA Laboratories GmbH, Pasching	100 ml
---	--------

### 2.1.1.5 Kryokonservierung

Für eine Langzeitkonservierung wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff bei -172°C eingefroren. Dazu wurden die Zellen vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für fünf Minuten bei 800 rpm zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurde der

Überstand verworfen, das Zellsediment in Wachstumsmedium mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO, Fluka) resuspendiert und in zwei Kryoröhrchen überführt. Die Ampullen wurden zum langsamen Einfrieren zunächst in einen Styroporbehälter gegeben und für 24 Stunden bei -20°C eingefroren. Danach wurden sie für weiter 24 Stunden bei -80°C eingefroren, bevor sie zur dauerhaften Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt werden konnten. Bei Bedarf wurden die Zellen aufgetaut und 25 ml lauwarmes Medium hinzugefügt. Dann wurden sie wieder im Brutschrank gelagert, um ihren Stoffwechsel zu regenerieren. Einen Tag später erfolgte ein Mediumwechsel.

10% DMSO, Fluka

Einfrierröhrchen (Kryoröhrchen), Greiner

### 2.1.2 Versuchsmaterialien und Geräte

TC-plate 6 Well, Greiner

Megafuge 1.0, Heraeus Sepatech

PBS steril, pH=7,4 CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, Gibco 500 ml

1% BSA, Fluka 50 g

Ammoniumacetat, Fluka 250 g

Salzsäure 1N, Merck 1000 ml

Natronlauge 1N, Merck 1000 ml

Methanol, Merck 2500 ml

Natriumacetat, Fluka 250 g

4,1 g auf 100 ml Aqua dest. auffüllen

pH-Wert auf 5,4 mit HCl einstellen

PBS: 80 g NaCl, RdH 1000 g

2 g KCl, Roth 1000 g

14,24 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O, Merck 1000 g

2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Merck 1000 g

mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen

Gebrauchslösung 1:10 verdünnen

pH-Wert auf 7,2 einstellen, bei 4°C aufbewahren

pH-Wert-Messgerät Delta 350, Mettler

Sep-Pak<sup>®</sup> Cartridges C18 Filter, Waters  
Blocksubstanz SMS-14, 10<sup>-3</sup>, 1 mg, Sigma  
Heater MR 3001 K, Heidolph  
γ-Counter (Auto-Gamma) oder Gammazintillationszähler, Cobra II,  
Packard  
Wasserbad, Memmert  
Bohrloch (Nuclear Spectrometer) LB 2040, Berthold

### 2.1.3 Peptide und <sup>111</sup>In

Peptid	JS 188	Basel, Klinik für Nuklearmedizin
Radionuklid	InCl <sub>3</sub>	Mallinckrodt Medical
Octreoscan <sup>®</sup>		Tyco Healthcare

### 2.1.4 HPLC

HPLC 535 Detector, BIO-TEK Instruments  
Radioaktivitätsdetektor: Flow scintillation Analyzer, Packard  
Lösungsmittel A: Natriumacetat  
Lösungsmittel B: Acetonitril

### 2.1.5 weitere Materialien

Glaspipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml, Greiner,  
Frickenhausen  
puderfreie Latexhandschuhe, Größe S, Kimberly-Clark  
Kosmetiktücher Kleenex, Kimberly-Clark  
Terralin<sup>®</sup> liquid alkoholische Schnelldesinfektion, Schülke&Mayr  
Finntip<sup>®</sup> Pipettenspitzen 250 µl, 1000 µl, ThermoLabsystems  
PS-Röhrchen GLKL 5 ml, Greiner  
Stopfen 5 ml, ThermoLabsystems  
Eppendorf-Gefäß 1,5 ml, Greiner  
Einmalspritze 2 ml, Braun  
PP-Röhrchen steril 15 ml, 50 ml, Greiner  
Kanüle steril 24 G, BD Medical Systems  
Wägebapier MN 226, Macherey-Nagel

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Markierung der Peptide und Qualitätskontrolle

Die Markierung von DOTA- $\beta$ -Ala-TOC erfolgte immer am Versuchstag. Zunächst wurden 50  $\mu$ l Ammoniumacetat und 2  $\mu$ g JS188 (Peptid) in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gefüllt. 200  $\mu$ Ci  $\text{InCl}_3$  wurden zugefügt. Die Inkubationszeit im 90°C heißen Wasserbad betrug 30 Minuten.

Im Anschluss folgte eine Qualitätskontrolle mit einer C18-Kartusche (Festphasenextraktion). Der Kohlenstofffilter besteht aus einer auf Quarz basierenden gebundenen Phase mit hohen hydrophoben Eigenschaften. Er wird eingesetzt zur Absorption der Analyte mit niedrigerer Hydrophilie aus wässrigen Lösungen. Dabei ging das auf die Kartusche aufgetragene DOTA-dervatisierte Peptid mit der hydrophoben C18-Säule Wechselwirkung ein. Hiermit konnte das Verhältnis zwischen markiertem DOTA-Peptid und freiem Indium bestimmt werden. Die Kartusche wurde zunächst mit je 2 ml Methanol sowie 2 ml Ammoniumacetatpuffer vorbereitet. Nach Gabe von 2  $\mu$ l markiertes Peptid in die Kartusche, wurde zur Kontrolle der Markierung erneut mit zunächst 2 ml hydrophilem Ammoniumacetatpuffer und dann 2 ml lipophileren Methanol durchgespült, wobei man die eventuell vorhandene Metaboliten in Reagenzgläser auffing. Zur Kontrolle der Markierung wurde somit das überschüssige freie Nuklid sowie eventuell vorhandene Metaboliten mit hydrophilem Ammoniumacetatpuffer und anschließend das markierte DOTA-Peptid mit dem lipophileren Methanol vom Säulenmaterial eluiert. Zusammen mit der Kartusche erhielt man drei Fraktionen, deren Aktivität im  $\gamma$ -Counter gemessen wurde. Dann wurde der prozentuale Anteil der Aktivität der Methanol-Fraktion an der sich aus den Aktivitäten aller drei Fraktionen zusammensetzenden Gesamtaktivität für die Bewertung der Markierung herangezogen. Für eine akzeptable Markierung sollten mehr als 90% des Radionulids an das jeweilige Peptid gebunden sein. Die Markierung von DOTATOC erfolgte analog zu DOTA- $\beta$ -Ala-TOC. Es wurde streng darauf geachtet, dass es zu keiner Kontamination mit Metallnadeln kam, da sonst die Markierung missglückte.

Octreoscan<sup>®</sup> gibt es als fertiges Kit. Wobei Fläschchen A (enthält <sup>111</sup>Indium als Indium(III)-chlorid) und Fläschchen B (Trockensubstanz 10 µl Pentetretotid (DTPA-D-Phe<sup>1</sup>-OC) am Versuchstag miteinander vermischt wurden sind. DTPA ist ein starker Komplexbildner, der an ein Somatostatin-Analogon wie in diesem Fall Octreotid konjugiert ist und an <sup>111</sup>Indium bindet. Die Inkubationszeit beträgt 30 Minuten bei 25 °C.

Bei DOTA-β-Ala-TOC ist eine Alanin-Gruppe eingefügt wurden, um den Abstand zwischen Chelator und Rezeptorbindungsstelle zu vergrößern um somit die Rezeptoraffinität zu erhöhen.

### **2.2.2 Versuchsablauf**

#### **2.2.2.1 Internalisierungsversuche**

24 Stunden vor Versuchsbeginn wurden die Zellen von je einer dicht bewachsenden Zellkulturflasche auf je zwei 6 Well-Platten ausgesät. Je nachdem wie viele Platten man für den Versuch benötigte, wurden die Zellen in Zellkulturflaschen vorher herangezüchtet. Nach Zugabe von je 10 ml sterilem PBS-EDTA in die Zellkulturflaschen ließen sich die Zellen durch den Pipettenstrahl vom Boden lösen. Es wurde ausschließlich PBS-EDTA verwendet und kein Trypsin, weil dieses den Rezeptor lysiert. Der Inhalt von zwei Flaschen wurde danach in ein 50 ml Plastikröhrchen gegeben und bei 1200 rpm für 3 min zentrifugiert. Es entstand ein Pellet aus Zellen an der Zuspitzung des Röhrchenbodens. Anschließend wurden je 48 ml Medium in die Röhrchen gefüllt und durch Resuspendierung mit einer Pipette die Zellen im Medium verteilt. Danach pipettierte man je 2 ml der Zellsuspension in ein Well. Es sollten sich möglichst gleich viele Zellen in den Wells befinden. Ein Zählversuch ergab, dass ca. 960.000 Zellen in jedem Well wachsen.

Zu Beginn eines Versuches saugte man das alte Medium aus den Wells ab und fügte je 1 ml Reaktionsmedium hinzu. Das Medium wurde vorher auf 37°C erwärmt bzw. auf 4°C abgekühlt, je nach Inkubationsversuchstemperatur. Dieses Reaktionsmedium setzt sich aus RPMI 1640 Medium und 1% BSA (Albumin from bovine serum) zusammen. BSA wird vorher abgewogen und der jeweiligen Menge Medium hinzugefügt und im



Brutschrank erwärmt. Die Somatostatin-Rezeptoren der drei Wells der unteren Reihe auf einer Platte wurden mit SMS-14 geblockt, indem man es mit einer Konzentration von  $1 \cdot 10^{-6}$  mol/l in die Wells gab. Danach wurden ca. 1.000.000 cpm des entsprechenden radioaktiven Peptids in jedes Well pipettiert. Die Inkubation fand bei 37°C im Brutschrank bzw. 4°C im Kühlschrank statt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wusch man die Zellen mit sogenanntem „Acid wash“. Dieser bestand aus PBS, bei dem ein pH-Wert von 5 eingestellt wurde. Die Zellen wurden durch zweimalige Gabe von 1 ml Acid wash gewaschen. Dadurch wurde das noch am Rezeptor haftende Peptid von diesem gelöst und zusammen mit dem Acid wash abgesaugt (spezifische Bindung). In jedes Well fügte man nun 1 ml einmolare Natronlauge (NaOH) hinzu, um die Zellen vom Boden zu lösen. Dabei konnte es auch zur Beschädigung der Wells kommen. Das war zu diesem Zeitpunkt aber nicht mehr von Bedeutung, da allein die cpm relevant für die Auswertung sind. Der Inhalt jedes Wells wurde in je ein beschriftetes Reagenzglas überführt und deren Aktivität im  $\gamma$ -Counter gemessen. Jeweils drei Wells sind komplett gleich behandelt wurden. Es fand somit eine Dreifachbestimmung statt. Daraus wurde der Mittelwert errechnet und die Ergebnisse im Diagramm veranschaulicht.

Zum Zeitpunkt der Messung im  $\gamma$ -Counter konnte sich das Radiopeptid an drei verschiedenen Stellen der Zelle befinden. Zum einen konnte es bereits internalisiert sein und befand sich somit in den Lysosomen der Zelle. Es konnte spezifisch an den Somatostatin-Rezeptor gebunden sein, was eine Voraussetzung für die Internalisierung darstellt oder es haftete an der Zellmembran, was als unspezifische Bindung bezeichnet wird.

Die Wells wurden nach der Inkubation zweimal mit PBS bzw. Acid wash gewaschen. Der PBS Puffer bewirkte, dass nur die Aktivität der Radiopeptide in und an der Zelle gemessen wurde. Die Aktivität am Material der Platte (Well) und im Medium sollten nicht in die Messreihe mit aufgenommen werden. Der Acid wash bewirkte, dass sich die radioaktiv markierten Peptide am Rezeptor gebundene, jedoch noch nicht internalisierte von diesem lösen. Danach wurden nur noch die unspezifische Aktivität sowie die Internalisierung gemessen. Die spezifische Aktivität wurde in den Ergebnissen somit indirekt bestimmt. Bei

den ersten Internalisierungsversuchen mit Octreoscan<sup>®</sup> wurde mit PBS gewaschen. Als die Bindungsversuche mit DOTATOC und DOTA- $\beta$ -Ala-TOC durchgeführt wurden, benutzten wir den Acid wash, um die unspezifische Aktivität (Anteil an Radiopeptid, welches noch an der Zellmembran gebunden ist) zu messen.

Die Inkubation der Zellen fand im Brutschrank bei 37°C oder zum Teil im Kühlschrank bei 4°C statt. Bei 4°C findet keine energieverbrauchende Internalisierung mehr statt. Wenn man den Inhalt der Wells bei Inkubation im Brutschrank (37°C) bestimmt und die Ergebnisse von der Aktivität der Wells bei Inkubation im Kühlschrank (4°C) davon subtrahiert, erhielt man den Anteil von Aktivität, der nach Zugabe von 1.000.000 cpm nach Ablauf der Inkubationszeit internalisiert wurde.

Bei jeweils drei Wells einer Platte (die untere Reihe) wurde der Somatostatin-Rezeptor von nicht radioaktiv markierten SMS-14 geblockt. Es lag eine  $10^{-6}$  molare Lösung vor, dessen Konzentration um ein vielfaches höher liegt, als die des radioaktiven Somatostatins. Man spricht von „Überschuss“, da die Lösung um mindestens den Faktor 1000 höher konzentriert ist als Rezeptoren vorhanden sind. Wird trotz Blockierung der Rezeptoren noch Aktivität gemessen, so entspricht das der unspezifischen Bindung an der Zelle. Es kann weder zur spezifischen Bindung (Rezeptoren sind bereits besetzt) noch zu Internalisierung kommen.

### **2.2.2.2 Externalisierungsversuche**

Die Zellen wurden nach Gabe der Somatostatin-Analoga zunächst bei 37°C für eine Stunde zunächst inkubiert. In dieser Zeit sollten die Radiopeptide in die Zellen internalisiert worden sein. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt und frisches Reaktionsmedium hinzugefügt. Das Medium schwang man nun in den Wells und nahm zu bestimmten Messzeitpunkten 100  $\mu$ l Medium ab und bestimmte die Aktivität im  $\gamma$ -Counter. Somit erhielt man die Rate an externalisiertem Radiopeptid. Danach wurden die Zellen weiter inkubiert und neues Medium aufgefüllt, so dass sich in jedem Well immer 1 ml Medium befanden. Die Aktivität von 100  $\mu$ l muss mit dem Faktor 10 multipliziert werden, um die Anzahl der cpm in 1 ml zu erhalten.

### **2.2.2.3 Veranschaulichung der Ergebnisse im Diagramm**

Die Versuchsergebnisse wurden in Diagrammen (Excel, Microsoft, USA) bildlich dargestellt. Hierbei wurde mit Mittelwerten (MW) gearbeitet. Jeweils ein Mittelwert setzt sich aus drei Messwerten zusammen. Die Standardabweichung (STABW) wurde errechnet und dem Diagramm zugefügt. Falls in einigen Diagrammen keine Standardabweichung zu erkennen ist, so ist sie zu gering ausgefallen, um im Diagramm sichtbar zu werden. Die ersten Bindungsstudien wurden mit Octreoscan<sup>®</sup> durchgeführt, um die Techniken zu erlernen.

Bei den Externalisierungsversuchen sind wir davon ausgegangen, dass 7700 cpm DOTA- $\beta$ -Ala-TOC, sowie 3100 cpm Octreoscan<sup>®</sup> in die Zellen internalisiert wurde (siehe: Zusammenfassung der Internalisierungsversuche). Es wurde der Anteil von externalisierter Aktivität prozentual im Diagramm aufgetragen.

### **2.2.3 HPLC**

#### **2.2.3.1 Grundlagen**

Die HPLC (high performance liquid chromatography) ist ein Verfahren der Säulen-Flüssigkeits-Chromatographie. Sie ist ein Trennverfahren, bei dem die Probenflüssigkeit mittels einer flüssigen Phase (Eluent) unter hohem Druck über die stationäre Phase (Trennsäule) transportiert wird. Man unterscheidet in der Flüssigkeitschromatographie folgende Trennmechanismen: Absorptions-, Ionenaustausch-, Ausschluss-, Affinitäts- und Verteilungschromatographie, welche unterschiedliche Wechselwirkungen zwischen mobiler Phase, stationärer Phase und Probe aufweisen.

