

**Radiomarkierung, Derivatisierung und Biodistribution eines Somatostatin-
NOC-Analogons**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich–Wilhelms-Universität
Bonn

Torjan Magne Haslerud
aus Stavanger/Norwegen

2012

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. rer. nat. S. Guhlke
2. Gutachter: Professor Dr. med. N. Wernert

Tag der Mündlichen Prüfung: 11.06.2012

Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin, Universitätsklinikum Bonn
Direktor: Prof. Dr. med. H. J. Biersack

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Abkürzungsverzeichnis | 9 |
| 2 | Einleitung | 11 |
| 2.1 | γ -Szintigraphie/SPECT | 11 |
| 2.2 | Positronenemissionstomographie (PET) | 12 |
| 2.3 | Radionuklide und Tracer | 13 |
| 2.3.1 | Diagnostische Radionuklide | 14 |
| 2.3.2 | Therapeutische Radionuklide | 16 |
| 2.3.3 | Technetium | 18 |
| 2.4 | Somatostatin | 20 |
| 2.5 | Somatostatinrezeptoren | 21 |
| 2.6 | Somatostatinanaloga | 23 |
| 2.7 | Radioaktivmarkierte Somatostatinanaloga | 26 |
| 2.8 | Technetiummarkierte Somatostatinanaloga | 28 |
| 2.9 | Technetiumcarbonyl-Komplexe | 30 |
| 2.10 | DHis-DLys-NOC-SS-Analogon | 32 |
| 3 | Aufgabenstellung | 34 |
| 4 | Material und Methoden | 35 |
| 4.1 | Material | 35 |
| 4.2 | Verwendete Geräte | 36 |
| 4.3 | HPLC-Gradienten | 37 |
| 4.4 | Allgemeine Arbeitsvorschriften | 37 |
| 4.4.1 | Herstellung des ^{99m}Tc -triaquatricarbonylkations | 37 |
| 4.4.2 | Abspaltung der Dde-Schutzgruppe | 38 |
| 4.4.3 | Aufreinigung von Tc-99m-markierten Peptiden bzw. Markierungsvorläufern | 38 |
| 4.5 | Vorläufersynthesen | 39 |
| 4.5.1 | Herstellung von DHis-DLys-NOC | 39 |
| 4.5.2 | Herstellung von DHis-DLys-DOTA-NOC | 39 |
| 4.5.3 | Herstellung von DHis-DLys-TMS-NOC | 40 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4.6 | Radiosynthesen | 40 |
| 4.6.1 | Herstellung von [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})$]-DHis-DLys-NOC (Weg 1) | 41 |
| 4.6.2 | Herstellung von [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})$]-DHis-DLys-NOC (Weg 2) | 41 |
| 4.6.3 | Synthese von [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})$]-DHis-DLys-DOTA-NOC (Weg 1) | 41 |
| 4.6.4 | Synthese von [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})$]-DHis-DLys-DOTA-NOC (Weg 2) | 43 |
| 4.6.5 | Synthese von [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})$]-DHis-DLys-TMS-NOC (Weg 1) | 43 |
| 4.6.6 | Synthese von [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})$]-DHis-DLys-TMS-NOC (Weg 2) | 44 |
| 4.6.7 | Synthese von DHis-DLys[^{177}Lu -DOTA]-NOC | 44 |
| 4.7 | Sonstige Synthesen | 45 |
| 4.7.1 | Herstellung des Rheniumtriaquatricarbonylkations | 45 |
| 4.7.2 | Herstellung von [$\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})$]-DHis-DLys-NOC | 46 |
| 4.8 | Rezeptorbindungsstudien | 47 |
| 4.8.1 | Bindungsassay-Pufferlösung | 47 |
| 4.8.2 | Rezeptorbindungsassays | 47 |
| 4.9 | Serumstabilität | 48 |
| 4.10 | Biodistributionsuntersuchungen | 49 |
| 5 | Ergebnisse | 51 |
| 5.1 | Radiosynthesergebnisse | 51 |
| 5.1.1 | [^{99m}Tc]-Triaquatricarbonylkation | 51 |
| 5.1.2 | [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})$]-DHis-DLys-NOC | 52 |
| 5.1.3 | Konjugation mit DOTA-TFP-Ester | 52 |
| 5.1.4 | Konjugation mit Trimellitsäureanhydrid | 53 |
| 5.1.5 | Abspaltung der Dde-Schutzgruppe | 54 |
| 5.1.6 | Aufreinigung der Peptide | 55 |
| 5.1.7 | DHis-DLys[^{177}Lu -DOTA]-NOC | 56 |
| 5.2 | Nicht radioaktive Synthesen | 57 |
| 5.2.1 | Rhenium-triaquatricarbonylkation | 57 |
| 5.2.2 | [$\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})$]-DHis-DLys-NOC | 58 |
| 5.3 | Rezeptorbindungsstudien | 59 |
| 5.4 | Serumstabilität | 60 |
| 5.5 | Biodistribution | 62 |
| 5.5.1 | [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})$]-DHis-DLys-NOC | 63 |

| | | |
|-------|--|----|
| 5.5.2 | [^{99m} Tc(CO) ₃ (H ₂ O)]-DHis-DLys-TMS-NOC | 65 |
| 5.5.3 | [^{99m} Tc(CO) ₃ (H ₂ O)]-DHis-DLys-DOTA-NOC | 67 |
| 5.5.4 | DHis-DLys[¹⁷⁷ Lu-DOTA]-NOC | 69 |
| 5.5.5 | [¹⁷⁷ Lu]-DOTA-TATE | 72 |
| 6 | Diskussion | 74 |
| 6.1 | Radiochemische Verfahren | 74 |
| 6.1.1 | [^{99m} Tc]-triaquatricarbonylkation | 74 |
| 6.1.2 | [^{99m} Tc(CO) ₃ (H ₂ O)]-DHis-DLys-NOC | 74 |
| 6.1.3 | Konjugation mit DOTA-TFP-Ester | 75 |
| 6.1.4 | Konjugation mit Trimellitsäureanhydrid (TMSA) | 76 |
| 6.1.5 | Abspaltung der Dde-Schutzgruppe | 77 |
| 6.1.6 | Aufreinigung der Peptide | 77 |
| 6.1.7 | Herstellung des Rheniumtriaquatricarbonylkations | 78 |
| 6.1.8 | Herstellung von [Re(CO) ₃ (H ₂ O)]-DHis-DLys-NOC | 78 |
| 6.1.9 | DHis-DLys[¹⁷⁷ Lu-DOTA]-NOC | 79 |
| 6.2 | Rezeptorbindungsstudien | 80 |
| 6.3 | Serumstabilität/ Proteinbindung | 82 |
| 6.4 | Biodistribution | 83 |
| 6.5 | Vergleich der hergestellten SS-Analoga untereinander und mit literaturbekannten Verbindungen | 86 |
| 6.5.1 | [^{99m} Tc(CO) ₃ (H ₂ O)]-DHis-DLys-NOC | 86 |
| 6.5.2 | [^{99m} Tc(CO) ₃ (H ₂ O)]-DHis-DLys-DOTA-NOC | 88 |
| 6.5.3 | [^{99m} Tc(CO) ₃ (H ₂ O)]-DHis-DLys-TMS-NOC | 89 |
| 6.5.4 | DHis-DLys[¹⁷⁷ Lu-DOTA]-NOC | 90 |
| 6.5.5 | Vergleich von DHis-DLys[¹⁷⁷ Lu-DOTA-NOC] mit [¹⁷⁷ Lu]-DOTA-TATE | 91 |
| 6.6 | Schlussfolgerung | 92 |
| 7 | Zusammenfassung und Ausblick | 93 |
| 7.1 | Zusammenfassung | 93 |
| 7.2 | Ausblick | 94 |
| 8 | Literaturverzeichnis | 96 |

| | | |
|----|------------|-----|
| 9 | Danksagung | 104 |
| 10 | Lebenslauf | 105 |

1 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------|--|
| ATSM | diacetyl-bis-(N ₄ -methylthiosemicarbazone) |
| BOC | Benzothienyl-L-Alanin-Octreotid |
| BOC-ATE | Benzothienyl-L-Alanin-Octreotat |
| BSA | bovines Serumalbumin |
| CT | Computertomographie |
| DC | Dünnschichtchromatographie |
| Dde | N-[1-(4, 4-dimethyl-2, 6-dioxocyclohex-1-ylidene) ethyl] |
| DMF | Dimethylformamid |
| DMSA | Dimercaptobernsteinsäure |
| DOTA | 1, 4, 7, 10-tetraazacyclododecan-1, 4, 7, 10-tetraessigsäure |
| DTPA | Diethylendiamin-pentaessigsäure |
| EC | Electron capture |
| EDTMP | ethylenediamine tetra(methylene phosphonic acid) |
| FDG | Fluordesoxyglukose |
| GH | Growth hormone |
| GIT | Gastrointestinal Trakt |
| HEDP | 1-Hydroxy-Ethylidene-1,1-Diphosphonic Acid |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| HMPAO | Hexamethylpropylenaminoxim |
| HPLC | high pressure liquid chromatography |
| IT | isomeric transition |
| MAG3 | Mercaptoacetyltriglycerin |
| MIBG | Metaiodobenzylguanidin |
| MIBI | Methoxyisobutylisonitril |
| MRT | Magnetresonanztomographie |
| NCS | Isothiocyanat |
| NET | Neuroendokrine Tumore |
| NHS | N-Hydroxysuccinimid |
| NOC | Naphtylalanin-Octreotid |

| | |
|---------|--|
| NOC-ATE | Naphtylalanin-Octreotat |
| OC | Octreotid |
| PADA | picolyamine-N,N-diacetic acid |
| PET | Positronen-Emission-Tomographie |
| p.i. | post injectionem |
| PMP | Pentamethylpiperidin |
| PNS | peripheries Nervensystem |
| SPECT | single photon emission computer tomography |
| SS | Somatostatin |
| SS-14 | Somatostatin-14 |
| SS-28 | Somatostatin-28 |
| sstr | somatostatin-type receptor |
| TATE | Tyrosin-Octreotat |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| TFP | Tetrafluorphenol |
| TMS | Trimellitsäure |
| TMSA | Trimellitsäureanhydrid |
| TOC | Tyrosin-Octreotid |
| ZNS | zentrales Nervensystem |

2 Einleitung

Der große Vorteil der nuklearmedizinischen bildgebenden Verfahren ist, dass trotz geringster Radionuklidkonzentrationen, die kaum oder gar nicht die zu messenden physiologischen Prozesse beeinflussen, gut messbare Signale erzielt werden können. Im Gegensatz zu den konventionellen radiologischen Verfahren wie CT oder Ultraschall, die morphologische Informationen liefern, ermöglichen die nuklearmedizinischen Methoden Aussagen über die Funktion, beziehungsweise molekularbiologische Eigenschaften eines oder mehrerer Organe. Deswegen ist eine funktionelle beziehungsweise molekulare Bildgebung ein nützliches Hilfsmittel zur Abklärung von Diagnose, Krankheitsausbreitung (Staging) und Therapieerfolg. Ein Beispiel ist die Überexpression von unterschiedlichen Peptidhormon-Rezeptoren, die relativ häufig bei malignen Tumoren zu finden ist. Mit einem geeigneten Radionuklid kann man kleinere Tumore und Metastasen lokalisieren, die für die üblichen radiologischen Methoden verborgen bleiben können. In der Rezeptorzintigraphie hat sich bis heute neben dem Mapping von Hirnrezeptoren die Expression von Somatostatinrezeptoren bei neuroendokrinen Tumoren (NET) als besonders nützlich in der Diagnostik und Therapie erwiesen (Reubi und Waser, 2003).

2.1 γ -Szintigraphie/SPECT

Bei der γ -Szintigraphie werden Patienten Radiopharmaka injiziert, an denen ein γ -emittierendes Radionuklid angekoppelt ist. Zur Detektion dieser Strahlen werden herkömmliche γ -Kameras eingesetzt. Essentieller Bestandteil einer solchen Kamera ist ein NaI-Kristall, der mit einem geeigneten Bleikollimator ausgestattet ist. Der Kollimator lässt nur senkrecht auf den Kollimator einfallende γ -Quanten durch, sodass die Streustrahlung fast vollständig eliminiert wird. Die γ -Strahlen, die den NaI-Kristall erreichen, erzeugen dort Lichtblitze (Szintillation), die von Sekundärelektronenvervielfachern in elektrische Signale umgewandelt und verstärkt werden. Die Bilder entstehen schließlich mittels rechnergestützter Verarbeitung dieser Signale. Der Aufbau einer herkömmlichen γ -Kamera ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

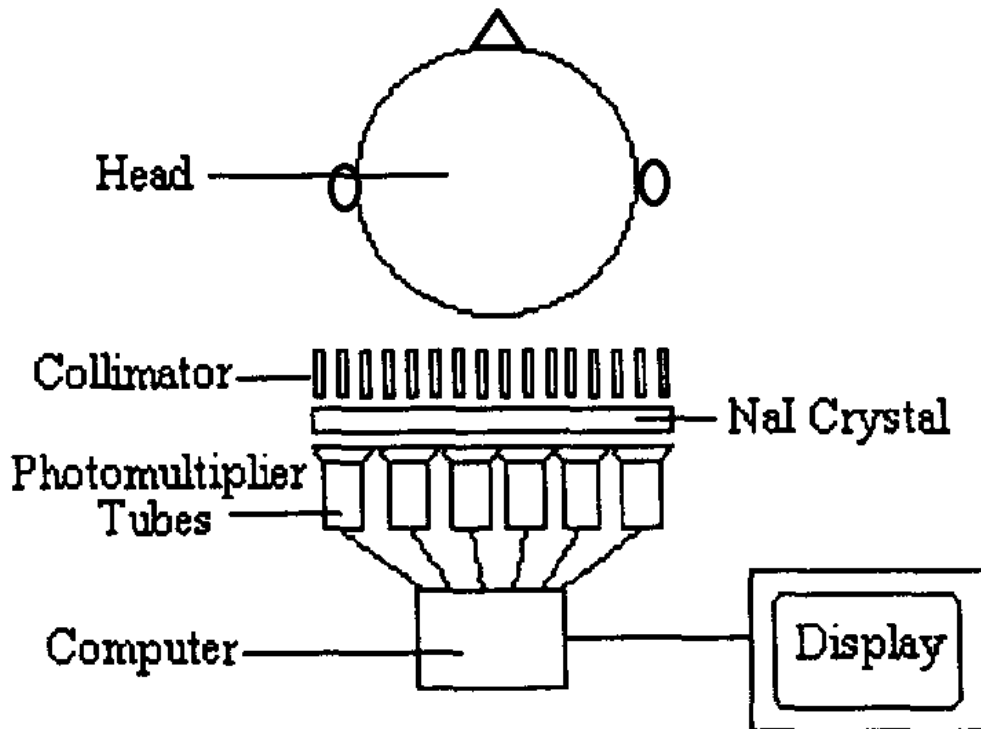


Abb. 1: Schematische Darstellung des Aufbaus einer γ -Kamera

Mit SPECT-fähigen Kameras lassen sich, durch Rotation von meist zwei Detektoren und nachfolgende computerassistierte mathematische Aufarbeitung der Messdaten, dreidimensionale Bilder oder Schichtbilder von Organen oder Körperregionen erzeugen. Dieses Verfahren ermöglicht eine relativ hohe örtliche Auflösung sowie eine bessere anatomische Zuordnung eines pathologischen Befundes und ist meist kostengünstiger als eine vergleichbare PET- oder MRT-Untersuchung.

2.2 Positronen-Emissionstomographie (PET)

Ein weiteres nuklearmedizinisches Verfahren ist die Positronen-Emissionstomographie (PET). Dieses Verfahren hat Ähnlichkeiten mit der SPECT-Untersuchung, zeichnet sich aber durch eine

bessere räumliche Auflösung und eine höhere Sensitivität gegenüber einer vergleichbaren SPECT-Aufnahme aus. Das Prinzip eines PET-Detektorkreises wird in Abbildung 2 gezeigt.

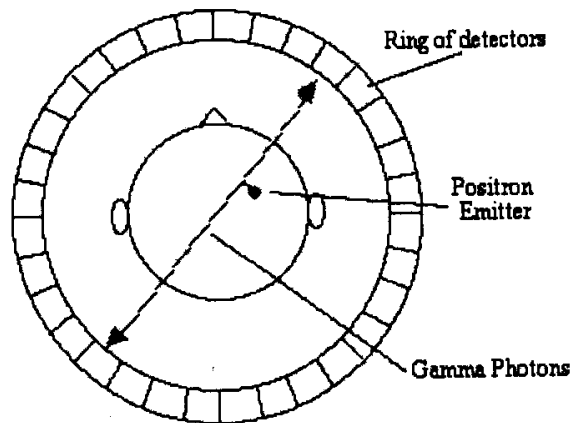


Abb. 2: Schematische Darstellung eines PET-Detektorkreises mit dem Messprinzip der Koinzidenz

Bei diesem Verfahren werden ausschließlich Radionuklide, die Positronen emittieren, verwendet. Die emittierten Positronen kombinieren nach einer kurzen Strecke, die abhängig von der β^+ -Energie ist, mit einem Elektron (Annihilation). Dabei entstehen zwei Photonen mit einer Energie von 511keV, die sich von ihrem Entstehungsort in exakt entgegengesetzter Richtung voneinander entfernen. Diese Photonen werden von einem Detektorring mit Szintillatoren und Photomultipliern erfasst. Die Verknüpfung der Detektoren ist so eingerichtet, dass zwei gegenüberliegende Detektoren nur Signale von koinzidierenden Photonen aufnehmen. Der Ort der Annihilation wird danach mittels Computer berechnet. Bleikollimatoren entfallen aufgrund der „elektronischen Kollimation“ bedingt durch die Koinzidenz.