Ein HPLC-Gerät besteht aus vier Hauptbestandteilen: Pumpe, Einspritzsystem, Trennsäule und Detektor mit Auswertsystem. Die HPLC verwendet Trennpartikel mit Korngrößen von 3-10  $\mu$ m und erreicht damit hohe Trennstufenzahlen. Gleichzeitig müssen sie einen hohen Gegendruck beim Transport der mobilen Phase durch die dünne Trennsäule ( $d=2-6$ mm) überwinden. Daher sollten alle Teile möglichst druckstabil sein (300 bar). Die Probe wird zunächst drucklos in eine

Probenschleife injiziert, welche sich in einem 4-Wege-Ventil befindet. Durch Umschalten wird der Elutionsmittelstrom durch die Probenschleife geführt. Somit gelangt die Probe in die Säule. Diese analytische Säule ist meist aus Edelstahl und muss thermostatisierbar sein. Zur Detektion werden UV/VIS-, Fluoreszenz-Spektrometer, RI-amprometrische und Leitfähigkeits-Detektoren mit Durchflusszellen und Radioaktivitätsdetektoren verwendet.

Hauptsächlich Anwendung finden bei der HPLC Absorptions- und Verteilungschromatographie. Bei der Absorptionsschromatographie werden die Probenmoleküle durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen reversibel an die stationäre Phase gebunden. Die Verweildauer der Substanzen an dieser Phase ist aufgrund der unterschiedlich starken Wechselwirkungen mit der Oberfläche der stationären Phase unterschiedlich lang. So werden die Probesubstanzen voneinander getrennt. Bei der Verteilungschromatographie nutzt man die unterschiedliche Löslichkeit der zu trennenden Substanzen in den beiden Phasen aus. In der Normalphasen-Verteilungschromatographie ist die stationäre Phase polarer als die mobile Phase, in der Reversed-Phase (RP-Umkehrphase)-Chromatographie verhält es sich anders herum. Die stationäre Phase kann an ein Trägermaterial chemisch gebunden werden oder das Trägermaterial wird einfach mit der stationären Phase belegt. Die Reversed-Phase-Chromatographie wird vorwiegend bei unpolaren oder wenig polaren Substanzen verwendet.

In der HPLC werden zwei verschiedene Arbeitsweisen unterschieden. Die einfachste Anlage für die Routineanalytik ist das isokratische HPLC-System. Hierbei wird die Probe mit einem Eluenten (Laufmittel) gleich bleibender Zusammensetzung von der Säule eluiert. Das Probengemisch wird mit konstanter Fließmittelstärke eluiert. Im Gegensatz dazu wird bei der Gradientenelution der Eluent während des Trennvorgangs variabel zusammengesetzt und die Fließmittelstärke erhöht.

Die Darstellung der Ergebnisse der Stofftrennung erfolgt in Form eines Chromatogrammes, einer Elutionskurve. Sie stellt die Abhängigkeit für die Menge (Konzentration) der eluierten Substanzen von der Zeit dar. Die einzelnen Stoffe besitzen unterschiedliche Retentionszeiten. Die

Gesamtretentionszeit  $t_R$  setzt sich aus der Nettoretentionszeit  $t_S$  (Aufenthalt in der stationären Phase) und der Durchflusszeit der mobilen Phase (ohne Retention)  $t_m$  zusammen (SCHWEDT, 1996).

### 2.2.3.2 Versuch

Bei der hierfür verwandten HPLC erfolgte die Trennung mittels Reversed-phase-Chromatographie. Dabei befand sich in der Chromatographiesäule eine apolare (stationäre) Phase, an der eine polare (mobile) Phase vorbeiströmt, die im Verlauf des Versuches immer apolarer wurde. Polare Stoffe werden später eluiert als unpolare Stoffe. Um während der Chromatographie einen gleichmäßigen Fluss zu gewährleisten wurden die Schläuche durchspült, damit keine Luft in die Säule gelangte. Danach erfolgte ein Leerlauf. Als Flussmittel dienten in der mobilen Phase Natriumacetat (Lösung A 95%) und Acetonitril (Lösung B 5%) die die Säule für 35 Minuten kontinuierlich mit 1 ml/min durchliefen. Die Pumpe lief im General RS 232 Modus und der Flow betrug 1 ml/min, wobei das Probengemisch mit konstanter Fließmittelstärke von der Säule eluiert wurde. Das Programm Kroma System 3000 wurde verwendet.

Zunächst wurde eine Qualitätskontrolle mit 2  $\mu$ l markiertem DOTA- $\beta$ -Ala-TOC und 200  $\mu$ l Ammoniumacetat durchgeführt. Mit dem Start des Durchlaufs wurde auch der Radioaktivitätsdetektor gestartet.

Nach der Externalisierung wurde das Medium, welches exozytiertes Radiopeptid enthielt, ebenfalls in die HPLC gegeben. Dies geschah zu den jeweiligen Messzeitpunkten.

Die Ergebnisse wurden dann in Diagrammen veranschaulicht.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Bindungsstudien

##### 3.1.1 Internalisierungsversuche

##### 3.1.1.1 DOTATOC

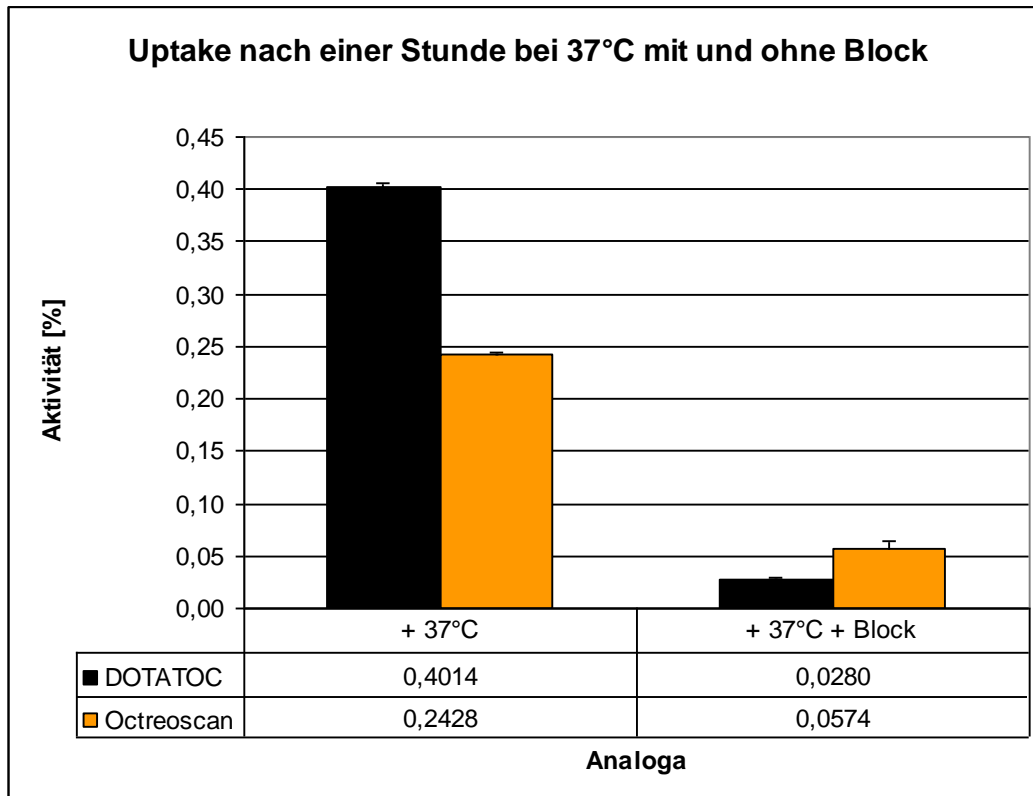


Abbildung 6: Internalisierung von DOTATOC und Octreoscan<sup>®</sup> bei 37°C nach einer Stunde

	Mittelwert [%]	STABW [%]
DOTATOC	0,4014	0,0039
Octreoscan <sup>®</sup>	0,2424	0,0015
DOTATOC + Block	0,0280	0,0007
Octreoscan <sup>®</sup> + Block	0,0574	0,0069

Tabelle 2: Internalisierung von DOTATOC und Octreoscan<sup>®</sup> bei 37°C nach einer Stunde (mit und ohne Block) mit Angabe der Standardabweichung

Zu erkennen ist, dass nach einer Stunde deutlich mehr DOTATOC in die G9-Zellen aufgenommen wird als Octreoscan<sup>®</sup>. Es wird fast zwei Drittel

mehr DOTATOC internalisiert als Octreoscan<sup>®</sup>, dabei lässt sich DOTATOC besser blocken als Octreoscan<sup>®</sup>.

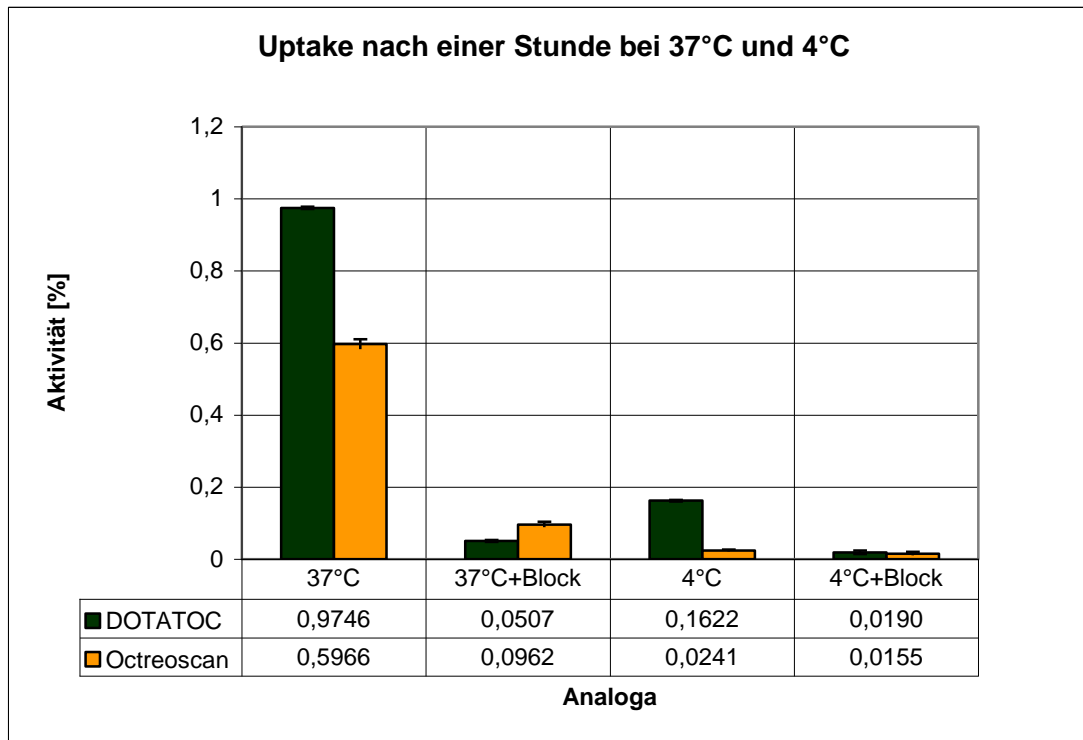


Abbildung 7: Internalisierung von DOTATOC und Octreoscan<sup>®</sup> bei jeweils 37°C und 4°C nach einer Stunde

	Mittelwert [%]	STABW [%]
DOTATOC 37°C	0,9746	0,0319
Octreoscan <sup>®</sup> 37°C	0,5966	0,0137
DOTATOC 4°C	0,1622	0,0024
Octreoscan <sup>®</sup> 4°C	0,0241	0,0026
DOTATOC 37°C + Block	0,0507	0,0030
Octreoscan <sup>®</sup> 37°C + Block	0,0962	0,0076
DOTATOC 4°C + Block	0,0190	0,0052
Octreoscan <sup>®</sup> 4°C + Block	0,0155	0,0048

Tabelle 3: Internalisierung von DOTATOC und Octreoscan<sup>®</sup> bei jeweils 37°C und 4°C nach einer Stunde (mit und ohne Block) mit Angabe der Standardabweichung

Es wird deutlich, dass Octreoscan<sup>®</sup> weniger in die Zelle internalisiert wird als DOTATOC. Dies erkennt man sowohl bei 37°C als auch bei 4°C. DOTATOC wird besser vom Rezeptor verdrängt als Octreoscan<sup>®</sup>.

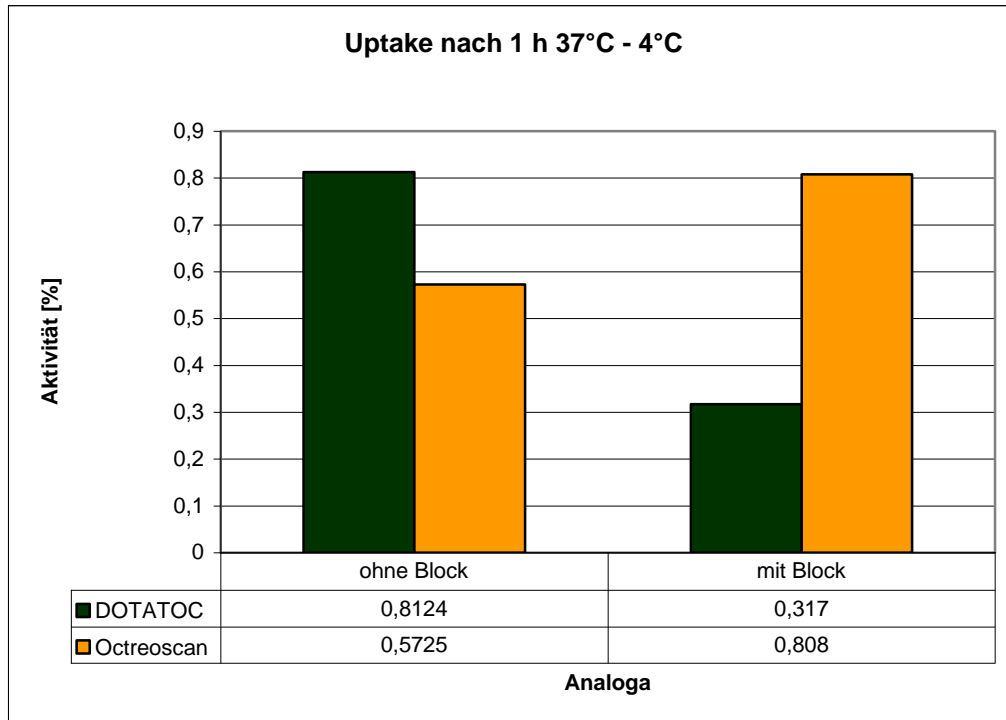


Abbildung 8: Internalisierung von DOTATOC und Octreoscan<sup>®</sup>, wobei die gemessene Aktivität bei 4°C von der Aktivität bei 37°C subtrahiert wurde

	Mittelwert [%]
DOTATOC 37°C - 4°C	0,8124
Octreoscan <sup>®</sup> 37°C - 4°C	0,5725
DOTATOC 37°C - 4°C + Block	0,0317
Octreoscan <sup>®</sup> 37°C - 4°C + Block	0,0808

Tabelle 4: Internalisierung von DOTATOC und Octreoscan<sup>®</sup>, wobei die gemessene Aktivität bei 4°C von der Aktivität bei 37°C subtrahiert wurde

Auf diesem Diagramm ist die reine Internalisierung dargestellt. Sie ist bei DOTATOC am größten. Beide Radiopeptide wurden wieder mit SMS-14 geblockt, wobei sich Octreoscan<sup>®</sup> schlechter vom Rezeptor verdrängen lässt.