2.3 Radionuklide und Tracer

Die radioaktiven Isotope in einem Tracermolekül ermöglichen die Darstellung vieler, verschiedener biologischer Prozesse. Das Radionuklid ist in der Regel entweder über eine kovalente oder

eine Komplexbindung an ein biologisch relevantes Molekül angekoppelt. In speziellen Fällen hat das Radionuklid in seiner ungebundenen Form selbst eine diagnostisch oder therapeutisch verwertbare Eigenschaft (z.B. Iodid). Die Isotope können je nach strahlenphysikalischen Eigenschaften in diagnostische und therapeutische Radionuklide eingeteilt werden. Die Radiotracer können wiederum in drei verschiedene Kategorien eingeteilt werden. Bei authentischen Radiopharmaka ändern sich die chemisch-strukturellen Eigenschaften gegenüber einer stabilen unmarkierten Verbindung durch die Markierung nicht, beispielsweise I-131-Iodid oder C-11 markierte Verbindungen wie [^{11}C]-Cholin oder [^{11}C]-Acetat. Bei den autologen Radiopharmaka werden beispielsweise patienteneigene Blutzellen (zum Beispiel mit Tc-99m oder In-111) markiert und wieder reinjiziert. Die letzte Gruppe stellen die analogen Radiotracer dar. Die Struktur eines solchen Radiopharmakons entspricht nicht genau der Originalverbindung, da an dem Molekül Radionuklide angebracht worden sind, die nicht im Vorbildpharmakon vorkommen. Beispiele für diese Gruppe sind unter anderem [^{111}In]-DTPA-Octreotid und 2- ^{18}F -Desoxy-Glukose (FDG), als Tracer des Glukosemetabolismus.

2.3.1 Diagnostische Radionuklide

Die Radionuklide, die in der γ -Szintigraphie zum Einsatz kommen, müssen bestimmte physikalische Eigenschaften aufweisen. Die emittierte γ -Energie muss innerhalb des bevorzugten Messbereiches der γ -Kamera (100–250 keV) liegen und zudem ein möglichst reines Emissionsspektrum zeigen. In Anbetracht der Strahlungsbelastung der Patienten ist es wichtig, dass die Halbwertszeit so kurz wie möglich, aber auch so lange wie für die Untersuchung nötig, ist. Tabelle 1 zeigt eine Auswahl gängiger Radionuklide, die in der γ -Szintigraphie eingesetzt werden.

| Isotop | T½ [h] | Zerfallsart | Emissionsenergie [keV] | Klinisches Beispiel | Funktion |
|------------|-----------|-------------|---------------------------|---|--------------------------|
| Ga-67 | 78,3 | EC (100 %) | 91, 93, 185, 296, 388 | [⁶⁷ Ga]- Citrat | Entzündungsszintigraphie |
| Tc- 99m | 6,0 | IT (100 %) | 141 | [^{99m} Tc]- MIBI | Myokardszintigraphie |
| In-111 | 67,9 | EC (100 %) | 172, 245 | [¹¹¹ In]- DTPA- Octreotid | sstr-Szintigraphie |
| I-123 | 13,1 | EC (100 %) | 159 | [¹²³ I]-MIBG | Tumorszintigraphie |
| Tl-201 | 73,1 | EC (100 %) | 167, 69–80 | [²⁰¹ Tl]-Cl | Myokardszintigraphie |

Tab. 1: Übersicht über die am häufigsten eingesetzten γ -emittierenden Nuklide mit jeweils einem klinischen Untersuchungsbeispiel

β^+ -emittierende Nuklide (Tabelle 2), die in der PET-Untersuchung eingesetzt werden, sind meist Produkte von Zyklotronproduktionen. Trotz der relativ kostenaufwendigen Produktion bieten die PET-Tracer viele Vorteile gegenüber den üblichen γ -emittierenden Radiopharmaka. Da Elemente wie C, N oder O in praktisch allen Biomolekülen zu finden sind, kann man Tracer mit den entsprechenden Isotopen C-11, N-13 oder O-15 markieren, ohne eine chemische Änderung des Vorbildmoleküls vorzunehmen („authentische Tracer“). Der am weitesten verbreitete Tracer und Arbeitspferd der PET ist dennoch ein Analogtracer, nämlich 2-[¹⁸F]-Fluordesoxyglukose (FDG). Dieser Tracer wird, wie auch „normale“ Glukose, in die Zelle mit Hilfe eines Glukosetransporters an der Zellmembran eingeschleust. Im Gegensatz zur Glukose kann 2-[¹⁸F]-Fluordesoxyglukose nach Phospholierung zu [¹⁸F]-Fluordesoxyglukose-6-Phosphat durch die Hexokinase, jedoch nicht weiter verstoffwechselt werden. Es kommt somit zu einem „Trapping“ der Aktivität in der Zelle. Da maligne und entzündliche Prozesse im Körper überwiegend einen erhöhten Glukosemetabolismus zeigen, können solche mittels FDG daher gut dargestellt werden. Ein anderes, auch in der Somatostatinrezeptorbildgebung ([⁶⁸Ga]-DOTA-TOC), einsetzbares Nuklid ist das Gallium-68 (Henze et al., 2001; Wild et al., 2005). Die Vorteile dieses positronen-emittierenden Isotops sind günstige strahlenphysikalischen Eigenschaften, ständige Verfügbarkeit über ein Germanium-

Gallium-Generator, patientenfreundliche Durchführung, sowie bessere Auflösung gegenüber dem herkömmlichen [¹¹¹In]-OctreoScan®. Die Tabelle 2 zeigt eine unvollständige Liste β⁺-emittierender Tracer.

| Isotop | T _{1/2} [h] | Zerfallsart | β ⁺ Energie [keV max/mean] | Tracer (Beispiel) | Funktion |
|--------|-------------------------|------------------------------------|---|--|---|
| F-18 | 1,83 | β ⁺ (96,7 %) | 634/250 | 2-[¹⁸ F]- Fluordesoxyglukose | Glukosemetabolismus |
| Ga-68 | 1,1 | β ⁺ (89,1 %) | 1900/836 | [⁶⁸ Ga]-DOTA-TOC | sstr-Bildgebung |
| N-13 | 0,17 | β ⁺ (99,8 %) | 1199/492 | [¹³ N]-Ammoniak | Perfusionstracer der Koronargefäße |
| C-11 | 0,34 | β ⁺ (100 %) | 960/386 | S-[¹¹ C]-Methyl- methionin | Darstellung cerebraler Tumore |
| O-15 | 0,034 | β ⁺ (99,9 %) | 1732/735 | [¹⁵ O]-Wasser (H ₂ O) | Quantifizierung von Muskeldurchblutung |
| Cu-62 | 0,16 | β ⁺ (98 %), EC (2 %) | 2927/1316 | [⁶² Cu]-ATSM | Tumordarstellung |

Tab. 2: Auswahl gängiger positronen-emittierender Nuklide jeweils mit einem Tracerbeispiel

2.3.2 Therapeutische Radionuklide

Für die interne Radiotherapie werden Nuklide, die α- oder β-Partikel aussenden, eingesetzt. Diese Partikel haben eine lokal begrenzte Strahlungswirkung und werden mittels unterschiedlicher Trägermoleküle zum Tumor transportiert. Das wichtigste Therapienuklid ist bis heute immer noch das Iod-131, das sowohl bei der Therapie von Schilddrüsenkarzinomen als auch bei hyperthyreoten Schilddrüsenerkrankungen eingesetzt wird. Andere in therapeutischer Hinsicht wichtige Nuklide sind Yttrium-90 (β⁻; T_{1/2} 64,1h) und Lutetium-177 (β⁻ 79 %; γ 11 %, 6,4 %; T_{1/2} 160,8 h) die mit Hilfe der Komplexligenanden DOTA oder DTPA an Biomoleküle angekoppelt werden können.

Ein weiteres interessantes Nuklid für therapeutische Zwecke ist das Rhenium-188 (γ 15 %, β^- ; $T_{1/2}$ 17h), das sowohl β^- -Strahlen als auch γ -Strahlen emittiert. Dieses Radionuklid besitzt chemisch ähnliche Eigenschaften wie das Technetium-99m und ist analog kostengünstig über den W-188/Re-188-Generator verfügbar. Im Vergleich zum Technetium-99m zeigt sich das Rhenium in-erter gegenüber Substitution und weist ein niedrigeres Redoxpotential auf. Daher sind Rheniumkomplexe einerseits schwieriger zu erhalten und andererseits auch anfälliger gegenüber Reoxidation und damit Dissoziation des Komplexes. Tabelle 3. zeigt einige β^- -emittierende therapeutisch relevante Radionuklide mit jeweils einem Beispieltracer.

| Isotop | $T_{1/2}$ [h] | Zerfallsart | Emissionsenergie [keV] | Beispiel | Funktion |
|--------|------------------|---|---|-------------------------------------|---|
| Sm-153 | 50,4 | β^- , γ (29 %) | 800(β^- max), 103 (γ) | [¹⁵³ Sm]- EDTMP | Schmerztherapie bei Knochenmetastasen |
| I-131 | 193 | β^- , γ (81 %) | 606(β^- max), 364(γ) | [¹³¹ I]-NaI | Radioiodtherapie |
| Lu-177 | 160,8 | β^- (79 %), γ (11 %, 6,4 %) | 500(β^- max) 113 (γ), 208 (γ) | [¹⁷⁷ Lu]- DOTA-TATE | Radiorezeptorthherapie |
| Y-90 | 64,1 | β^- (100 %) | 2270 (β^- max) | [⁹⁰ Y]- TheraSpheres | Selektive interne Radiotherapie bei Lebermetastasen |
| Re-186 | 90,6 | β^- γ (9 %) | 1071 (β^- max) 137 (γ) | [¹⁸⁶ Re]-Re- Sulfid | Radiosynoviorthese |
| Re-188 | 17 | β^- γ (15 %) | 2116 (β^- max) 155 (γ) | [¹⁸⁸ Re]-HEDP | Schmerztherapie bei Knochenmetastasen |

Tab. 3: β^- -emittierende therapeutisch verwendbare Radionuklide mit je einem Therapiebeispiel

Alpha-Strahler sind aufgrund der sehr geringen Reichweite der Strahlung und des hohen Energietransfers prinzipiell hervorragende therapeutisch nutzbare Nuklide, da durch die oben genannten Eigenschaften eine hohe lokale Strahlendosis im erwünschten Bereich mit weitgehender Schonung des normalen Gewebes ermöglicht wird. Bislang haben sich in der klinischen Routine keine mit Alpha-Strahlern markierten Biomoleküle Anwendung gefunden, da sich die hergestellten

Verbindungen in-vivo als zu instabil für eine Radiotherapie erwiesen haben. Mehrere Arbeitsgruppen forschen jedoch weiter an Alpha-Strahlen-emittierende Nuklide, gerade aus den oben genannten Gründen und haben mit Hilfe von prosthetischen Gruppen wie beispielsweise den Para- oder Metaastatobenzoessäuresuccinimidylestern einen „vielversprechenden“ Ansatz für beispielsweise eine stabile At-211-Markierung gefunden. In der Tabelle 4 sind einige Alpha-Strahlen-emittierende Nuklide mit jeweils einem Beispiel eines Tracers aufgelistet.

| Isotop | T_{1/2} [h] | Zerfallsart | Emissionsenergie E_{max} [MeV] | Beispiel | Funktion |
|---------------|--------------------------------|-----------------------|---|----------------------------------|---------------------------------------|
| Bi-212 | 1,0 | α (100 %) γ (12 %) | 7,8 | Antikörper | Tumorthherapie |
| Ac-225 | 10 | α (100 %) | 5,8 | Antikörper | Tumorthherapie |
| At-211 | 7,2 | α (100 %) | 5,9 | At-211-markierte Mikrosphären | Therapie maligner Asziteszellen |

Tab. 4: α-Strahlen-emittierende therapeutisch einsetzbare Radionuklide mit je einem Therapieansatz

2.3.3 Technetium

Das am meisten genutzte Radiometall in der γ-Szintigraphie ist das Übergangsmetall Technetium-99m (^{99m}Tc). Die Vorzüge des Technetiums sind eine günstige Halbwertszeit von 6 Stunden, eine stetige und kostengünstige Verfügbarkeit über den ⁹⁹Molybdän-Technetium-Generator, sowie die reine Gammastrahlung von 141 keV. Ein solcher Generator (Abbildung 3) besteht aus einer Al₂O₃-Matrix, die das Mutternuklid Mo-99 fest bindet, nicht aber das entstandene Tc-99m in Form des Pertechnetats, welches leicht mittels physiologischer NaCl-Lösung eluiert werden kann. Eine Elution mit etwa 90 % der theoretischen Aktivität kann nach 24 Stunden erfolgen, was maßgeblich zur Verfügbarkeit und damit auch zur Ausbreitung dieses Generatorsystems beigetragen hat. Abbildung 3 stellt ein solches Generatorsystem dar.

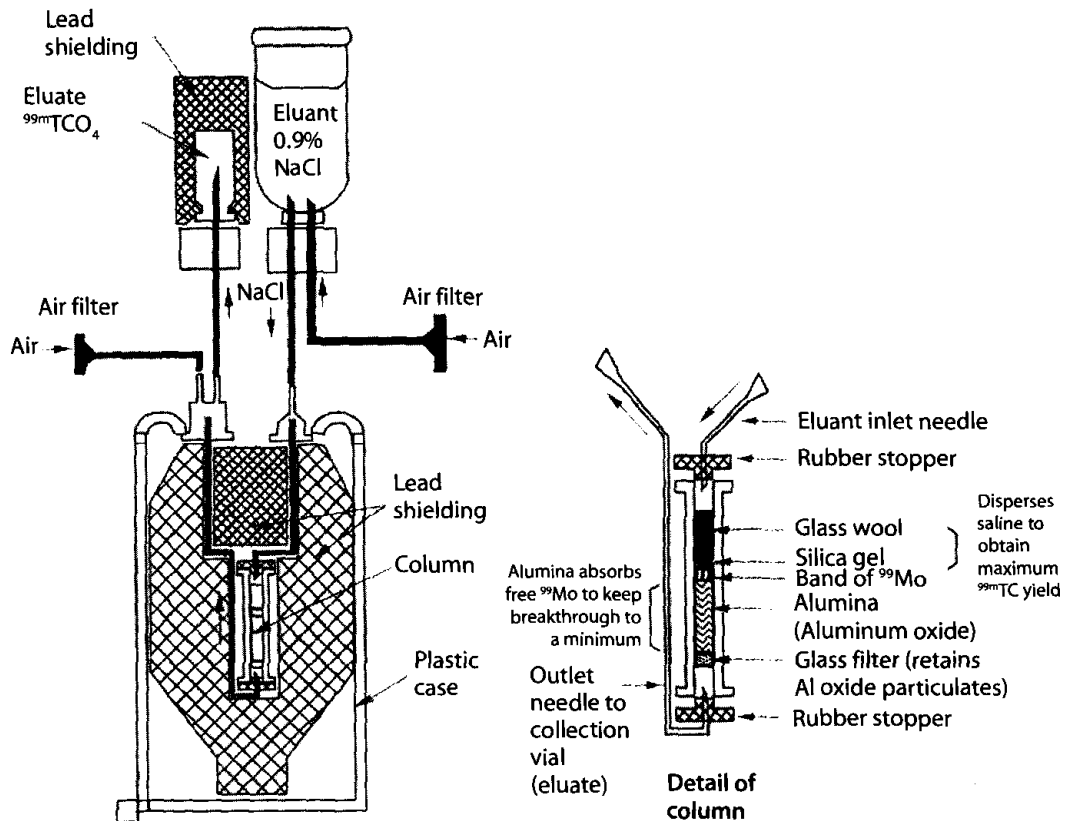


Abb. 3: Aufbau des Mo-99/Tc-99m-Generators. Das freie Pertechnetat löst sich von der Aluminiummatrix und lässt sich mit NaCl-Lösung eluieren.

Für die Radiochemie bietet das Technetium zugleich eine Vielfalt an Markierungsmöglichkeiten an. Ausgangssubstanz für Markierungen ist das Pertechnetatanion (TcO_4^-), das dann wiederum je nach Komplexeigenschaften zu niedrigeren Oxidationsstufen reduziert werden kann (+7--1). Für die Markierung mit Technetium sind Heteroatome in 5- oder 6-Ringstrukturen besonders gut geeignet. Beispiele für solche Atome sind unter anderem Stickstoff-, Schwefel-, Phosphor- und Sauerstoffatome. Im Laufe der Zeit sind sehr viele Verbindungen nach diesem Prinzip hergestellt worden. Das Tc(V) ist dabei an 4 Heteroatomen in unterschiedlichen Kombinationen (N_2S_2 , N_3S , N_3O , N_4 , etc.) gebunden. Beispiele aus der nuklearmedizinischen Praxis für solche Liganden sind unter anderem das DMSA, HMPAO, Tetrofosmin und MAG_3 . Eines der interessantesten Fortschritte der letzten Jahre in der Tc-Chemie ist die Einführung der Tc-Carbonylchemie (Alberto et

2.5 Somatostatinrezeptoren

Die Funktionen des Somatostatins werden über die Somatostatin-seven-transmembrane-domain-Rezeptoren (sstr) entfaltet (Patel, 1999), die alle zu der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören. Bis heute sind 5 verschiedene Rezeptorsubtypen (sstr1, 2, 3, 4 und 5) bekannt, die alle hochaffin das native Somatostatin binden (Hoyer et al., 1995; Yamada et al., 1992). Die Bindung des Peptids an den Rezeptor führt zu einer Internalisation des Hormon-Rezeptor-Komplexes mit folgender Signalweiterleitung über Aktivitätsänderung von Adenylatcyclase, Phosphotyrosinphosphatase, MAPK (mitogen-activated protein-kinase) und Calciumkanälen (Patel, 1997; Reisine und Bell, 1995; Seger und Krebs, 1995). Wenn der Komplex internalisiert ist, fusionieren die Vesikel mit Lysosomen; das Hormon wird abgebaut und der Rezeptor wieder an die Zelloberfläche transportiert (Duncan et al., 1997). In Abbildung 5 wird dieser Vorgang schematisch dargestellt.