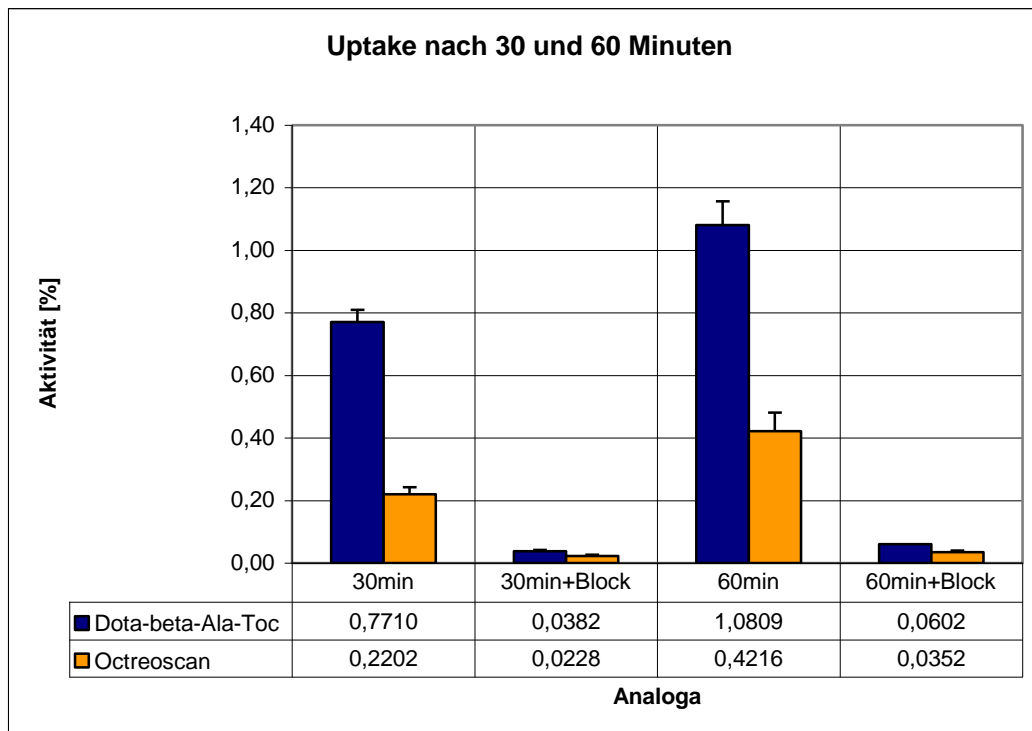
3.1.1.2 DOTA- $\beta$ -Ala-TOC

Abbildung 9: Internalisierung von DOTA- $\beta$ -Ala-TOC und Octreoscan<sup>®</sup> bei 37°C nach 30 min und nach 60 min

	30 min +/- STABW [%]	60 min +/- STABW [%]
DOTA- $\beta$ -Ala-TOC	0,7711 +/- 0,0388	1,0809 +/- 0,0752
Octreoscan <sup>®</sup>	0,2202 +/- 0,0228	0,4216 +/- 0,0596
DOTA- $\beta$ -Ala-TOC + Block	0,0382 +/- 0,0038	0,0228 +/- 0,0034
Octreoscan <sup>®</sup> + Block	0,0602 +/- 0,0053	0,0352 +/- 0,0048

Tabelle 5: Internalisierung von DOTA- $\beta$ -Ala-TOC und Octreoscan<sup>®</sup> bei 37°C nach 30 min und nach 60 min (mit und ohne Block) mit Angabe der Standardabweichung

Sowohl bei Octreoscan<sup>®</sup> als auch bei DOTA- $\beta$ -Ala-TOC nimmt die Internalisierung von einer halben Stunde auf eine Stunde zu. Jedoch wird DOTA- $\beta$ -Ala-TOC zu einem größeren Anteil internalisiert als Octreoscan<sup>®</sup>.

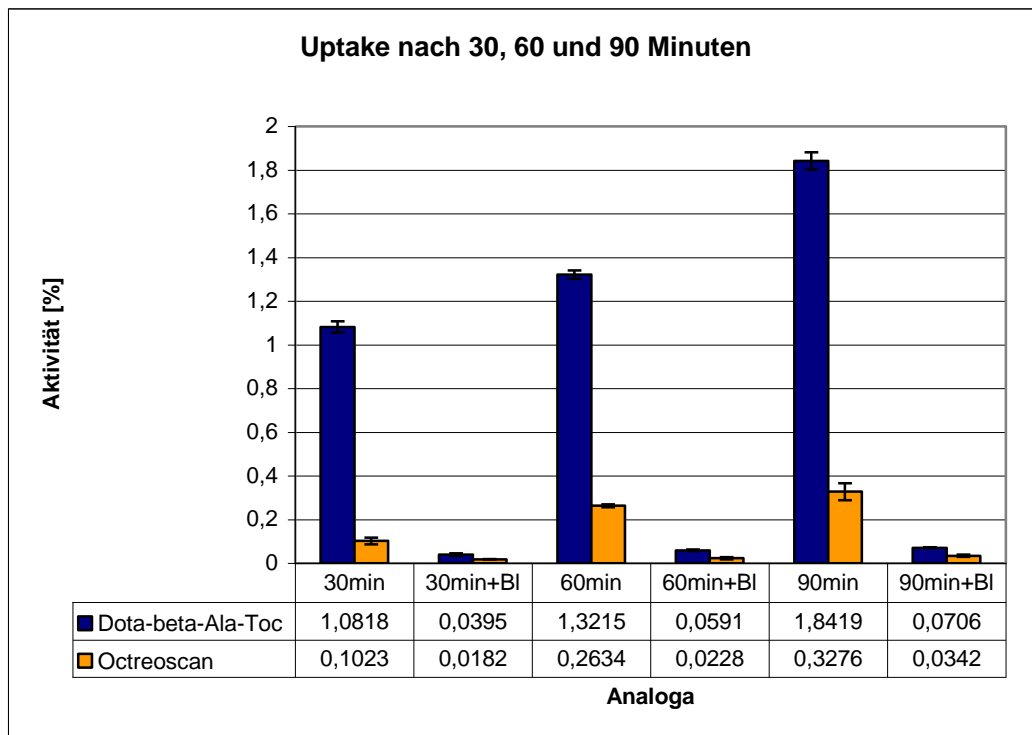


Abbildung 10: Internalisierung von DOTA- $\beta$ -Ala-TOC und Octreoscan<sup>®</sup> bei 37°C nach 30 min, 60 min und 90 min

	30 min +/- STABW [%]	60 min +/- STABW [%]	90 min +/- STABW [%]
DOTA- $\beta$ -Ala-TOC	1,0818 +/- 0,0260	1,3215 +/- 0,0189	1,8419 +/- 0,00401
Octreoscan <sup>®</sup>	0,1023 +/- 0,0154	0,2634 +/- 0,0064	0,3276 +/- 0,0391
DOTA- $\beta$ -Ala-TOC + Block	0,0395 +/- 0,0053	0,0591 +/- 0,0034	0,0706 +/- 0,0021
Octreoscan <sup>®</sup> + Block	0,0182 +/- 0,0013	0,0228 +/- 0,0053	0,0342 +/- 0,0048

Tabelle 6: Internalisierung von DOTA- $\beta$ -Ala-TOC und Octreoscan<sup>®</sup> bei 37°C nach 30 min, 60 min und 90 min (mit und ohne Block) mit Angabe der Standardabweichung

Im Zeitverlauf nimmt die Anzahl des internalisierten Radiopeptids zu. Auch in diesem Versuch wird mehr DOTA- $\beta$ -Ala-TOC in die Zellen internalisiert als Octreoscan<sup>®</sup>.

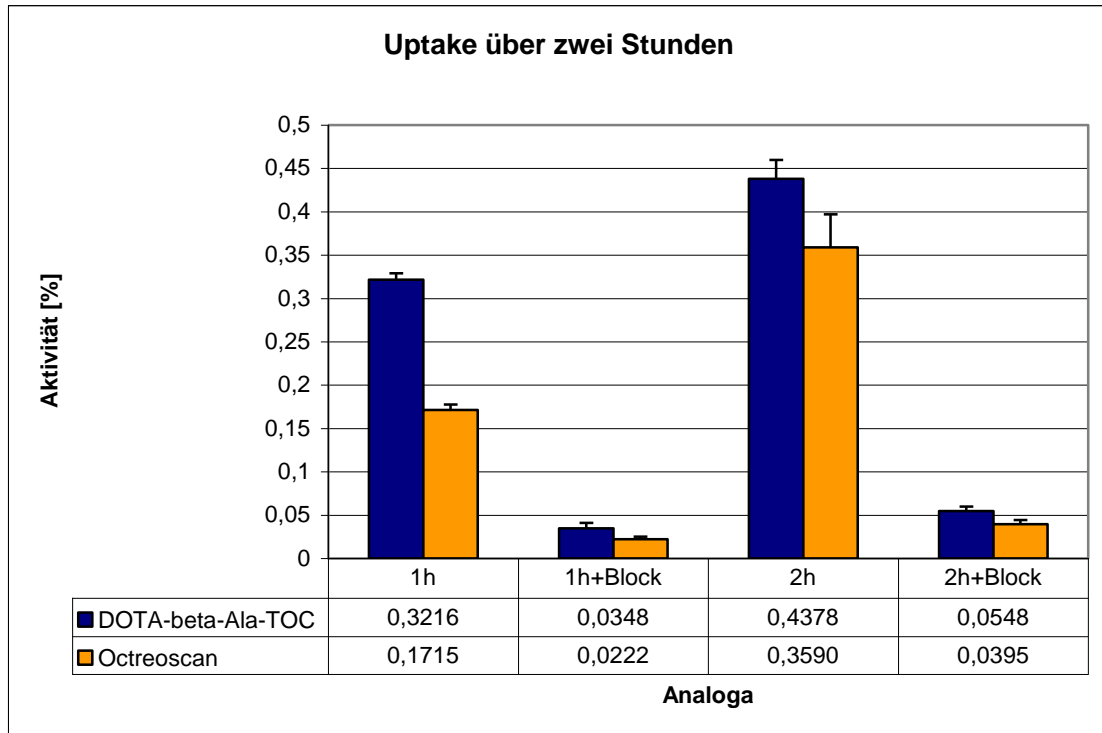


Abbildung 11: Internalisierung von DOTA- $\beta$ -Ala-TOC und Octreoscan<sup>®</sup> bei 37°C nach 1 Stunde und nach 2 Stunden

	1 h	2 h
DOTA- $\beta$ -Ala-TOC [%]	0,3216 +/- 0,0075	0,4378 +/- 0,0218
Octreoscan <sup>®</sup> [%]	0,1715 +/- 0,0060	0,3590 +/- 0,0279
DOTA- $\beta$ -Ala-TOC + Block [%]	0,0348 +/- 0,0063	0,0548 +/- 0,0042
Octreoscan <sup>®</sup> + Block [%]	0,0222 +/- 0,0029	0,0395 +/- 0,0050

Tabelle 7: Internalisierung von DOTA- $\beta$ -Ala-TOC und Octreoscan<sup>®</sup> bei 37°C nach 1 Stunde und nach 2 Stunden (mit und ohne Block) mit Angabe der Standardabweichung

Hier ist die Internalisierung von DOTA- $\beta$ -Ala-TOC und Octreoscan<sup>®</sup> dargestellt. Am größten ist sie nach zwei Stunden bei DOTA- $\beta$ -Ala-TOC. Es wird nach zwei Stunden aber nicht doppelt soviel radioaktiv markiertes Peptid internalisiert wie nach einer Stunde, was Folge einer limitierten

Rezeptor-Dichte sein dürfte. So ergibt sich kein linearer Verlauf, sondern eine Sättigungskurve.

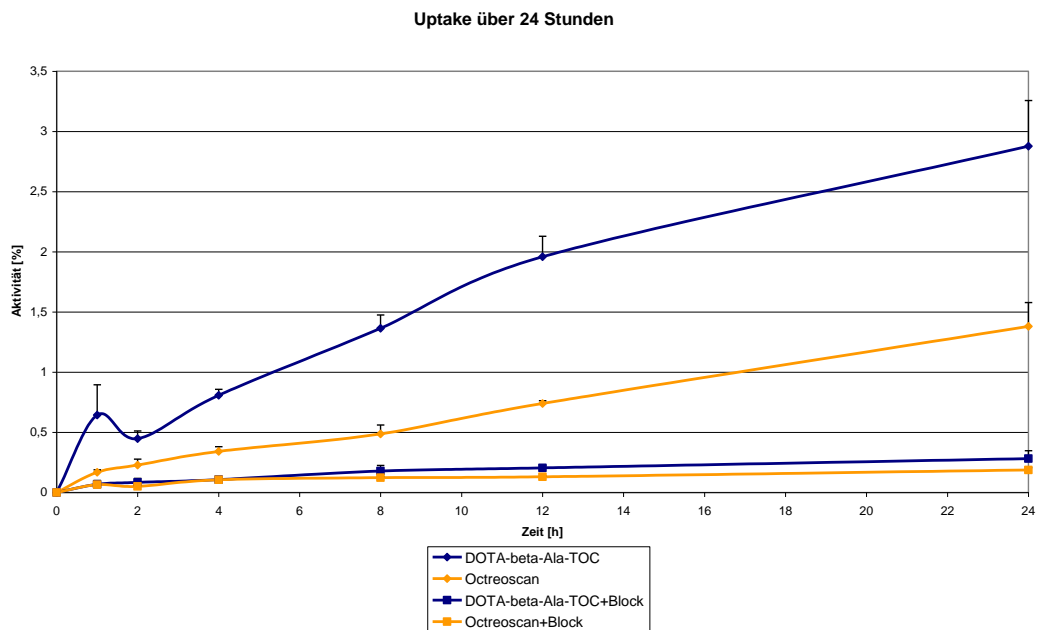


Abbildung 12: Internalisierung von DOTA- $\beta$ -Ala-TOC und Octreoscan<sup>®</sup> bei 37°C über 24 Stunden

	1 h	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h
DOTA- $\beta$ -Ala-TOC [%]	0,6436 +/- 0,2516	0,4480 +/- 0,0636	0,8084 +/- 0,0494	1,3646 +/- 0,1105	1,9594 +/- 0,1701	2,8779 +/- 0,3790
Octreoscan <sup>®</sup> [%]	0,1691 +/- 0,0194	0,2280 +/- 0,0503	0,3416 +/- 0,0389	0,4875 +/- 0,0737	0,7463 +/- 0,0234	1,3804 +/- 0,1983

Tabelle 8: Internalisierung von DOTA- $\beta$ -Ala-TOC und Octreoscan<sup>®</sup> bei 37°C über 24 Stunden mit Angabe der Standardabweichung

Über 24 Stunden wurde der Verlauf der Internalisierung von DOTA- $\beta$ -Ala-TOC und Octreoscan<sup>®</sup> dokumentiert. Insgesamt wird mehr DOTA- $\beta$ -Ala-TOC in die Zellen internalisiert. Bis auf den 2 h-Wert nimmt die Internalisierung stetig im Zeitverlauf zu. Der Graph steigt stetig an.

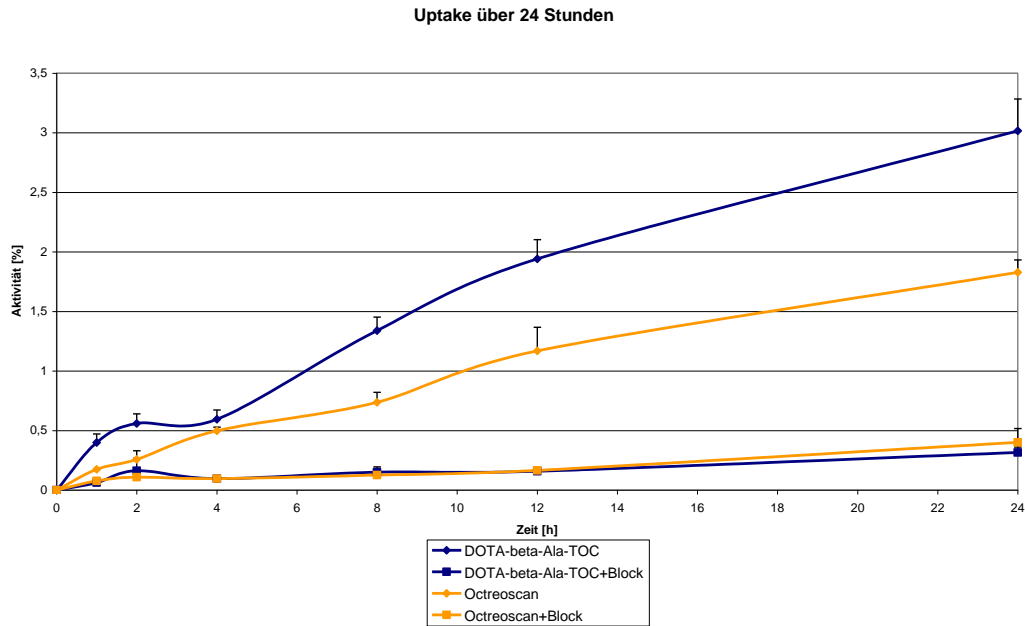


Abbildung 13: Internalisierung von DOTA- $\beta$ -Ala-TOC und Octreoscan<sup>®</sup> bei 37°C über 24 Stunden

	1 h	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h
DOTA- $\beta$ -Ala-TOC [%]	0,3997 +/- 0,0712	0,5594 +/- 0,0808	0,5950 +/- 0,0784	1,3402 +/- 0,1130	1,9414 +/- 0,1615	3,0168 +/- 0,2668
Octreoscan <sup>®</sup> [%]	0,1754 +/- 0,0211	0,2585 +/- 0,0724	0,4976 +/- 0,0307	0,7368 +/- 0,0835	1,1697 +/- 0,1972	1,8285 +/- 0,1040

Tabelle 9: Internalisierung von DOTA- $\beta$ -Ala-TOC und Octreoscan<sup>®</sup> bei 37°C über 24 Stunden mit Angabe der Standardabweichung

Im Zeitverlauf nimmt der Anteil von internalisiertem Peptid sowohl bei DOTA- $\beta$ -Ala-TOC als auch bei Octreoscan<sup>®</sup> zu. Bei gleicher Anzahl von Versuchszellen wird jedoch DOTA- $\beta$ -Ala-TOC zu einem höheren Anteil in die Zellen aufgenommen.