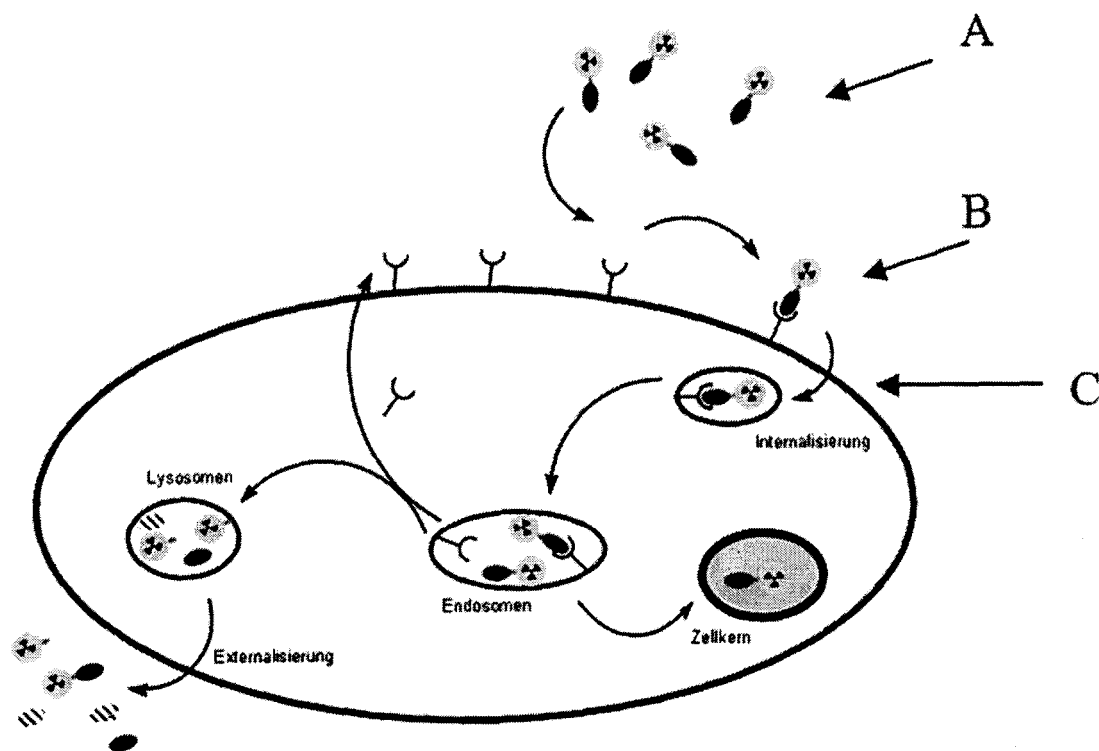


Abb. 5: Darstellung des Tracers (A), der Rezeptorbindung (B) und Internalisierung (C) des Rezeptor-Tracerkomplexes, der lokalen Bestrahlung des Zellkerns und der Rezyklisierung des Rezeptors und des Abbaus des Tracers.

Die höchste Inzidenz und Dichte an sstrs zeigen Tumore neuroendokrinen Ursprungs, besonders Phäochromozytome, Karzinoide, medulläre Schilddrüsenkarzinome, Paragangliome, pankreatische Inselzelltumore, kleinzellige Bronchialkarzinome und Hypophysenadenome (Reubi et al., 1992; Reubi et al., 1994; Reubi, 1995). Bei diesen Tumortypen ist der Rezeptortyp sstr2 als Rezeptorsubtyp am häufigsten und dichtesten repräsentiert. Aus diesem Grund bildet er die Basis für die Diagnostik und Therapie. Andere Tumore wie Prostatakarzinome, Colonkarzinome, Lymphome und Ovariakarzinome besitzen ebenfalls sstr's an der Zelloberfläche, allerdings meist mit geringerer Dichte und zum Teil mit anderen Rezeptor-Subtypen. Tabelle 5 zeigt eine unvollständige Liste von Somatostatinrezeptorexprimierenden Tumortypen und der jeweiligen Häufigkeit der Rezeptorexpression in vitro und in vivo.

| Tumortyp | in vivo-Szintigraphie | | in vitro-Rezeptor Status | |
|-------------------------------------|-----------------------|-------|--------------------------|-------|
| Gastrinom | 12/12 | 100 % | 6/6 | 100 % |
| Glucagonom | 03/03 | 100 % | 2/2 | 100 % |
| Paragangliom | 33/33 | 100 % | 11/12 | 92 % |
| Kleinzelliges BC | 34/34 | 100 % | 4/7 | 57 % |
| Karzinoid | 69/72 | 96 % | 54/62 | 88 % |
| Neuroblastom | 08/09 | 89 % | 15/23 | 65 % |
| Phäochromozytom | 12/14 | 86 % | 38/52 | 73 % |
| Medulläres Schilddrüsen-Ca | 20/28 | 71 % | 10/26 | 38 % |
| Nicht funktioneller Hypophysentumor | 12/16 | 75 % | 12/22 | 55 % |

Tab. 5: Vergleich der in vitro- und in vivo-Rezeptorexpression bei einigen ausgewählten Tumoren (Reubi, 1995)

Hier wird verdeutlicht dass sich bei den neuroendokrinen Tumoren, insbesondere szintigraphisch, Somatostatinrezeptoren sehr häufig nachweisen lassen und somit eine wichtige Rolle sowohl bei der Diagnostik und Therapie dieser Tumore spielt.

2.6 Somatostatinanaloga

Das native Somatostatin hätte auf Grund der antiproliferativen Wirkung und der Inhibition der paraneoplastischen Sekretion eine große Zukunft in der Onkologie einnehmen können. Es kam jedoch im klinischen Alltag nicht zur Anwendung, hauptsächlich wegen der viel zu kurzen Halbwertszeit *in vivo* von maximal 2–3 Minuten. Die pharmakologische Wirkung ist damit zu gering. Deswegen stellte man synthetische Verbindungen her, die eine ähnliche hohe Rezeptoraffinität, aber eine deutlich längere Halbwertszeit im Körper aufweisen. Um den enzymatischen Abbau des Peptids zu verlangsamen, wurden L-Aminosäuren an bekannten Abbaustellen durch D-Aminosäuren ersetzt. Dies bietet beim Octreotid (D-Phe) einen guten Schutz gegen den Angriff der Exopeptidase am N-Terminus. Weiterhin führt das D-Trp⁴ sogar zu einer erhöhten biologischen Aktivität. In Abbildung 6 wird das native Somatostatin-14 mit für Peptidasen bekannten Angriffstellen, die für die kurze Halbwertszeit *in vivo* maßgeblich verantwortlich sind.

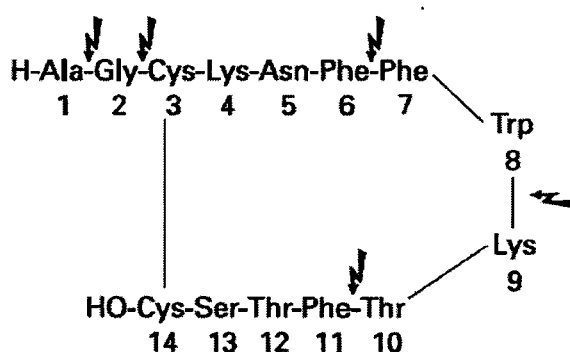


Abb. 6: Somatostatin-14 mit bekannten enzymatischen Angriffstellen

Von Bauer *et al* wurde das Cyclooctapeptid Octreotid (Sandostatin[®]) hergestellt (Bauer *et al.*, 1982; Pless *et al.*, 1986). Diese Verbindung hat mit einer Halbwertszeit von zwei Stunden und einer hohen Selektivität bezüglich der GH-Inhibition passende Eigenschaften. Dieses Analogon gilt heute noch als das Standard-Präparat und wird unter anderem eingesetzt bei Akromegalie und zur Hemmung von paraneoplastischer Sekretion. Das Octreotid ist zudem die Leitstruktur für zahlreiche neuere Somatostatinanaloga, die im Laufe der Jahre synthetisiert wurden. Freidinger *et al*

beschrieb die Aminosäureteilsequenz des Somatostatin $\text{Phe}^7\text{-Trp}^8\text{-Lys}^9\text{-Thr}^{10}$ als Pharmakophor (Fredinger et al., 1984). Die Entdeckung der pharmakophoren Sequenz zusammen mit der Klonung der unterschiedlichen Rezeptorsubtypen zeigte jedoch auch die Grenzen des Peptids auf, da das Octreotid nicht wie das native Somatostatin an alle Rezeptorsubtypen bindet. In Abbildung 7 sind drei gängige Somatostatinanaloga, inklusive das Standardpräparat Sandostatin® (Octreotid), mit deren jeweiligen strukturellen Besonderheiten dargestellt.

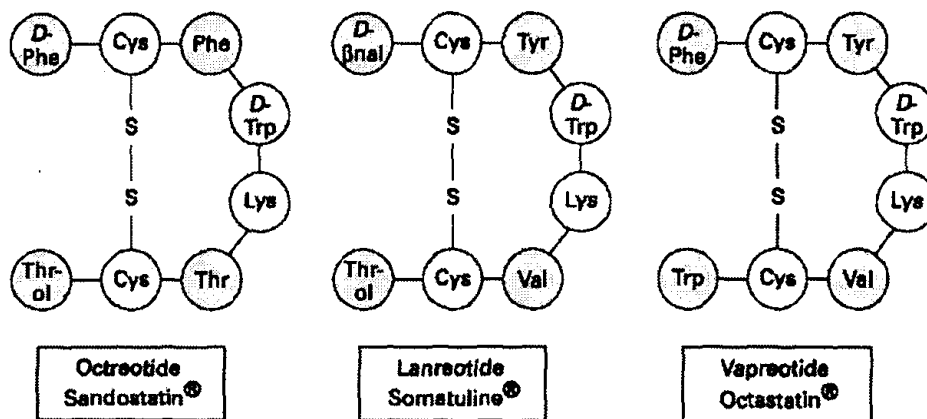


Abb. 7: Auswahl und Aminosäuresequenz dreier gängiger und klinisch bewährter Somatostatinanaloga (Octreotid, Lanreotid und Vapreotid)

Bei diesen drei Somatostatinanaloga werden die bekannten enzymatischen Abbaustellen (Abb. 6) entweder durch D-Aminosäuren oder eine Änderung der Aminosäuresequenz geändert und werden somit nicht mehr oder nur verlangsamt abgebaut durch Endo- oder Exopeptidasen. Folgend besitzen diese Präparate eine ausreichend lange Halbwertszeit in vivo und können, insbesondere das Octreotid, in der klinischen Routine eingesetzt werden.