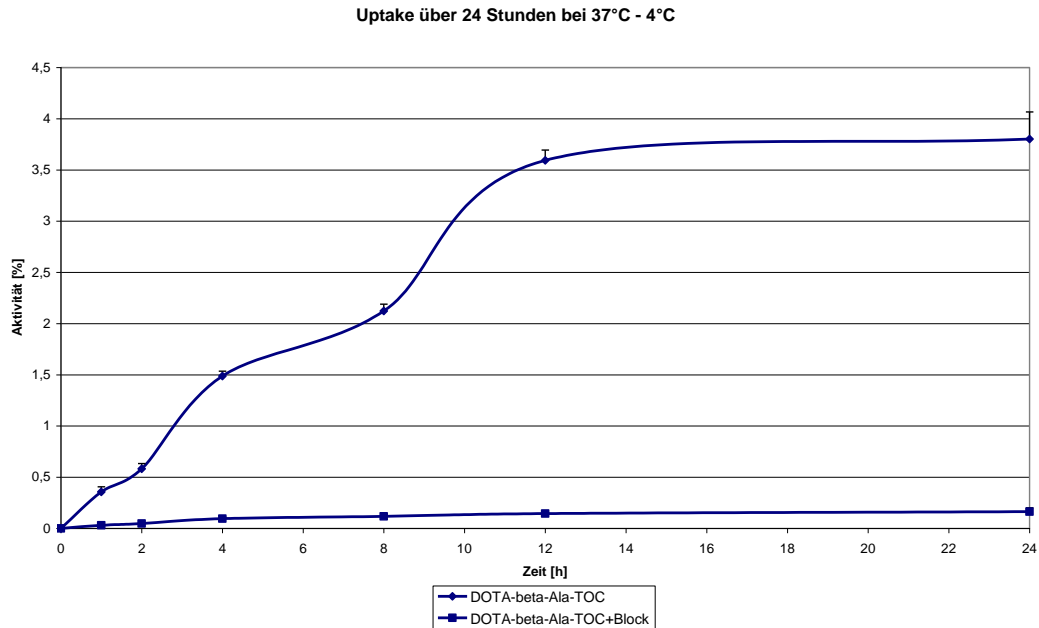


Abbildung 14: Internalisierung von DOTA-β-Ala-TOC bei 37°C und bei 4°C über 24 Stunden

	1 h	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h
DOTA-β-Ala-TOC 37°C [%]	0,4967 +/- 0,0805	0,7147 +/- 0,0901	1,6405 +/- 0,0886	2,3016 +/- 0,1217	3,7890 +/- 0,1828	3,9301 +/- 0,5224
DOTA-β-Ala-TOC 4°C [%]	0,1389 +/- 0,0161	0,1324 +/- 0,0117	0,1534 +/- 0,0077	0,1795 +/- 0,0137	0,1963 +/- 0,0196	0,1292 +/- 0,0091

Tabelle 10: Internalisierung von DOTA-β-Ala-TOC bei 37°C und bei 4°C über 24 Stunden mit Angabe der Standardabweichung

In diesem Diagramm sind die Summe aus Internalisierung und unspezifischer Bindung (37°C) und die unspezifische Bindung (4°C) dargestellt. Der Anteil des internalisierten Peptids hängt von der Inkubationszeit der Zellen und der Temperatur ab.

### 3.1.1.3 Zusammenfassung

In den folgenden Tabellen wurden die Ergebnisse der durchgeführten Internalisierungsversuche zusammengefasst. Unter jeweils gleichen Versuchsbedingungen lagen den Zellen die drei Radiopeptide in jeweils gleicher Aktivität vor (1.000.000 cpm/Well). Nach Messung der Aktivität in den Versuchszellen kommt man zu folgendem Ergebnis.

DOTA- $\beta$ -Ala-TOC [%]	0,77+/- 0,039
DOTATOC [%]	0,69 +/- 0,032
Octreoscan <sup>®</sup> [%]	0,31 +/- 0,035

Tabelle 11: Internalisierung nach 1 Stunde bei 37°C mit Angabe der Standardabweichung

Nach einer Stunde Inkubation der Zellen bei 37°C wird DOTA- $\beta$ -Ala-TOC zum größten Anteil internalisiert (0,77%). An zweiter Stelle folgt DOTATOC mit 0,69%. Octreoscan<sup>®</sup> weist die niedrigste Internalisierungsrate auf (0,31%) und wird weniger als die Hälfte der beiden anderen Peptide in die Zellen aufgenommen.

Wenn man nun die statistische Signifikanz errechnen möchte, muss man sich zunächst für einen statistischen Test entscheiden. Um die jeweils zwei Radiopeptide vergleichen zu können wurde der t-Test für zwei unabhängige Stichproben verwendet. Von jedem Peptid wurden drei Messwerte bestimmt. Somit entstehen 4 (3+3-2) Freiheitsgrade. Die Alternativhypothese besagt, dass sich die Erwartungswerte von Octreoscan<sup>®</sup> zu denen von DOTA- $\beta$ -Ala-TOC beziehungsweise DOTATOC unterscheiden.

Für die Stichproben Octreoscan<sup>®</sup> und DOTATOC ergibt sich eine Prüfgröße  $t=66,53$ . Dieser Wert ist größer als das 0,975-Quantil der t-Verteilung mit 4 Freiheitsgraden  $t(0,975;4) = 2,78$ . Es kann also mit einer Konfidenz von 95% behauptet werden, dass ein Unterschied in der Wirkung der beiden Radiopeptide besteht. Da 0,69 größer ist als 0,31 liegt die Internalisierung bei DOTA TOC höher als bei Octreoscan<sup>®</sup>.

Für die Stichproben Octreoscan<sup>®</sup> und DOTA- $\beta$ -Ala-TOC ergibt sich eine Prüfgröße von  $t=21,19$  und ein  $t(0,975; 4)$  von 2,77. Somit kann die Alternativhypothese ( $H_1: \mu_x \neq \mu_y$ ) angenommen werden. Da 0,77 größer ist als 0,31 findet bei DOTA- $\beta$ -Ala-TOC mehr Internalisierung statt als bei Octreoscan<sup>®</sup>.

	1 h	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h
DOTA-β-Ala-TOC [%]	0,59	0,66	1,18	1,97	2,77	3,01
	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	0,13	0,08	0,07	0,12	0,17	0,39
Octreoscan® [%]	0,19	0,31	0,58	0,86	1,42	1,83
	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	0,02	0,04	0,03	0,06	0,08	0,10

Tabelle 12: Internalisierung über 24 Stunden bei 37°C mit Angabe der Standardabweichung

Auch bei den Messungen über 24 Stunden zeigt sich deutlich, dass DOTA-β-Ala-TOC dem herkömmlichen Octreoscan® überlegen ist. Nach 24 Stunden wird DOTA-β-Ala-TOC zu 3,01% in die Versuchszellen internalisiert. Dagegen liegt der Anteil der Internalisierung von Octreoscan® nur bei 1,83%. Wie in der obigen Tabellen zu erkennen ist, ist DOTA-β-Ala-TOC dem Octreoscan® zu allen Messzeitpunkten überlegen.

Nun wurde der Somatostatin-Rezeptor mit nicht radioaktiv markiertem SMS-14 blockiert. Wird trotz Blockierung der Rezeptoren noch Aktivität gemessen, so entspricht das der unspezifischen Bindung an der Zelle. Es kann weder zur spezifischen Bindung (Rezeptoren sind bereits besetzt) noch zu Internalisierung kommen (Vorraussetzung wäre eine spezifische Bindung).

DOTA-β-Ala-TOC [%]	91,69 +/- 3,871
DOTATOC [%]	94,28 +/- 3,106
Octreoscan® [%]	82,88 +/- 3,558

Tabelle 13: Anteil des geblockten Peptids nach 1 Stunde bei 37°C mit Angabe der Standardabweichung

Sowohl DOTA-β-Ala-TOC als auch DOTATOC wird durch Blockade mit SMS-14 zu über 90% vom Rezeptor verdrängt. Insgesamt wird Octreoscan® am schlechtesten geblockt (83%).



	1 h	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h
DOTA-β-Ala-TOC [%]	87,36	82,63	88,98	90,01	89,00	90,17
	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	3,21	3,98	3,88	4,21	3,96	4,13
Octreoscan® [%]	68,57	78,43	83,99	85,90	85,57	84,65
	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	3,36	4,08	3,89	3,57	3,09	4,02

Tabelle 14: Anteil des geblockten Peptids über 24 Stunden bei 37°C mit Angabe der Standardabweichung

Auch über einen Verlauf von 24 Stunden wird deutlich, dass DOTA-β-Ala-TOC zu jedem Zeitpunkt der Messung geringer unspezifisch an den Zellen bindet als Octreoscan®.

### 3.1.2 Externalisierungsversuche

#### 3.1.2.1 DOTA- $\beta$ -Ala-TOC

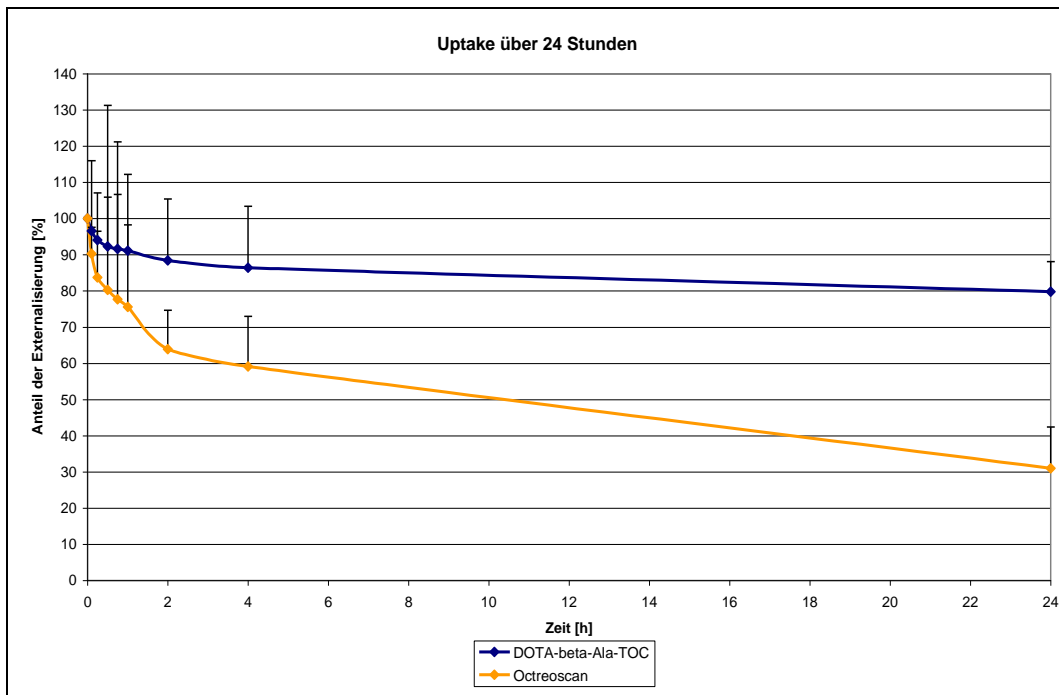


Abbildung 15: Externalisierung von DOTA- $\beta$ -Ala-TOC und Octreoscan<sup>®</sup> über 24 h

	0 h	0,1 h	0,25 h	0,5 h	0,75 h
DOTA- $\beta$ -Ala-TOC [%]	100 +/- 0	96,6 +/- 1,9	94,1 +/- 1,3	92,3 +/- 1,4	91,6 +/- 3,0
Octreoscan <sup>®</sup> [%]	100 +/- 0	90,3 +/- 0,7	83,7 +/- 1,3	80,3 +/- 5,1	77,7 +/- 2,9
	1 h	2 h	4 h	24 h	
DOTA- $\beta$ -Ala-TOC [%]	91,1 +/- 2,1	88,4 +/- 1,7	86,4 +/- 1,7	79,8 +/- 0,8	
Octreoscan <sup>®</sup> [%]	75,6 +/- 2,3	63,9 +/- 1,1	59,1 +/- 1,4	31 +/- 1,1	

Tabelle 15: Externalisierung von DOTA- $\beta$ -Ala-TOC und Octreoscan<sup>®</sup> über 24 Stunden mit Angabe der Standardabweichung

Per definitionem wird nach 0 Minuten kein Peptid externalisiert. Nach 1 h pegelt sich der Anteil von externalisierten Somatostatin-Analoga bei 1000 cpm ein. Einen Ausreißer findet man bei 45 Minuten, weswegen auch die Standardabweichung hoch ausfällt. Deutlich wird, dass Octreoscan<sup>®</sup> zu einem größeren Anteil externalisiert wird als DOTA- $\beta$ -Ala-TOC.