Das Octreotid besitzt hohe Affinität zu sstr_2 , moderate Affinität zu sstr_3 und sstr_5 und keine Affinität zu sstr_1 und sstr_4 . Darum wurde der Pharmakophor mehrfach modifiziert, um ein breiteres Bindungsspektrum und günstigere pharmakologische Eigenschaften zu erzielen. Das Phenylalanin in Position 3 des Octreotid wurde durch Tyrosin (TOC-SS-Analoga) (Albert et al., 1998; Ginj et al., 2005), Benzothienyl-L-Alanin (BOC-SS-Analoga) (Cescato et al., 2006; Ginj et al., 2005) oder Naphtylalanin (NOC-SS-Analoga) (Cescato et al., 2006; Ginj et al., 2005; Wild et al.,

2003) ausgetauscht. Der Austausch des Phenylalanin³ durch die hydrophilere Aminosäure Tyrosin bewirkte eine erhöhte Affinität zu sstr2. Allerdings führte diese Substitution zu einem signifikanten Verlust an Affinität zu sstr3 und 5. Wenn das Phenylalanin durch Naphtylalanin oder Benzothienyl-L-Alanin ersetzt wird, sinkt die Affinität zum sstr2, dafür steigt sie zu sstr3 und 5. In Tabelle 6 werden einige NOC-, TOC-, BOC- und OC-SS-Analoga mit deren jeweiligen Rezeptoraffinität zu den unterschiedlichen sstr-Subtypen aufgelistet.

| Peptid | sstr1 IC ₅₀ [nM] | sstr2 IC ₅₀ [nM] | sstr3 IC ₅₀ [nM] | sstr4 IC ₅₀ [nM] | sstr5 IC ₅₀ [nM] |
|-------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Somatostatin-14 | 1,1 | 1,3 | 1,6 | 0,53 | 0,9 |
| Somatostatin-28 | 5,2 | 2,7 | 7,7 | 5,6 | 4,0 |
| [¹¹¹ In]-DTPA-Octreotid | >10000 | 22 | 182 | >1000 | 237 |
| [⁹⁰ Y]-DOTA-OC | >10000 | 20 | 27 | >10000 | 57 |
| [⁹⁰ Y]-DOTA-TOC | >10000 | 11 | 389 | >10000 | 114 |
| [⁹⁰ Y]-DOTA-TATE | >10000 | 1,6 | >1000 | 523 | 187 |
| [¹¹¹ In]-DOTA-NOC | >10000 | 2,9 | 8,0 | 227 | 11,2 |
| [⁹⁰ Y]-DOTA-Lanreotid | >10000 | 23 | 290 | >10000 | 16 |
| [⁹⁰ Y]-DOTA-Vapreotid | >10000 | 12 | 102 | 778 | 20 |
| [¹¹¹ In]-DOTA-BOC-ATE | >1000 | 1,4 | 5,5 | 135 | 3,9 |

Tab. 6: Rezeptoraffinität zu sstr1-5 von Somatostatin-14, -28 und einigen ausgewählten Somatostatinanaloga (Reubi et al., 2000)

Diese Erweiterung des Bindungsspektrums könnte bei nuklearmedizinischen Anwendungen den Vorteil bringen, eine größere Zahl von Tumorarten szintigraphisch darzustellen und gegebenen-

falls auch therapiert werden können. Da das Peptid nun über mehrere Rezeptorsubtypen bindet und nicht nur über den sstr2, könnte mehr Radioaktivität pro Zelle internalisiert und dadurch eine höhere Herddosis erzielt werden.

Der C-Terminus des Octreotid kann durch Reduktion der Carbonsäurefunktion zum Alkohol (Threoninol) modifiziert werden, auch dies um den Abbau durch Exopeptidasen weiter zu verlangsamen. Es hat sich jedoch gezeigt, dass auch die freie Säure (Threonin⁸) als C-Terminus ausreichend Stabilität besitzt und über eine erhöhte Hydrophilie des Peptids zu einer besseren Elimination über die Nieren und insbesondere zu einem besseren Tumoruptake führt (Esser et al., 2006). SS-Analoga, die diese Säurefunktion am C-Terminus besitzen, bekommen wegen der c-terminalen Carboxylgruppe die Endung -ATE (NOC-ATE-, TATE- und ATE-SS-Analoga). In Abbildung 8. werden einige mögliche Änderungen in Position 3, sowie am C-Terminus dargestellt.

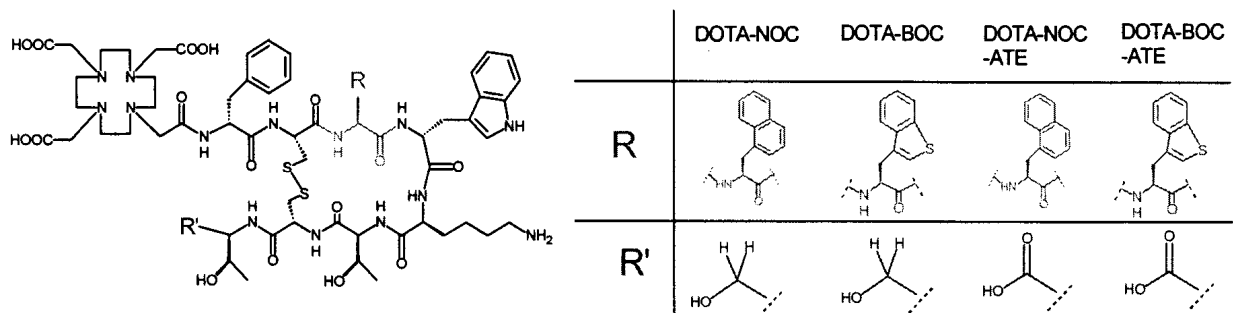


Abb. 8: Darstellung potentieller Manipulationen in Position 3 von einem DOTA-derivatisierten Somatostatinanalogon am Pharmakophor und am C-Terminus

2.7 Radioaktiv markierte Somatostatinanaloga

Der klinische Einsatz von Somatostatinanaloga umfasst nicht nur die Inhibition von GH-Sekretion, die Therapie von Akromegalie (Danoff und Kleinberg, 2003; Reubi und Landolt, 1984) oder die Sekretion von NET, sondern auch die nuklearmedizinische Tumorklassifizierung und die Radiotherapie. Die erste Verbindung, die zur sstr-Szintigraphie eingesetzt wurde, war das

[¹²³I]-Tyr³-Octreotid (Krenning et al., 1989; Krenning et al., 1993). Diese Verbindung zeigt eine ausreichend hohe Bindungsaffinität und auch signifikanten Tumoruptake. Dieser Radiotracer hat aber den Nachteil, dass er zu lipophil ist und folglich über den hepatobiliären Weg eliminiert wird. Dies hat eine niedrige Untersuchungssensitivität bei Prozessen im abdominalen Bereich zur Folge und da sich neuroendokrine Tumor häufig im Gastrointestinaltrakt entstehen, ist dieser Nachteil im klinischen Alltag unvorteilhaft. Die Biodistribution konnte durch die Einführung des Chelators DTPA (Diethylendiamin-pentaessigsäure) zu Gunsten einer renalen Elimination verschoben werden. Dadurch wurden nicht nur die pharmakokinetischen Eigenschaften des Peptids in gewünschter Weise geändert, sondern auch die Markierung mit dem Radiometall Indium-111 ermöglicht. Diese Verbindung (Octreoscan[®], [¹¹¹In]-DTPA-Octreotid) wurde dann der erste kommerziell erhältliche Tracer in der Radiopeptidkategorie und gilt bis heute als das Standardpeptid in der Somatostatinrezeptorzintigraphie (Bakker et al., 1990; Bakker et al., 1991). Der nächste große Fortschritt kam mit dem makrozyklischen Chelator DOTA (1, 4, 7, 10-tetraazacyclododecan-1, 4, 7, 10-tetraessigsäure) (de Jong et al., 1997).

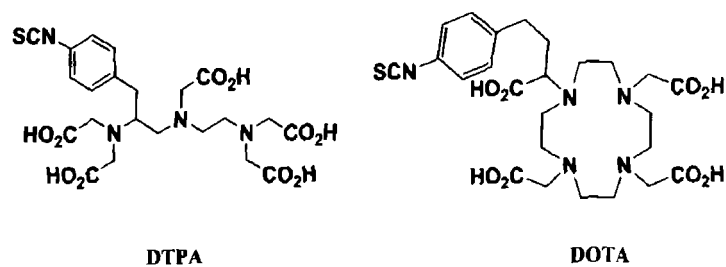


Abb. 9: Strukturformel von den zwei wichtigsten Chelatoren DTPA und DOTA-SCN-Ester in der Entwicklung der radioaktiv markierten Somatostatinanaloga

Dieser Chelator formt kinetisch und thermodynamisch äußerst stabile Komplexe und ermöglicht daher die Konjugation fast aller drei-wertigen Radiometalle wie zum Beispiel Yttrium-86/90, Lutetium-177, Indium-111 und Gallium-66/67/68.