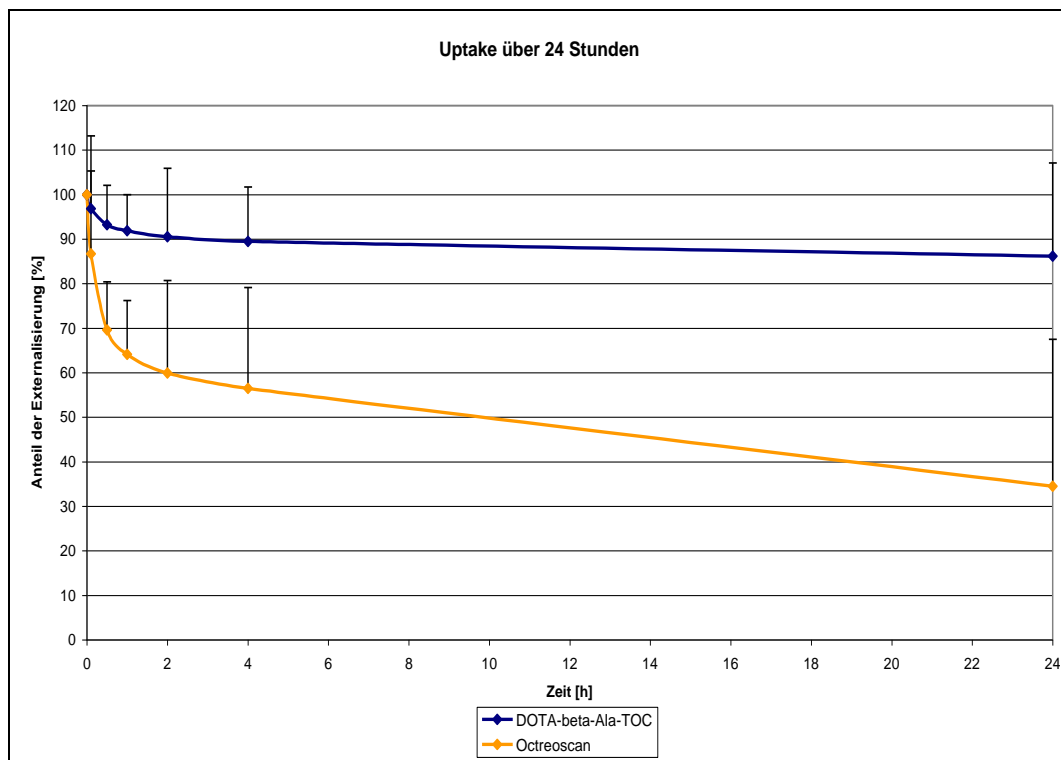


Abbildung 16: Externalisierung von DOTA- $\beta$ -Ala-TOC und Octreoscan<sup>®</sup> bei über 24 h

	0 h	0,1 h	0,5 h	1 h	2 h	4 h	24 h
DOTA- $\beta$ -Ala-TOC [%]	100 +/- 0	96,8 +/- 1,6	93,2+ /- 0,9	91,9 +/- 0,8	90,5 +/- 1,5	89,5 +/- 1,2	86,2 +/- 2,1
Octreoscan <sup>®</sup> [%]	100 +/- 0	86,7 +/- 1,9	69,6 +/- 1,1	64,1 +/- 1,2	59,9 +/- 2,1	56,5 +/- 2,3	34,5 +/- 3,3

Tabelle 16: Externalisierung von DOTA- $\beta$ -Ala-TOC und Octreoscan<sup>®</sup> bei über 24 Stunden mit Angabe der Standardabweichung

Auch bei diesem Versuch wird zu jedem Messzeitpunkt zu einem größeren Anteil Octreoscan<sup>®</sup> externalisiert als DOTA- $\beta$ -Ala-TOC. Die größten Unterschiede sind nach 0,1 h sowie 0,5 h zu erkennen. Nach 0,1 h befindet sich nur noch 86,7% des vorher internalisierten Octreoscans<sup>®</sup> in den Zellen. DOTA- $\beta$ -Ala-TOC ist dagegen fast vollständig zu 96,8% internalisiert. Auch nach 0,5 h verbleibt DOTA- $\beta$ -Ala-TOC noch zu 93,2% in den Versuchszellen, Octreoscan<sup>®</sup> nur noch zu 69,6%.

### 3.1.2.2 Zusammenfassung

In der folgenden Tabelle wurde der Anteil von intrazellulär verbliebenen Radiopeptid aller Externalisierungsversuche zusammengefasst. Per definitionem befindet sich zum Zeitpunkt 0 die gesamte Aktivität (das jeweilige Radiopeptid) in den Zellen. Nach Abschluss der Internalisierungsversuche gehen wir davon aus, dass nach einer Stunde 0,77% DOTA- $\beta$ -Ala-TOC und 0,33% Octreoscan<sup>®</sup> internalisiert wurden sind.

	0	0,1 h	0,5 h	1 h	2 h	4 h	24 h
DOTA- $\beta$ -Ala-TOC [%]	100	96,7	92,8	91,5	89,5	88,0	83,0
	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	0	0,75	1,15	1,45	1,6	1,45	1,45
Octreoscan <sup>®</sup> [%]	100	88,5	75,0	69,9	61,9	57,8	32,8
	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	0	1,3	3,1	1,75	1,6	1,85	2,2

Tabelle 17: Externalisierung über 24 Stunden bei 37°C

Die Tabelle zeigt, dass sich nach 24 Stunden nur noch 32,8% des vorher internalisierten Octreoscans<sup>®</sup> in den Zellen befindet, allerdings 83% von DOTA- $\beta$ -Ala-TOC. Zu jedem Messzeitpunkt ist DOTA- $\beta$ -Ala-TOC dem Octreoscan<sup>®</sup> überlegen, was bedeutet dass DOTA- $\beta$ -Ala-TOC weniger externalisiert wird.

## 3.2 HPLC

### 3.2.1 Qualitätskontrolle

Da neben der Qualitätskontrolle mit der C18-Kartusche die HPLC eine genauere Methode zur Beurteilung der Markierung darstellt, wurde vor jedem Externalisierungsversuch eine Qualitätskontrolle des vorher markierten Radiopeptids DOTA- $\beta$ -Ala-TOC durchgeführt.

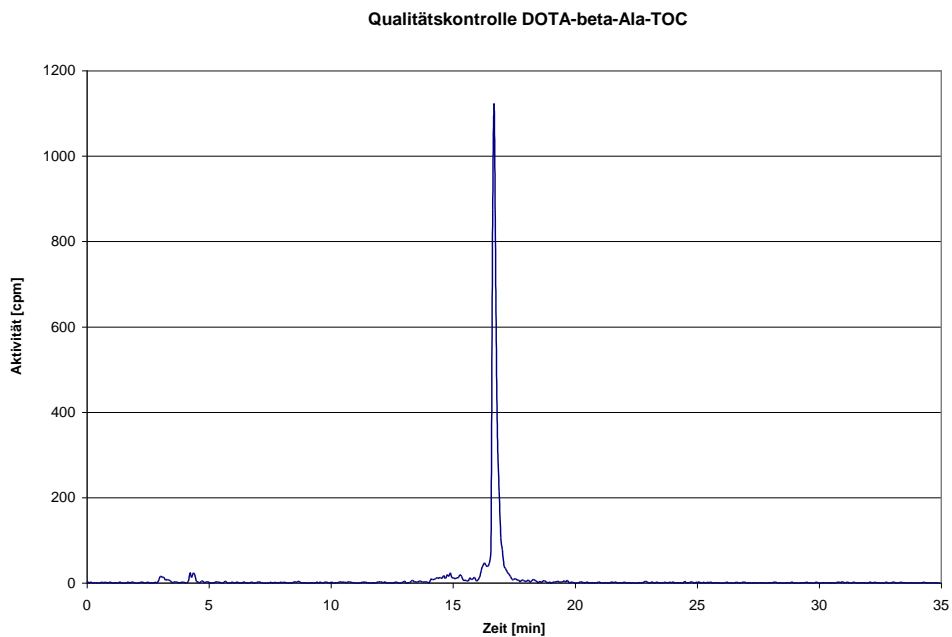


Abbildung 17: Qualitätskontrolle von DOTA- $\beta$ -Ala-TOC mit HPLC nach Markierung

In der

Abbildung 17: Qualitätskontrolle von DOTA- $\beta$ -Ala-TOC mit HPLC ist eine Elutionskurve dargestellt. Die HPLC zeigt einen scharfen Peak (Spitzenwert) bei 16,68 Minuten. Der prozentuale Anteil der DOTA- $\beta$ -Ala-TOC entsprechenden Aktivität an der gesamten zur Markierung verwendeten Aktivität beträgt über 95%.

### 3.2.2 Externalisierungsversuche

Nach Externalisierung von DOTA- $\beta$ -Ala-TOC aus den G9-Zellen wurde das Medium, welches exozytiertes Radiopeptid enthält, ebenfalls in die HPLC gegeben. Dies geschah zu den jeweiligen Messzeitpunkten (15 min, 1 h, 2 h, 4 h, 24 h). Dargestellt sind die Elutionskurven nach einer Stunde, zwei Stunden sowie 24 Stunden, da in diesen Diagrammen der Verlauf am deutlichsten wird.

Die Fläche unter der Kurve um den DOTA- $\beta$ -Ala-TOC-Peak (bei 16,68 min) in Bezug auf die Gesamtfläche unter der Kurve entspricht dem zu bestimmenden prozentualen Anteil der Aktivität des markierten DOTA-Peptides an der Gesamtaktivität.

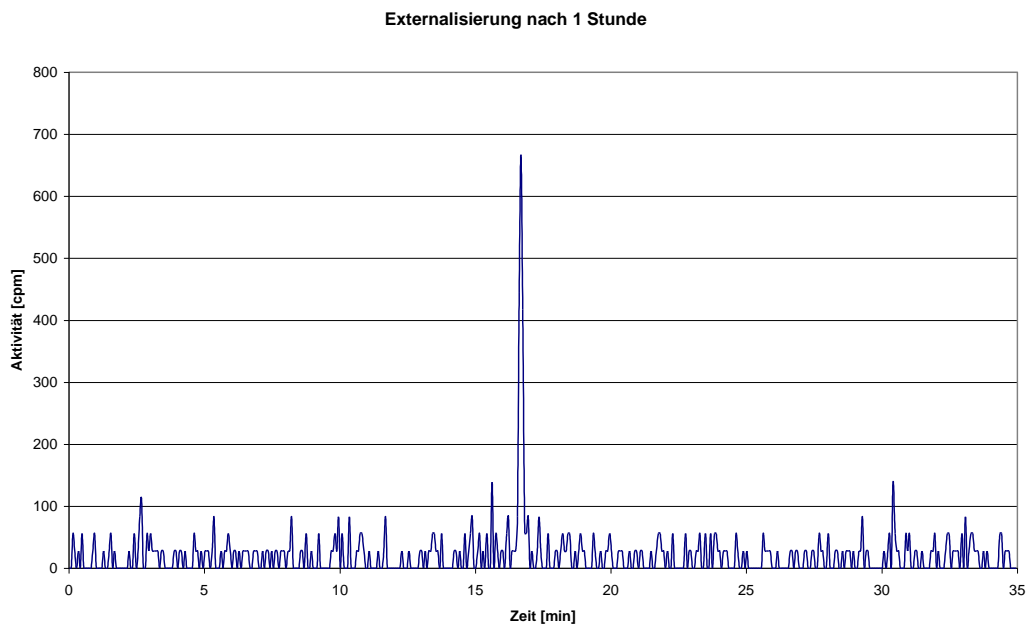


Abbildung 18: Elutionskurve von DOTA- $\beta$ -Ala-TOC nach Externalisierung nach 1 h

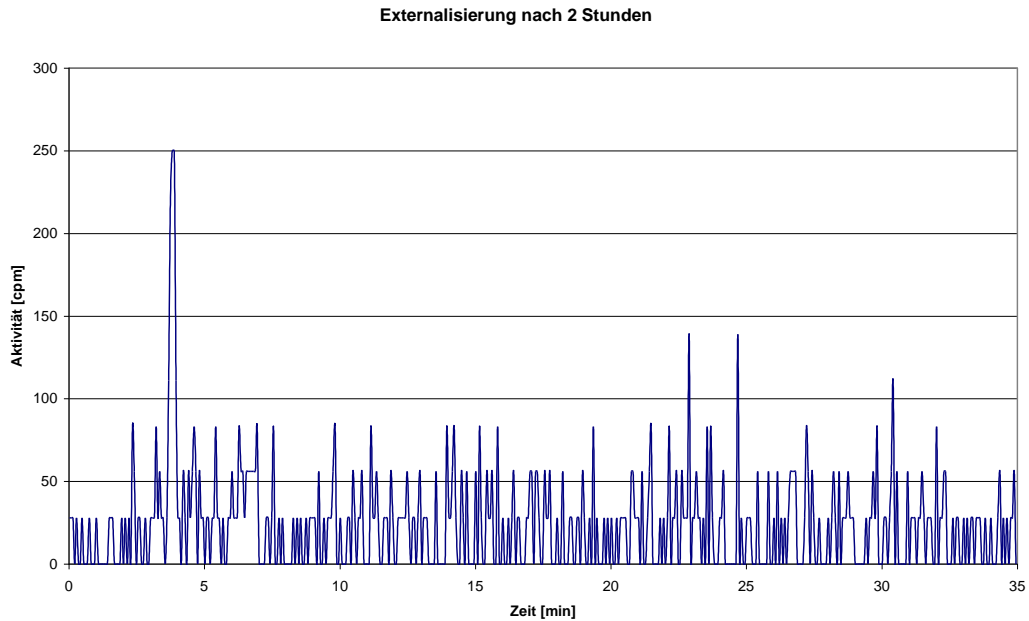


Abbildung 19: Elutionskurve von DOTA- $\beta$ -Ala-TOC nach Externalisierung nach 2 h

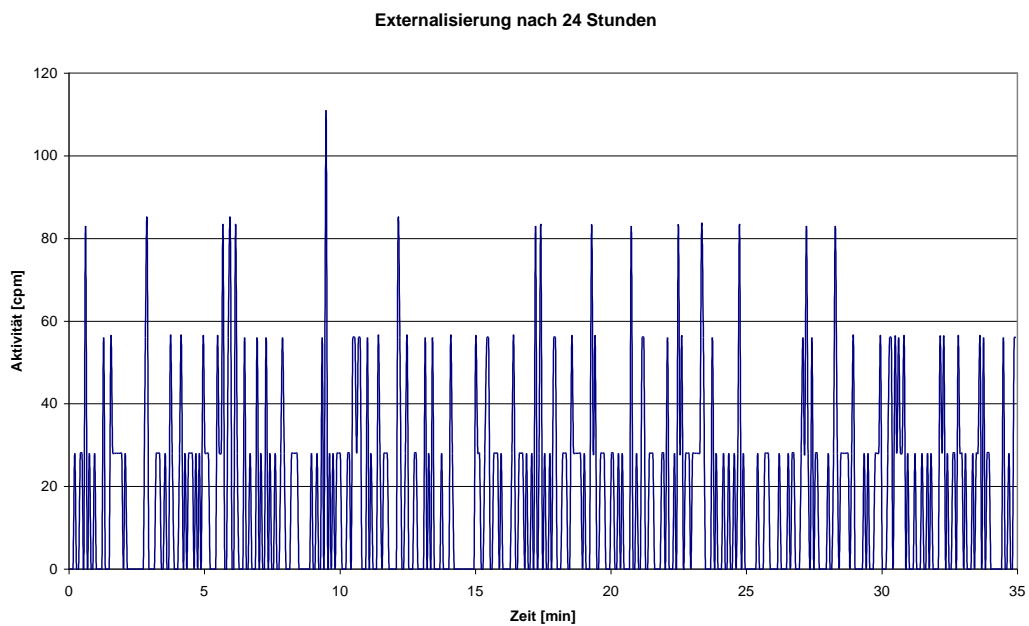


Abbildung 20: Elutionskurve von DOTA- $\beta$ -Ala-TOC nach Externalisierung nach 24 h

Im Verlauf lässt sich eine zunehmende Metaboliten-Konzentration der Lösung, welche aus exozytiertem DOTA- $\beta$ -Ala-TOC besteht, erkennen. Der Anteil an vorhandenem ungebundenem Nuklid und/oder markierter DOTA-Peptidbruchstücke nimmt deutlich zu. Bereits nach einer

Externalisierung nach zwei Stunden lässt sich der Peak bei circa 16 min nicht mehr sicher abgrenzen.



## **4 Diskussion**

### **4.1 Bindungsstudien**

#### **4.1.1 Zellkultur**

Die verwendeten Versuchszellen INR-G9 stammen vom Glucagonom eines Hamsters, welche den Somatostatin-Rezeptor 2 exprimieren (TAKAKI et al, 1986). Alle zwei bis drei Tage wurde Nährmedium gewechselt und die Zellen wurden gesplittet. Trotz einer möglichst sterilen Arbeitsweise kam es in unregelmäßigen Abständen zum Absterben der Versuchszellen. Dies geschah vor allem bei höheren Passagen, wenn die Zellen also häufiger geteilt wurden. Auch wenn sich zu viele Zellen in den Wells befanden, die Zellen also zu schnell gewachsen waren, lösten sie sich vom Boden ab. Dies führte dazu, dass konservierte Zellen wieder in Kultur genommen werden mussten, denn nur mit vitalen Versuchszellen wurden die Bindungsstudien durchgeführt.

Als Voraussetzung für einen Versuch dienten dicht bewachsene Wells. Nur durch mehrmalige Resuspendierung erreichte man eine gleichmäßige Anzahl von Zellen in den einzelnen Wells einer Platte. An den unterschiedlichen Versuchstagen konnte nicht immer mit genau der gleichen Anzahl von Zellen gearbeitet werden, aber in jedem Well des Versuchstages waren annähernd gleich viele Zellen.