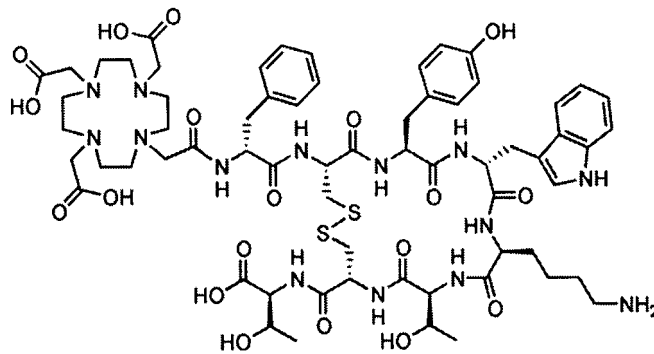


Abb. 10: Strukturformel von DOTA-TATE, einem bereits im klinischen Alltag in Form von [^{177}Lu]-DOTA-TATE verwendeten Somatostatinanalogon

Ein weiterer wichtiger Vorteil der DOTA-konjugierten Peptide ist die erhöhte Hydrophilie. Interessant zu bemerken ist, dass die Rezeptoraffinität eines DOTA-Derivates mit dem gebundenen Metallion in der DOTA-Gruppe variiert und somit sogar einer erhöhten Affinität verglichen mit dem nicht-komplexierten DOTA-Peptid zu Folge haben. Warum diese Modifikation an einem von dem Pharmakophor relativ weit entfernten Ort eine solche Auswirkung haben kann, ist bis heute nicht geklärt. Heute sind drei DOTA-konjugierte Somatostatinderivate im regelmäßigen klinischen Einsatz zu finden. Das [^{68}Ga]-DOTA-TOC/NOC wird in der sstr-Darstellung neuroendokriner Tumoren in der PET eingesetzt (Henze et al., 2001; Wild et al., 2005), während die Derivate [^{177}Lu]-DOTA-TATE und [^{90}Y]-DOTA-TOC für die Radiorezeptortherapie neuroendokriner Karzinome verwendet werden (Bodei et al., 2004; de Jong et al., 2001; Kwekkeboom et al., 2001; Otte et al., 1998; Paganelli et al., 2001; Stolz et al., 1998; Waldherr et al., 2002).

2.8 Technetium-markierte Somatostatin-Analoga

Das am meisten benutzte Radiometall in der Nuklearmedizin ist das Technetium-99m. Es hat fast optimale strahlenphysikalische Eigenschaften für die Szintigraphie und ist stetig und kostengünstig verfügbar über das $\text{Mo}^{99}/\text{Tc}^{99\text{m}}$ -Generatorsystem. Eine chemisch-relevante Eigenschaft des Technetiums ist die Thiophilie, weshalb einige Arbeitsgruppen zunächst untersucht haben, Somatostatin-Analoga über eine Insertion des Technetiums in die Disulfidbrücke zu markieren

(Kolan et al., 1996; Zamora et al., 1996). Der erhoffte Erfolg blieb jedoch aus, da die hergestellten Verbindungen zu lipophil waren und somit über den hepatobiliären Weg eliminiert wurden. Ein Tc99m-Somatostatinderivat, das verglichen mit dem Octreoscan gute präklinische und klinische Daten aufweist, ist das [^{99m}Tc]-HYNIC-Tyr³-Octreotid (HYNIC-TOC) (Bangard et al., 2000; Béhé, 1999; Decristoforo et al., 1999; Decristoforo et al., 2000). Einen anderen Markierungsansatz von Somatostatinanaloga stellt die Tetraaminchemie dar. Basierend auf dieses Markierungsprinzip wurde das [^{99m}Tc]-Demotate hergestellt, was in präklinischen Studien auch eine vielversprechende Alternative in der Gruppe der technetiummarkierten Somatostatinanaloga darstellt (Maina et al., 2002). In Abbildung 11 sind diese beiden Tc-markierten Octreotidderivate dargestellt.

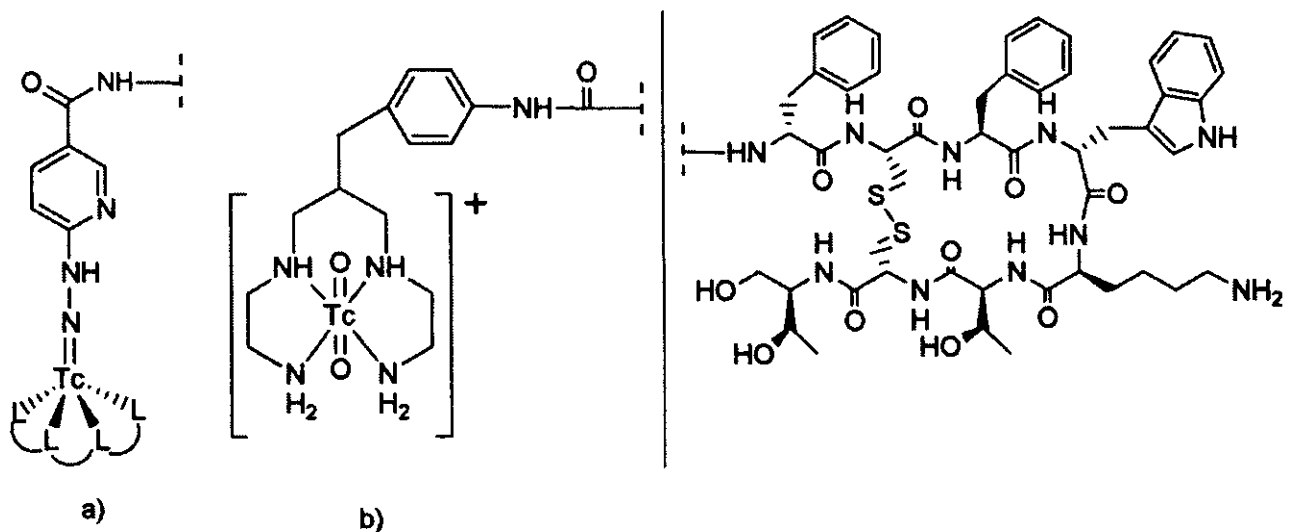


Abb. 11: a) [^{99m}Tc]-HYNIC-TOC und b) [^{99m}Tc]-Demotate sind zwei Tc-99m-markierte Octreotidderivate, die routinemäßig in der Somatostatinrezeptorzintigraphie Verwendung finden.

Beide Verbindungen zeigen eine schnelle renale Elimination, hohe Affinität zum Somatostatinrezeptor vom Subtyp 2 und das [^{99m}Tc]-HYNIC-TOC weist mit einem Tumouruptake zwischen 5,8 %ID/g und 9,6 %ID/g, sogar bessere Daten als das gängige [¹¹¹In]-DTPA-Octreotid (4,3 %ID/g Uptake) auf (Decristoforo et al., 2000). Diese Eigenschaften und die für den klinischen Alltag praktische Fertigstellung mittels Synthesekits macht das HYNIC-TOC zu einer viel-

versprechenden Alternative zu Octreoscan[®] und gilt als der Goldstandard unter den Technetium-markierten Somatostatinanaloga. Seit kurzem ist das HYNIC-TOC im Handel als Tektrotyd[®] erhältlich.

2.9 Technetium-Carbonyl-Komplexe

Mit der Einführung der Tc-Carbonyl- und Re-Carbonylchemie in die nuklearmedizinische Tracerchemie (Alberto et al., 1998; Alberto et al. 1999; Alberto et al., 1999; Alberto et al., 2001), öffneten sich neue Möglichkeiten zur Biomolekülmarkierung mit diesen Metallen. Dieses Organometallion entsteht durch Reduktion und Carbonylation von Pertechnetat mittels Na₂[H₃BCO₂] als Kohlenmonoxiddonor. In Abbildung 12 ist die chemische Strukturformel des Triaquatricarbonyl-Kations gezeigt.