Die INR-G9 Zellen exprimieren vor allem den sstr 2. Klinisch allerdings auch relevant ist der sstr 5. Die Ergebnisse der Untersuchungen beziehen sich somit nur auf den sstr 2. Es erlaubt keine Aussage zu der Internalisierung und Externalisierung der anderen vier Somatostatin-Rezeptoren. Weiterhin stammen die Versuchszellen vom Hamster und nicht vom Menschen.

#### **4.1.2 Markierung der Peptide**

Im Gegensatz zu Radiojod-markierungen, die nach lysosomaler Degradation in Form von Mono- oder Dijodotyrosin exozytiert werden,

verbleiben Radiometallchelatoren, konjugiert an Aminosäuren, zum größten Anteil intralysosomal und somit in der Zelle. Man spricht deshalb von einer „residualisierenden Markierung“.

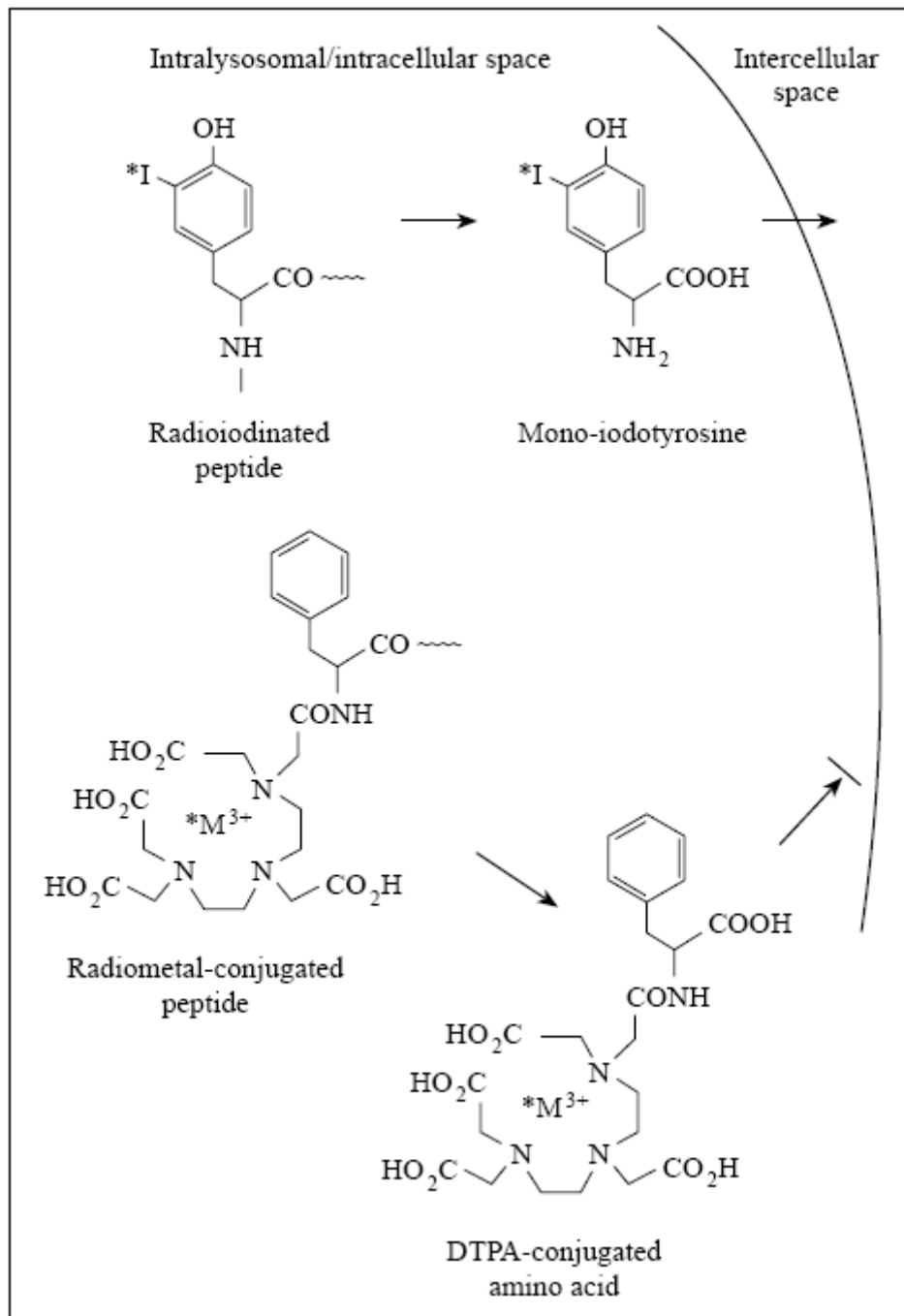
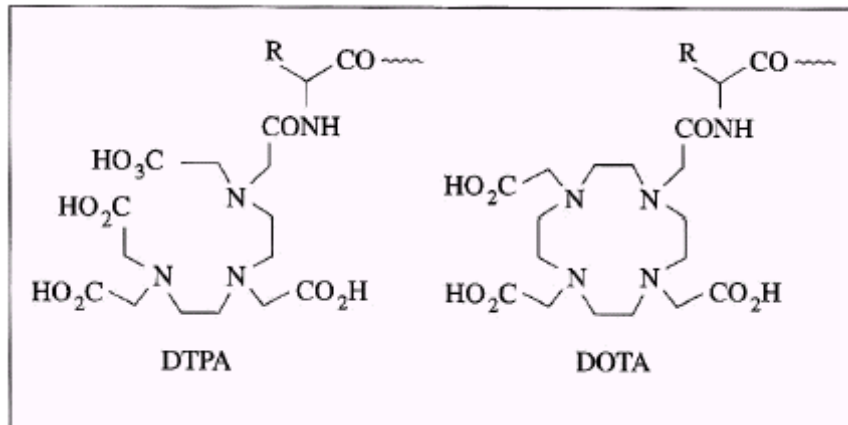


Abbildung 21: Schematische Darstellung der Unterschiede zwischen konventionell radiojodierten (nicht residualisierend) und radiometall-markierten (residualisierten) Peptiden (nach BEHR et al, 2001)

DTPA hat eine hohe Serumstabilität für die Chelierung von Indium (Octreoscan<sup>®</sup>), bindet das therapeutische Yttrium aber nicht stabil genug (BEHR et al, 2001).

DOTA hingegen hat eine ausreichende Chelierungsstabilität für Indium, Yttrium, Gallium, Kupfer, Samarium, Wismut und Blei.



Formel 3: Radiometall-Chelatoren (nach BEHR et al, 2001)

Zeitweise missglückte die Markierung von DOTA-β-Ala-TOC. Die Qualitätskontrolle ergab einen ungebundenen Anteil von mehr als 10%. Für eine ausreichende Qualität der Markierung musste der Puffer frisch angesetzt werden. Nur bei einem gebundenen Anteil von über 90% wurde ein Versuch durchgeführt.

Bei DOTA-β-Ala-TOC ist eine Alanin-Gruppe eingefügt wurden, um den Abstand zwischen Chelator und Rezeptorbindungsstelle zu vergrößern um somit die Rezeptoraffinität zu erhöhen.

#### 4.1.3 Internalisierungsversuche

Als Voraussetzung für eine Internalisierung sollte das Peptid eine hohe Spezifität zum Rezeptor haben (BEHR et al, 2001). DOTA-β-Ala-TOC hat eine hohe Affinität zum sstr 2 genau wie DOTATOC, welcher von den G9-Zellen überexprimiert wird. Octreoscan<sup>®</sup> bindet auch an den sstr 5.

Sowohl DOTATOC als auch bei DOTA-β-Ala-TOC wiesen eine geringere Standardabweichung als Octreoscan<sup>®</sup> auf.

Ein Teil der Versuchszellen wurde vorher geblockt, indem SMS-14 im Überschuss hinzugefügt wurde. Somit konnten die Radiopeptide nicht am

Rezeptor binden. Die Aktivität, welche nach Inkubationszeit gemessen wurde entspricht der unspezifischen Bindung, also der Bindung des Radiopeptids an der Zellmembran. Hierbei zeigte sich, dass sowohl DOTATOC als auch DOTA- $\beta$ -Ala-TOC eine unspezifische Bindung von weniger als zehn Prozent aufweisen, wobei DOTATOC dem DOTA- $\beta$ -Ala-TOC überlegen ist (3.1.1.3). Wenn die unspezifische Bindung so gering wie möglich ist, bedeutet das, dass die Radiopeptide nicht an anderen Körperzellen binden.

Der Acid wash führt dazu, dass die Radiopeptide, welche sich am Rezeptor befinden, vom Somatostatin-Rezeptor gelöst werden, um die unspezifische von der spezifischen Bindung abzugrenzen.

Vom Ergebnis des Acid wash (Aktivität in der Zelle und unspezifischer Bindung (non-specific-binding = NSB)) an der Membran wird nun NSB subtrahiert und dadurch erhält man den Anteil der reinen Internalisierung, also den Anteil der Radiopeptide in der Zelle.

Bei 4°C findet keine Internalisierung statt. Da die Versuche allerdings bei einer Raumtemperatur von 20°C durchgeführt wurden sind, kommt es in den Minuten der Abkühlung, bis die Zellen im Kühlschrank von 20°C auf 4°C abgekühlt wurden sind, zu geringen Maße auch zur Internalisierung.

Das bedeutet, dass Octreoscan<sup>®</sup> die größte unspezifische Bindung an den G9-Zellen aufweist, was auf eine niedrige Affinität am Somatostatin-Rezeptor hindeutet.

Im 24-Stundenversuch zeigt sich, dass nach zwei Stunden weniger Internalisierung stattfindet als nach einer Stunde. Im Diagramm erkennt man einen „Höcker“. Mögliche Ursache könnte ein Rezeptor-Recycling nach der Internalisierung sein. Im weiteren Verlauf nimmt die Internalisierung stetig zu.

Je länger die Zellen inkubieren, desto höher wird die Wahrscheinlichkeit der Zellen während des Versuches abzusterben. Daher ist auf Versuche über 24 Stunden verzichtet worden, da die Ergebnisse dann störanfälliger und somit ungenauer ausgefallen wären.

#### 4.1.4 Externalisierungsversuche

Nach Zusammenfassung aller Internalisierungsversuche ergibt sich ein Mittelwert von 0,77% Internalisierung nach einer Stunde Inkubationszeit für DOTA- $\beta$ -Ala-TOC und 0,31% für Octreoscan<sup>®</sup>.

Da die vitalen Zellen für die Externalisierungsversuche benötigt wurden, konnten die Internalisierungsrate diesmal nicht bestimmen werden, da die Zellen sonst hätten gewaschen und von den Wells gelöst werden müssten. Man nimmt als Hypothese also die oben angegebenen Mittelwerte für die Internalisierung an, bei gleicher Anzahl an Zellen und gleichem Versuchsaufbau.

Zur Messung der Externalisierungsrate wurden jeweils nur 100  $\mu$ l Medium entnommen und deren Aktivität gemessen. Hätte man das ganze Medium entnommen, hätten die Zellen ohne Medium versterben können. Dieser Vorgang war zwar rechnerisch aufwendiger, sollte aber verhindern, dass mit nicht vitalen Zellen weitergearbeitet wird.

Danach wurden 100  $\mu$ l frisches Medium hinzugefügt, welches keine Aktivität enthielt. Zum nächsten Messzeitpunkt wurde die Externalisierung nun zu niedrig gemessen, weil in dem frischen Medium noch keine Externalisierung stattfinden konnte.

Weiterhin wurden die Radiopeptide, welche nach Externalisierung noch an der Zellmembran hafteten nicht als Messdaten erfasst, da nur das Medium und nicht die Versuchszellen gemessen wurden.

Ein dritter Punkt, weswegen die Externalisierungsrate zu gering ausfallen könnte, ist dass externalisiertes Peptid bereits wieder internalisiert wurde.

Das ist zwar denkbar, allerdings bei der raschen intrazellulären Katabolisierung unwahrscheinlich.

Andererseits werden auch abgestorbene Zellen, welche sich mit internalisiertem Peptid im Medium befinden, mit gemessen. Dieser Fehler fällt vor allem nach langer Inkubationszeit ins Gewicht, da dann die Wahrscheinlichkeit, dass die Zellen versterben, größer ist. Da die Versuche aber sowohl mit DOTA- $\beta$ -Ala-TOC als auch mit Octreoscan<sup>®</sup> identisch durchgeführt wurden sind, ist der Fehler bei allen drei Peptiden gleich und somit die Ergebnisse vergleichbar.

Die Externalisierung von Octreoscan® war zu allen Messzeitpunkten höher als die von DOTA-β-Ala-TOC, was bedeutet, dass DOTA-β-Ala-TOC weniger exozytiert wird und somit länger in der Somatostatinrezeptor-positiven Zelle verbleibt. Was für therapeutische Zwecke gut ist, da so das Radiotherapeutikum länger in den Somatostatin-Rezeptor positiven Tumorzellen verbleibt und wirken kann.

## **4.2 HPLC**

### **4.2.1 Qualitätskontrolle**

Die Qualitätskontrolle wurde zum einen mit einer C18-Kartusche und zum anderen mittels HPLC durchgeführt. Bei beiden verwendeten Verfahren lag der Anteil von am Radiopeptid gebundenem Indium bei über 95%. DOTA hat somit eine ausreichende Chelierungsstabilität in vitro für Indium und die Markierung war somit Voraussetzung für die erfolgreiche Durchführung der Bindungsstudien. Allerdings erlaubt dies keine Aussagen über die Stabilität im Plasma beziehungsweise Serum.

### **4.2.2 Externalisierungsversuche**

Hierbei wurde die Zunahme der Metaboliten der markierten Lösung, also das eventuelle Freisetzen ungebundenen Nuklides oder markierter DOTA-Peptidbruchstücke bestimmt. Es war zu erwarten, dass sich eine zunehmende Katabolisierung des Radioliganden im Verlauf des Versuches zeigt.

Je später das entnommene Medium mit externalisiertem Radiopeptid in der HPLC aufgetrennt wurde, desto heterogener waren die Kataboliten.

## **4.3 Fazit**

In den letzten Jahren zeigte sich deutlich wie Peptidrezeptoren für die Diagnostik von neuroendokrinen, aber auch anderen soliden Tumoren in vivo eine immer größer werdende Rolle spielen. Die molekulare Grundlage hierfür bilden in vitro und präklinischen in vivo Studien.

In der vorliegenden Dissertation wurde gezeigt, dass das in Basel entwickelte DOTA- $\beta$ -Ala-TOC gegenüber DOTATOC und Octreoscan<sup>®</sup> in vitro mehrere Vorteile aufweist. Es hat eine höhere Internalisierungs- und geringe Externalisierungsrate als Octreoscan<sup>®</sup> und DOTATOC. In vitro ist es den anderen Konjugaten überlegen, wie sich in den Versuchen darstellen ließ.

Es scheint sich bei DOTA- $\beta$ -Ala-TOC um eine Substanz zu handeln, die zu Diagnostik und Therapie ähnlich gut geeignet ist wie DOTATOC.

## 5 Zusammenfassung

### 5.1 Einführung

Eine große Anzahl neuroendokrin aktiver Tumoren besitzen Somatostatin-Rezeptoren, an die radioaktiv markierte Somatostatin-Analoga binden. Primärtumoren und ihre Metastasen können somit, abhängig vom Tumortyp, durch eine Gamma-Kamera in 80% der Fälle nachgewiesen werden. Die oft weniger als 1 cm großen Tumoren sind durch andere bildgebende Verfahren (CT, MRT, Endoskopie und Sonographie) nur schwer darzustellen. Die Somatostatin-Rezeptor-Szintigraphie ist somit jeder anderen Staging-Methode bei neuroendokrinen Tumoren des Gastrointestinaltraktes abgesehen vom Insulinomen überlegen. Die therapeutische Anwendung von Somatostatin-Analoga bei Patienten mit neuroendokrinen Tumoren nimmt eine zunehmend wichtigere Stellung in der Nuklearmedizin ein, da diese Tumoren nur wenig auf eine Chemotherapie ansprechen.

### 5.2 Zielsetzung

Es wurden sowohl Internalisierungsversuche als auch Externalisierungsversuche durchgeführt. Das Ziel der Versuche war es, das Radiometall-markierte Somatostatin-Analogon DOTA- $\beta$ -Ala-TOC mit zwei bekannten Peptiden zu vergleichen, welches eine hohe Affinität zum Rezeptor aufweist (in diesem Falle Somatostatin-Rezeptor 2) und eine geringe unspezifische Bindung an der Zellmembran. Da bei DOTA- $\beta$ -Ala-TOC eine Alanin-Gruppe eingefügt worden ist, um den Abstand zwischen Chelator und Rezeptorbindungsstelle zu vergrößern erhöht sich somit die Rezeptoraffinität.

Ebenfalls sollte die Endozytose des Peptids (Internalisierung) größer sein als die des bereits verwendeten Octreoscans<sup>®</sup>. Dagegen sollte die Rate an externalisiertem Radiopeptid geringer ausfallen, als die des etablierten Octreoscans<sup>®</sup>.



### **5.3 Ergebnisse**

DOTA- $\beta$ -Ala-TOC wird zu einem höheren Anteil in die INR1-G9-Zellen (Hamster-Glucagonom) internalisiert als DOTATOC und Octreoscan<sup>®</sup>. Wobei DOTATOC zu einem größeren Anteil internalisiert wird als das herkömmliche Octreoscan<sup>®</sup>.

Die Externalisierungsrate fällt bei DOTA- $\beta$ -Ala-TOC geringer aus als bei Octreoscan<sup>®</sup>. Auch liegt der Anteil der unspezifischen Bindung an die Zellmembran bei DOTA- $\beta$ -Ala-TOC niedriger als bei Octreoscan<sup>®</sup>.

### **5.4 Schlussfolgerung**

In den durchgeführten Versuchen ist gezeigt worden, dass in vitro DOTA- $\beta$ -Ala-TOC dem herkömmlichen Octreoscan<sup>®</sup> überlegen ist. DOTA- $\beta$ -Ala-TOC weist eine höhere Internalisierungsrate als DOTATOC an den INR1-G9-Zellen auf.

Es scheint sich bei DOTA- $\beta$ -Ala-TOC um eine Substanz zu handeln, die zu Diagnostik und Therapie ähnlich gut geeignet ist wie DOTATOC.

Somit kann es eine Bedeutung für Diagnostik und Therapie neuroendokriner Tumoren haben.

Da es sich bei der Therapie meist um fortgeschrittene inoperable Tumoren handelt sind neben der Wirksamkeit die Nebenwirkungen des Radiotherapeutikums von größter Bedeutung.

## 6 Literaturverzeichnis

ALUMETS J, SUNDLER R, HAKANSON R. Cell Tissue Res 1977; 185: 465

ARNOLD R, RINKE A, KLOSE KJ, MÜLLER HH, WIED M, ZAMZOW K, SCHMIDT C, SCHADE-BRITTINGER C, BARTH P, MOLL R, KOLLER M, UNTERHALT M, HIDDEMANN W, SCHMIDT-LAUBER M, PAVEL M, ARNOLD CN. Octreotide versus octreotide plus interferon-alpha in endocrine gastroenteropancreatic tumors: a randomized trial. Clin Gastroenterol Hepatol 2005; 3: 761-771

ARNOLD R, SIMON B, WIED M. Treatment of neuroendocrine GEP tumors with somatostatin analogues. Digestion (suppl 1) 2000; 62: 84-91

ARNOLD R, SIMON B. Neuroendokrine Tumoren des Gastrointestinaltraktes. Klinische Onkologie 2002; H. Huber, W. Hiddemann, C.R. Bartram (Hrsg.). Springer Verlag Berlin-Heidelberg

ARNOLD R, TRAUTMANN ME, CREUTZFELD W, BENNING R et al. Somatostatin analogue octreotide and inhibition of tumour growth in metastatic endocrine gastroenteropancreatic tumors. Gut 1996; 38: 430-438

ARNOLD R, TRAUTMANN ME, CREUTZFELDT W, BRENNING R, BRENNING M, NEUHAUS C, JURGENSEN R, STEIN K, SCHAFER H, BRUNS C, DENNLER HJ. Somatostatin analogue octreotide and inhibition of tumour growth in metastatic endocrine gastroenteropancreatic tumours. Gut 1996; 38: 430-438

ARNOLD R, WIED M, BEHR TM. Somatostatin analogues in the treatment of endocrine tumors of the gastrointestinal tract. Expert Opin Pharmacother 2002; 3: 643-656

BALDWIN JM. Structure and function of receptors coupled to G proteins. Curr. Opin. Cell Biol. 1994; 6: 180-190

BALDWIN JM. The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. EMBO J. 1993; 12: 1693-1703

BARONE R, BORSON-CHAZOT F, VALKEMA R. Patient-Specific Dosimetry in Predicting Renal Toxicity with <sup>90</sup>Y-DOTATOC: Relevance of Kidney Volume and Dose Rate in Finding a Dose–Effect Relationship. J Nucl Med 2005; 46: 99S–106S

BAUER W, BRINER U, DOEFNER R, HALLER R, HUGUENIN R, MARBACH P, PETCHER TJ, PLESS. *Life Sci* 1982; 31: 1133

BEHR TM et al. Nuklearmedizinische Diagnostik und Therapie neuroendokriner Tumoren des Gastrointestinaltraktes einschließlich des Karzinoides. *Der Nuklearmediziner* 2003; 26: 121-133

BEHR TM, BÉHÉ M. Cholecystokinin-B/gastrin receptor-targeting peptides for staging and therapy of medullary thyroid cancer and other cholecystokinin-B receptor-expressing malignancies. *Semin Nucl Med* 2002; 32: 97-109

BEHR TM, BÉHÉ M, ANGERSTEIN C, GRATZ S, MACH R, HAGEMANN L, JENNER N, STIEHLER M, FRANK-RAUE K, RAUE F, DECKER W. Cholecystokinin-B/gastrin receptor binding peptides: preclinical development and evaluation of their diagnostic and therapeutic potential. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 3124-3138

BEHR TM, BÉHÉ M, BECKER W. Diagnostic applications of radiolabeled peptides in nuclear endocrinology. *QJ Nucl Med* 1999; 43: 268-280

BEHR TM, BÉHÉ M, KLUGE G et al. Neurotoxicity versus anti-tumor efficacy in radiopeptide therapy: facts and myths about the Scylla and Charybdis. *Eur Nucl Med* 2002; 29: 277-279

BEHR TM, GOTTHARDT M, BARTH A, BÉHÉ M. Imaging tumors with peptide-based radioligands. *QJ Nucl Med* 2001; 45: 189-200

BEHR TM, GRATZ S, MARKUS PM, DUNN RM, HÜFNER M, BECKER H, BECKER W. Enhanced bilateral somatostatin receptor expression in mediastinal lymph nodes („chimney sign“) in occult metastatic medullary thyroid cancer: a typical site of tumor manifestation? *Eur J Nucl Med* 1997; 24: 184-191

BEHR TM, GRATZ S, MARKUS PM, DUNN RM, HÜFNER M, SCHAUER A, FISCHER M, MUNZ DL, BECKER H, BECKER W. Anti-carcinoembryonic antigen antibodies versus somatostatin analogs in the detection of metastatic medullary thyroid carcinoma: are carcinoembryonic antigen and somatostatin receptor expression prognostic factors? *Cancer* 1997; 80: 2436-2457

BEHR TM, JENNER N, BÉHÉ M, ANGERSTEIN C, GRATZ S, RAUE F, BECKER W. Radiolabeled peptides for targeting of cholecystokinin-B/gastrin receptor expressing tumors: from preclinical development to initial clinical results. *J Nucl Med* 1999; 40: 1029-1044

BEHR TM, GOTTHARDT M, BECKER W, BÉHÉ M. Radioiodination of monoclonal antibodies, proteins and peptides for diagnosis and therapy. A review of standardized, reliable and safe procedures for clinical grade levels kBq to GBq in the Göttingen/Marburg experience. *Nuklearmedizin* 2002; 41: 71-79

BEHR TM, SHARKKEY RM, JUWEID MH et al. Reduction of the renal uptake of radiolabeled monoclonal antibody fragments by cationic amino acids and their derivatives. *Cancer Res* 1995; 55: 3825-3834

BOLTON AE, HUNTER WM. The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a  $^{125}\text{I}$ -containing acrylating agent. *Biochem J* 1973; 133: 529-539

BUSCOMBE JR, CAPLIN ME, HILSON AJW. Long-Term Efficacy of High-Activity  $^{111}\text{In}$ -Pentetreotide. Therapy in Patients with Disseminated Neuroendocrine Tumors. *J Nucl Med* 2003; 44: 1-6

BUSHNELL D et al. Effects of intravenous amino acid administration with Y-90 DOTA-Phe1-Tyr3-Octreotide (SMT487, OctreoTher) treatment. In: *Cancer Biother Radiopharm* 2004; 19: 35-41

CAPELLA C, HEITZ PU, HÖFLER H, SOLCIA E, KLÖPPEL G. Revised classification of neuroendocrine tumors of the lung, pancreas and gut. *Digestion* 1994; 55: 11-23

CIMETAN M, BUONADONNA A, CANNIZZARRO R. Somatostatin receptor scintigraphy versus chromogranin A assay in the management of patients with neuroendocrine tumors of different types: clinical role. *Annals of Oncology* 2003; 14: 1135-1141

DE JONG M, BREEMAN WAP, VALKEMA R, KRENNING BFB, KRENNING EP. Combination Radionuclide Therapy Using  $^{177}\text{Lu}$ - and  $^{90}\text{Y}$ -labeled Somatostatin analogs. *Journal of Nuclear medicine* 2005; 46: 13S-17S

DE JONG M, VALKEMA R, JAMAR F et al. Somatostatin receptor-targeted radionuclide therapy of tumors: preclinical and clinical findings. *Semin Nucl Med* 2002; 32: 133-140

DENZLER B, REUBI JC. Expression of somatostatin receptors in peritumoral veins of human tumors. *Cancer* 1999; 85: 188-198

EMAMI B, LYMAN J, BROWN A, et al. Tolerance of normal tissue to therapeutic irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1991; 21: 109 –122

FERGUSON SSG. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitisation and signalling. *Pharmacol. Rev.* 2001; 35: 1-24

FORRER F, UUSIJÄRVI H, STORCH D, MAECKE HR, MUELLE-BRAND J. Treatment with <sup>177</sup>Lu-DOTATOC of Patients with Relapse of Neuroendocrine Tumor after Treatment with <sup>90</sup>Y-DOTATOC. *Journal of Nuclear Medicine* 2005; 46: 1310-1316

FORRER F. Zielgerichtete, rezeptorvermittelte Radionuklidtherapie (Radiopeptidtherapie) neuroendokriner Tumoren. *Nuklearmedizin* 2008; 31: 114-131

GABRIEL M et al. <sup>68</sup>Ga-DOTA-Tyr<sup>3</sup>-Octreotide PET in Neuroendocrine Tumors: Comparison with Somatostatin Receptor Scintigraphy and CT. *Journal of Nuclear Medicine* 2007; 48: 508-518

GROSS M et al. Neuroendokrine Tumoren des Gastrointestinaltraktes. *Manual Gastrointestinale Tumoren*, Tumorzentrum München, Zuckschwerdt 2001

HEPPELER A, FROIDEVAUX S, MÄCKE HR, JERMANN E, BÉHÉ M, POWELL P, HENNIG M. Radiometal-Labelled Macrocyclic Chelator-Derivatised Somatostatin Analogue with Superb Tumour-Targeting Properties and Potential for Receptor-Mediated Internal Radiotherapy. *Chem Europ J* 1999; 5: 1974-1981

IVANCEVIC V, WÖRMANN B, NAUCK C, SANDROCK D, MUNZ DL, HIDDEMANN W, EMRICH D. Somatostatin receptor scintigraphy in the staging of lymphomas. *Leuk Lymphoma* 1997; 26: 107-114

JAKUBKE HD. *Peptide-Chemie und Biologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 1996

JANECKA A, ZUBRZYCKA M, JANECKI T. Somatostatin analogons. *J Pept Res* 2001; 58: 91

JAMAR F et al. Somatostatin receptor imaging with indium-111-pentetreotide in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors: safety, efficacy and impact on patient management. *J Nucl Med* 1994; 20: 542-549

JOHANSSON C, WISEN O, EFENDIC S, UVNAS-WALLENSTEN K. Effects of intravenous somatostatin and motilin on the blood glucose and hormonal response to oral glucose. *Digestion* 1981; 22: 126

KRENNING EP, BAKKER WH, BREEMAN WA, KOPER JW, KOOIJ PP, AUSEMA L, LAMERIS JS, REUBI JC, LAMBERTS SW. Localisation of endocrine-related tumors with radioiodinated analogue of somatostatin. *Lancet* 1989; 1 (8632): 242-244

KRENNING EP, KWEKKEBOOM DJ, BAKKER WH, BREEMAN WA, KOOIJ PP; OEI HY, VAN HAGEN M, POSTEMA PT, DE JONG M, REUBI JC et al. Somatostatin receptor scintigraphy with [<sup>111</sup>In-DTPA-D-Phe<sup>1</sup>]- and [<sup>123</sup>I-Tyr<sup>3</sup>]-octreotide: the Rotterdam experience with more than 1000 patients. *Eur J Nucl Med* 1993; 20: 716-731

KRENNING EP, KWEKKEBOOM DJ, OEI HY, DE JONG RJ, DOP FJ, REUBI JC, LAMBERTS SW. Somatostatin-receptor scintigraphy in gastro-entero-pancreatic tumors. An overview of European results. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 733: 416-424

KRENNING EP, KWEKKEBOOM DJ, PAUWELS S; KVOLS LK; REUBI JC. Somatostatin receptor scintigraphy. In: Freemann LM (ed). *Nuclear Medicine Annual 1995*. Raven Press, New York 1995; 1-50

KWEKKEBOOM DJ, KOOIJ PP, BAKKER WH, MÄCKE HR, KRENNING EP. Comparison of <sup>111</sup>In-DOTA-Tyr<sup>3</sup>-Octreotide in the same patients: Biodistribution, Kinetics, Organ and Tumor uptake. *Journal of Nuclear Medicine* 1999; 40: 762-767

KWEKKEBOOM DJ. Treatment of patients with gastroenteropancreatic (GEP) tumours with the novel radiolabelled somatostatin analogue [<sup>177</sup>Lu-DOTA, Tyr<sup>3</sup>]octreotate. In: *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imag.* 2003; 30: 417-22

LAMBERTS SW, BAKKER WH, REUBI JC, KRENNING EP. Somatostatin-receptor imaging in the localization of endocrine tumors. *N Engl J Med* 1990; 323: 1246-1249

LAMBERTS SW, KOPER JW, REUBI JC. Potential role of somatostatin analogues in the treatment of cancer. *Eur J Clin Invest* 1987; 17: 281-287

MATON PN. The carcinoid syndrome. *JAMA* 1988 Sep 16; 260 (11): 1602-5

MEARES CF, MOI MK, DIRIL H, KUKIS DL, MCCALL MJ, DESHAPNDE SV, DENARDO SJ, SNOOK D, EPENETOS AA. Macrocyclic chelates of radiometals for diagnostic and therapy. *Br J Cancer Suppl* 1990; 10: 21-26

METZ DC, JENSEN RT. Advances in gastric antisecretory therapy in Zollinger-Ellison-Syndrom. In: Mignon M, Jensen RT. *Endocrine tumours of the pancreas, frontiers of gastrointestinal research*. Karger, Basel 1995; 23: 240-57

MIGNON M. Natural history of neuroendocrine enteropancreatic tumors. *Digestion* 2000; 62 (Suppl. 1): 51-58

MOERTEL CG, LEFKOPOULOS M, LIPSITZ M. Streptozotocin-doxurubicin, streptozotocin-fluorouracil or chlorozotocin in the treatment of advanced islet-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 1992; 326: 519-523

MOLL S, NICKELEIT V, MUELLER-BRAND J, BRUNNER FP, MAECKE HR, MIHATSCH MJ. A new cause of renal thrombotic microangiopathy: Yttrium 90-DOTATOC internal radiopathy. *Am J Kidney Dis* 2001; 37: 847-51

NEININGER M. Untersuchungen zur Nephrotoxizität einer Radiopeptidtherapie mit 90-Y-DOTATOC. In: *Nuklearmedizin* 2008; 2: 15

NEWTON J N, SWERDLOW A J, dos SS I, VESSEY MP, GRAHAME-SMITH DG, PRIMATESTA P, and REYNOLDS DJ. The epidemiology of carcinoid tumours in England and Scotland. *Br J Cancer* 1994; 70: 939-942

OTTE A, JERMANN E, BÉHÉ M, GOETZE M, BUCHER HC, ROSER HW, HEPPELER A, MUELLER-BRAND J, MAECKE HR. DOTATOC: a powerful new tool for receptor-mediated radionuclide therapy. *Eur J Nucl Med* 1997; 24: 792-795

OTTE A, MUELLER-BRAND J, DELLAS S, NITZCHE EU, HERRMANN R, MÄCKE HR. Yttrium-90-labelled somatostatin-analogue for cancer treatment. *Lancet* 1998; 351: 417-418

PIMM MV et al. Prevention of renal tubule re-absorption of radiometal (indium-111) labelled Fab fragment of a monoclonal antibody in mice by systemic administration of lysine. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 1994; 21: 663-665

REUBI JC, LANDOLT AM. High density in somatostatin receptors in pituitary tumors in acromegalic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1984; 55: 1148-1151

REUBI JC, MÄCKE HR, KRENNING EP. Candidates for peptide receptor radiotherapy today and in the future. *Journal of Nuclear Medicine* 2005; 46: 67S-75S

REUBI JC. Neuropeptide receptors in health and disease: The molecular basis for in vivo imaging. *J Nucl Med* 1995; 36: 1825-1835

REUBI JC. Regulatory peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. *QJ Nucl Med* 1997; 41: 63-70

RINDI G, CAPELLE C, SOLCIA E. Cell biology, clinicopathological profile, and classification of gastro-enteropancreatic endocrine tumors. *J Mol Med* 1998; 76(6): 413-20

RINDI G, VILLANACCI V, UBIALI A. Biological and molecular aspects of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Digestion* 2000; 62 Suppl. 1: 19-26

SCHWEDT G. Taschenatlas der Analytik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1996

SCHWINDINGER WF, ROBISHAW J.D. Heterotrimeric G-protein  $\beta\gamma$ -dimers in growth and differentiation. *Oncogene* 2001; 20: 1653-1660

SCHYRA D, EHNINGER G, BREIDERT M. Diagnostik und Therapie neuroendokriner Tumoren. *Ärzteblatt Sachsen* 2003; 3: 100-103

SEREGNI E, CHITI A, BOMBARDIERI E. Radionuclide imaging of neuroendocrine tumors: biological basis and diagnostic results. *Eur J Nucl Med* 1998; 25: 639-658

SMITH-JONES PM, STOLZ B, BRUNS C, ALBERT R, REIST HW, FRIDRICH R, MÄCKE HR. Gallium-67/gallium-68-[DFO]-octreotide-a potential radiopharmaceutical for PET imaging of somatostatin receptor-positive tumors: synthesis and radiolabeling in vitro and preliminary in vivo studies. *J Nucl Med* 1994; 35: 317-325

SOLCIA E, KLÖPPEL G, SOBIN LH. Histological typing of endocrine tumours. *International histological classification of tumours 2000<sup>2</sup>*; Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York



STOFFEL M, JAMAR F, DONCKIER J, HAINAUT P, DECOSTER P, PAUWELS S. Increased uptake of indium-111 pentreotide up to 10 years after external thoracic irradiation: report of two cases. *Eur J Nucl Med* 1996; 23: 723-726

TAKAKI R, ONO J, YOKOGAWA Y, KUMAE S; HIRAOKA T. Isolation of glucagon-secreting cell lines by cloning insulinoma cells. *In vitro Cell Dev Biol* 1986; 22: 120-126

VAN ESSEN M, KRENNING EP, KOOIJ PP. Effects of Therapy with [<sup>177</sup>Lu-DOTA<sup>0</sup>,Tyr<sup>3</sup>]Octreotate in Patients with Paraganglionoma, Meningeoma, Small Cell Lung Carcinoma and melanoma. *Journal of Nuclear Medicine* 2006; 47: 1599-1606

VIRGOLINI I, BRITTON K, BUSCOMBE J et al. <sup>111</sup>In- and <sup>90</sup>Y-DOTA-Lanreotide: results and implications of the MAURITIUS trial. *Sem Nucl Med* 2002; 32: 148-155

WALDHERR C, PLESS M, MÄCKE HR et al. The clinical value of [<sup>90</sup>Y-DOTA]-D-Phe<sup>1</sup>-Tyr<sup>3</sup>-octreotide (<sup>90</sup>Y-DOTATOC) in the treatment of neuroendocrine tumours: a clinical phase II study. *Ann Oncol* 2001; 12: 941-945

WALDHERR C, PLESS M, MÄCKE HR et al. Tumor response and clinical benefit in neuroendocrine tumors after 7.4 GBq (90) Y-DOTATOC. *J Nucl Med*. 2002; 43: 610–616

WINKLER H, FISCHER-COLBRIE R. The chromogranins A and B: The first 25 years and future perspectives. *Neuroscience* 1992; 49: 497-528

ZIMMER T, SCHERUBL H. Endoscopic ultrasonography of neuroendocrine tumours. *Digestion* 2000; 62 Suppl 1: 45-50

## 7 Abbildungs-, Tabellen- und Formelverzeichnis

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur des natürlichen Somatostatin-14 und seiner stabilisierten Analoga (BEHR et al, 2001).....	8
Abbildung 2: Rezeptoren für regulatorische Peptide, die auf humanen Tumoren exprimiert werden (nach BEHR et al, 2001) .....	17
Abbildung 3: Anordnung der Transmembrandomänen von G-Proteingekoppelten Rezeptoren (nach BALDWIN, 1994).....	18
Abbildung 4: Sensitivität der Indium-DTPA-Phe <sup>1</sup> -Octreotid-Szintigraphie sowie Befunde der in vitro-sstr-Expression bei verschiedenen Tumoren (nach BEHR et al, 2001) .....	24
Abbildung 5: Somatostatin-Rezeptor-Szintigraphie einer 64jährigen Patientin mit Gastrinom im Duodenum, Klinik für Nuklearmedizin, Universität Marburg.....	26
Abbildung 6: Internalisierung von DOTATOC und Octreoscan <sup>®</sup> bei 37°C nach einer Stunde .....	40
Abbildung 7: Internalisierung von DOTATOC und Octreoscan <sup>®</sup> bei jeweils 37°C und 4°C nach einer Stunde .....	41
Abbildung 8: Internalisierung von DOTATOC und Octreoscan <sup>®</sup> , wobei die gemessene Aktivität bei 4°C von der Aktivität bei 37°C subtrahiert wurde. ....	42
Abbildung 9: Internalisierung von DOTA-β-Ala-TOC und Octreoscan <sup>®</sup> bei 37°C nach 30 min und nach 60 min .....	43
Abbildung 10: Internalisierung von DOTA-β-Ala-TOC und Octreoscan <sup>®</sup> bei 37°C nach 30 min, 60 min und 90 min .....	44
Abbildung 11: Internalisierung von DOTA-β-Ala-TOC und Octreoscan <sup>®</sup> bei 37°C nach 1 Stunde und nach 2 Stunden .....	45
Abbildung 12: Internalisierung von DOTA-β-Ala-TOC und Octreoscan <sup>®</sup> bei 37°C über 24 Stunden.....	46

Abbildung 13: Internalisierung von DOTA- $\beta$ -Ala-TOC und Octreoscan<sup>®</sup> bei 37°C über 24 Stunden..... 47

Abbildung 14: Internalisierung von DOTA- $\beta$ -Ala-TOC bei 37°C und bei 4°C über 24 Stunden..... 48

Abbildung 15: Externalisierung von DOTA- $\beta$ -Ala-TOC und Octreoscan<sup>®</sup> über 24 h..... 52

Abbildung 16: Externalisierung von DOTA- $\beta$ -Ala-TOC und Octreoscan<sup>®</sup> bei über 24 h ..... 53

Abbildung 17: Qualitätskontrolle von DOTA- $\beta$ -Ala-TOC mit HPLC nach Markierung..... 55

Abbildung 18: Elutionskurve von DOTA- $\beta$ -Ala-TOC nach Externalisierung nach 1 h ..... 56

Abbildung 19: Elutionskurve von DOTA- $\beta$ -Ala-TOC nach Externalisierung nach 2 h ..... 57

Abbildung 20: Elutionskurve von DOTA- $\beta$ -Ala-TOC nach Externalisierung nach 24 h ..... 57

Abbildung 21: Schematische Darstellung der Unterschiede zwischen konventionell radiojodierten (nicht residualisierend) und radiometallmarkierten (residualisierten) Peptiden (nach BEHR et al, 2001)..... 60

**7.2 Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Tumoren und ihre Somatostatin-Rezeptoren..... 10

Tabelle 2: Internalisierung von DOTATOC und Octreoscan<sup>®</sup> bei 37°C nach einer Stunde (mit und ohne Block) mit Angabe der Standardabweichung40

Tabelle 3: Internalisierung von DOTATOC und Octreoscan<sup>®</sup> bei jeweils 37°C und 4°C nach einer Stunde (mit und ohne Block) mit Angabe der Standardabweichung.....41

Tabelle 4: Internalisierung von DOTATOC und Octreoscan<sup>®</sup>, wobei die gemessene Aktivität bei 4°C von der Aktivität bei 37°C subtrahiert wurde..... 42

Tabelle 5: Internalisierung von DOTA-β-Ala-TOC und Octreoscan® bei 37°C nach 30 min und nach 60 min (mit und ohne Block) mit Angabe der Standardabweichung.....	43
Tabelle 6: Internalisierung von DOTA-β-Ala-TOC und Octreoscan® bei 37°C nach 30 min, 60 min und 90 min (mit und ohne Block) mit Angabe der Standardabweichung.....	44
Tabelle 7: Internalisierung von DOTA-β-Ala-TOC und Octreoscan® bei 37°C nach 1 Stunde und nach 2 Stunden (mit und ohne Block) mit Angabe der Standardabweichung.....	45
Tabelle 8: Internalisierung von DOTA-β-Ala-TOC und Octreoscan® bei 37°C über 24 Stunden mit Angabe der Standardabweichung.....	46
Tabelle 9: Internalisierung von DOTA-β-Ala-TOC und Octreoscan® bei 37°C über 24 Stunden mit Angabe der Standardabweichung.....	47
Tabelle 10: Internalisierung von DOTA-β-Ala-TOC bei 37°C und bei 4°C über 24 Stunden mit Angabe der Standardabweichung.....	48
Tabelle 11: Internalisierung nach 1 Stunde bei 37°C mit Angabe der Standardabweichung.....	49
Tabelle 12: Internalisierung über 24 Stunden bei 37°C mit Angabe der Standardabweichung.....	50
Tabelle 13: Anteil des geblockten Peptids nach 1 Stunde bei 37°C mit Angabe der Standardabweichung.....	50
Tabelle 14: Anteil des geblockten Peptids über 24 Stunden bei 37°C mit Angabe der Standardabweichung.....	51
Tabelle 15: Externalisierung von DOTA-β-Ala-TOC und Octreoscan® über 24 Stunden mit Angabe der Standardabweichung.....	52
Tabelle 16: Externalisierung von DOTA-β-Ala-TOC und Octreoscan® bei über 24 Stunden mit Angabe der Standardabweichung.....	53
Tabelle 17: Externalisierung über 24 Stunden bei 37°C.....	54

### 7.3 Formelverzeichnis

Formel 1: Strukturformel von DOTATOC .....	14
Formel 2: Strukturformel von DOTA-β-Ala-TOC.....	15
Formel 3: Radiometall-Chelatoren (nach BEHR et al, 2001) .....	61

## 8 Abkürzungsverzeichnis

7TM-Rezeptor	Sieben-Transmembran-Rezeptor
5-JÜR	5-Jahresüberlebensrate
Bq	Bequerel
Ca <sup>2+</sup>	Kalziumion
cAMP	zyklisches 3',5'-Adenosin-Monophosphat
CgA	Chromogranin A
Ci	Curie
counts	gezählte Anzahl der radioaktiven Zerfälle
c	zenti
cpm	gezählte Zerfälle pro Minute
d	Durchmesser
DAG	Diacylglycerol
DFA	Deferoxamin
DOTA	1,4,7,10-terazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure, Chelator
DTPA	Diethylen-Triamin-Pentaacetat, Chelator
eV	Elektronenvolt
G	Giga
GDP	Guanosindiphosphat
GEP-Tumoren	gastro-entero-pankreatische Tumoren
GH	growth hormon-Wachstumshormon
GIT	Gastrointestinaltrakt
GLP-1	Glucagon-like peptide-1
GPCR	G protein-coupled receptors
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HPLC	high performance liquid chromatography
<sup>111</sup> In	Indium-111, Radionuklid
IP <sub>3</sub>	Inositol (1,4,5)tris-Phosphat
k	Kilo

K <sup>+</sup>	Kaliumion
<sup>177</sup> Lu	Lutetium-177, Radionuklid
M	Mega
MBq	Megabequerel
m	Milli
min	Minuten
mm	Millimeter
MW	Mittelwert
MSv	Millisievert
NET	neuroendokrine Tumoren
NSE	neuronspezifische Enolase
PET	Positronen Emissions Tomographie
ROI	region of interest
rpm	Umdrehungen pro Minute
SMS	Somatostatin
SPECT	Single Photon Emission Computer Tomographie
sstr	Somatostatin-Rezeptor
STABW	Standardabweichung
Sv	Sievert
t <sub>1/2</sub>	Halbwertszeit
TETA	Triethylentetraamin
TTHA	Trithylenetraminhexaessigsäure
VIP	vasoaktives intestinales Peptid
<sup>90</sup> Y	Yttrium-90, Radionuklid

## **9 Anhang**

### **9.1 Verzeichnis meiner akademischen Lehrer**

Arnold, R.; Aumüller, G.; Basler, H.-D.; Baum, E.; Behr, T.M.; Bertalanffy, H.; Czubayko, F.; Daut, J.; Engenhardt-Cabillic, R.; Feuser, B.; Fruhstorfer, H.; Gemsa, D.; Geus, A.; Gotzen, L.; Griss, P.; Gudermann, T.; Happle, R.; Hasilik, A.; Jungclas, H.; Kern, H.F.; Klose, K.J.; Koolman, J.; Kretschmer, V.; Krause, W.; Kroll, P.; Maisch, B.; Moll, R.; Mueller U.; Mutters, R.; Neubauer, A.; Oertel, W.H.; Remschmidt, H.; Röhm, K.H.; Rothmund, M.; Schäfer, H.; Schüffel, W.; Seyberth, H.; Sommer, N.; Steiniger, B.; Suske, G.; Voigt, K.; Weihe, E.; Werner, J.A.; Westermann, R.

## 9.2 Danksagung

Für die Überlassung des Themas dieser Doktorarbeit möchte ich mich als erstes bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Thomas M. Behr herzlich bedanken. Vor allen Dingen dafür, dass ich nie lange auf eine Antwort warten musste.

Weiterer Dank gilt Frau Birgit Herbst-Brück und Herrn Dr. rer. nat. Martin Béhé, die mich bei meinen Versuchen im Labor immer toll unterstützt haben. Durch alle anderen Mitarbeiter der Abteilung und Mitdoktoranden entstand eine lockere Atmosphäre und somit war ein angenehmes Arbeiten in der Klinik für Nuklearmedizin möglich.

Ich danke meiner Mutter Regina und meinem Vater Rainer dafür, dass sie mich jederzeit unterstützt und stets auf meinem Weg ermutigt haben. Und meinem Mann und allen Freunden, die immer an mich geglaubt haben.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Dr. med. Andreas Pfestroff, der mich über die Jahre immer ausgezeichnet betreut hat und zu dem ich mit jedem Problem kommen konnte. Zu jeder Zeit konnte ich auf Dich zählen. Du hattest soviel Geduld mit mir und ich wünsche Dir noch ganz viele weitere Doktoranden. Ohne Dich wäre diese Dissertation nicht möglich gewesen.