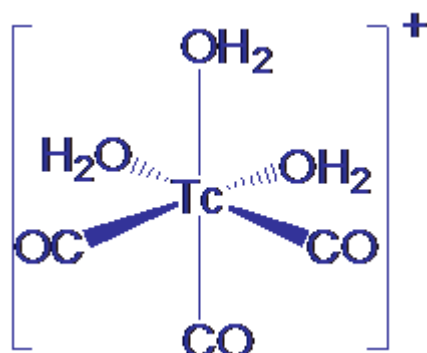


Abb. 12: Strukturformel des ungebundenen [^{99m}Tc]-Triaquatricarbonylkations mit drei freien Wasserliganden

Ein Fortschritt in der Herstellung des Tc-Carbonyls war das Isolink-Kit, das Natriumborano-carbonat enthält (Alberto et al., 2001). Das Natriumborano-carbonat reduziert und ist gleichzeitig CO-Donor. Dies hat den Vorteil, dass bei der Carbonylherstellung nicht mit dem toxischen CO-Gas gearbeitet werden muss. Das Tc-Carbonyl hat eine sphärische Form, die einen guten Schutz gegen Reoxidation und Ligandenangriff bietet. Zugleich hat das Metallzentrum eine niedrige Oxidationsstufe (+I) und macht dieses Molekül extrem inert und stabil, wie Alberto *et al* gezeigt hat. Das Organometallion Tc-Carbonyl bindet durch Substitution seiner freien Wasserliganden

bevorzugt durch Stickstoffatome an N-Heterozyklen, wie zum Beispiel Imidazole und Pyridine. Phosphoratome sind ebenfalls geeignete Liganden wie zum Beispiel in Phosphinen. Je mehr von den drei Wasserliganden des Tc-Carbonylkations binden, desto stabiler ist die Verbindung (Schibli et al., 2000). Als eine geeignete Aminosäure zur Bindung an das Tc-Carbonyl hat sich Histidin erwiesen (Waibel et al., 1999), vorrangig wenn es an dem N-Terminus des Peptids liegt, da das n-terminale Histidin zwei N-Atome zur Verfügung hat. Abbildung 13 zeigt eine tridentate Bindung zwischen Histidin und Technetiumcarbonyl.

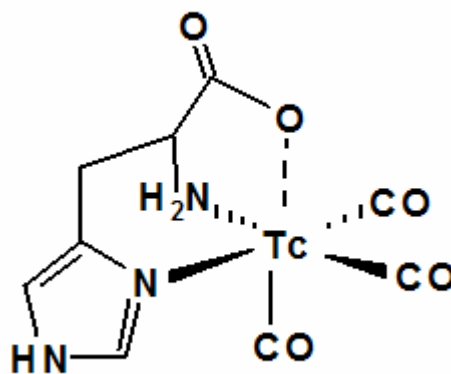


Abb. 13: Tridentate Bindung (gebunden über alle drei Wasserliganden) des Tc-Carbonyls an Histidin

Es möglicher Ansatz ist, Peptide und Antikörper mit Histidin an einem von dem Pharmakophor entfernten Ort zu derivatisieren und anschließend mit Tc-Carbonyl zu markieren. Zudem bieten diese Carbonyl-Verbindungen den HYNIC-Peptiden gegenüber die Möglichkeit der Re-Markierung für therapeutische Zwecke. Da das Rhenium im Re-HYNIC-Komplex die Oxidationsstufe +V hat und somit leicht reoxidiert und freigesetzt wird, ist Rhenium für HYNIC-TOC-Verbindungen keine vielversprechende Markierungsalternative.

2.10 D-His-D-Lys-NOC-SS-Analogen

Das in dieser Arbeit eingesetzte Somatostatinanalogon ist eine Auftragsanfertigung der Firma Bachem in Großbritannien. Es besteht aus der Aminosäuresequenz; H-DHis-DLys-DPhe-Cys-1-Nal-DTrp-Lys(Dde)-Thr-Cys-L-Threoninol und hat ein Molekulargewicht von 1498,84 g/mol. In Abbildung 14 ist die Struktur des untersuchten Peptids mit Dde-Schutzgruppe schematisch dargestellt.

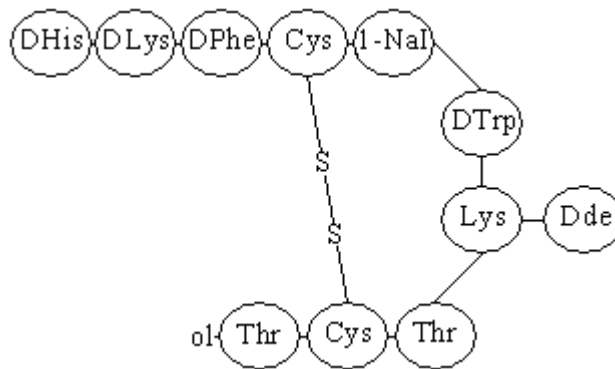


Abb. 14: Das in dieser Arbeit untersuchte Somatostatinanalogon DHis-DLys-NOC mit der Dde-Schutzgruppe am Lysin⁷

Die zyklische Form dieses Dekapeptids entsteht durch eine Disulfidbrücke zwischen dem Cys⁴ und dem Cys⁹. Die strukturellen Besonderheiten der Verbindung gegenüber dem Octreotid ist eine Verlängerung des N-Terminus mittels D-His-D-Lys und das Naphtylalanin in Position 5. Das D-Histidin ermöglicht einer bidentaten Tc-Carbonyl-Markierung während das D-Lysin eine weitere Aminogruppe zur Derivatisierung bietet, die eine Optimierung der Biodistribution ermöglichen soll. Das zweite Lysin in Position 7 im Pharmakophor ist vorerst mit einer Dde-Gruppe geschützt. Es wurden D-Aminosäuren für die Seitenkette gewählt, um einen schnellen enzymatischen Abbau der Seitenkette durch die Exopeptidase zu verhindern. Die Variante mit Naphtylalanin in Position 5 wurde gewählt, um ein breites Bindungsspektrum des Peptids zu erzielen. Folglich gehört das Peptid zur Klasse der NOC-Derivate.

Das Peptid wurde als 25mg lyophilisiertes Pulver (Trifluoracetatsalz) geliefert und bei -20°C aufbewahrt.

3 Aufgabenstellung

Bis heute haben sich technetiummarkierte Somatostatinanaloga, die auf die Tc-Carbonylmarkierung basieren, nicht gegenüber dem bewährten Octreoscan[®] durchsetzen können. In dieser Arbeit geht es darum, Somatostatinanaloga auf NOC-Octreotid-Basis mit Technetium mittels Carbonylchemie zu markieren und zu optimieren. Für diesen Zweck wurde das NOC-Peptid mit einer zusätzlichen Seitenkette verlängert, die aus D-Histidin und D-Lysin besteht. Das Histidin ist am N-Terminus positioniert und der Ort der Tc-Carbonyl-Markierung. Das zusätzliche Lysin ermöglicht eine Vielfalt an Derivatisierungsalternativen. Um gleichzeitig eine Konjugation des Lysins im Pharmakophor zu verhindern, ist dieses zunächst mit einer Dde-Gruppe geschützt. Die Konjugation des Peptids am Lysin² ist eine Möglichkeit, die Biodistribution der unkonjugierten Verbindung zu optimieren. Dies ist zur Minimierung der Strahlenbelastung potentieller Patienten von großer Bedeutung, da der nicht an dem Zielgewebe gebundene Radiotracer schnell renal eliminiert werden sollte. Weiterhin würde ein zu lipophiles Peptid über den hepatobiliären Weg eliminiert werden und so zu einer niedrigen Untersuchungssensitivität besonders bei abdominalen Prozessen führen.

Aus diesen Gründen sollte das relativ lipophile Peptid sowohl mit DOTA als auch mit Trimellitsäureanhydrid (TMSA) konjugiert werden. Trimellitsäure liefert nach der Konjugation am Lys² zwei weitere freie Carboxylgruppen, die für eine erhöhte Hydrophilie sorgen sollen. Das DOTA-Derivat böte zudem weitere Markierungsmöglichkeiten, beispielsweise mit Lutetium-177 für therapeutische Zwecke oder Gallium-68 für PET-Imaging. Da das Peptid ein Naphtylalanin in Position 5 aufweist, zeigt es theoretisch hohe Affinität zu sstr2, sstr3 und sstr5. Diese Eigenschaft könnte das diagnostische und therapeutische Spektrum erweitern und die Tracerinternalisierung in Tumoren erhöhen. Außer der Bestimmung der sstr-Affinität der verschiedenen Analoga (das unmodifizierte Peptid, carbonylmodifizierte Peptid, carbonyl- und DOTA-modifizierte Peptid sowie das carbonyl- und TMS-modifizierte Peptid) sollten weitere pharmakokinetische Eigenschaften wie Serumstabilität sowie die Biodistribution nach 1,4 und 24 Stunden der radioaktiv markierten Peptidderivate untersucht werden.

4 Material und Methoden

4.1 Material

Alle eingesetzten Chemikalien und Materialien sind kommerziell erhältlich und sind in Tabelle 7 inklusive Hersteller und Herstellungsland aufgelistet.

| Chemikalie | Hersteller | Herstellungsland |
|---|--------------------------------|------------------|
| DHis-DLys-NOC | Bachem | United Kingdom |
| [¹²⁵ I]-Tyr ³ -Somatostatin-14 | MDS Pharma Services | USA |
| Somatostatin-14 | Bachem | United Kingdom |
| [¹⁷⁷ Lu]-DOTA-TATE | IDB | Holland |
| Isolink-Kit | Tyco | Deutschland |
| sstr2-Rezeptor-Membran-Lösung | PerkinElmer Life Science | USA |
| DOTA-TFP-Ester (Tetrafluorphenol) | Macrocyclics | USA |
| Trimellitsäureanhydrid | Fluka | USA |
| C-18SepPak-Kartuschen | Waters | USA |
| HR-P-Kartuschen | Macherey-Nagel | Deutschland |
| QMA-Kartuschen | Waters | USA |
| Ag-Kationentauscherkartuschen | Alltech | USA |
| Mo-99/Tc-99m-Generator | Tyco | Deutschland |
| W-188/Re-188-Generator | Oakridge National Laboratories | USA |
| Lutetium-177 | IDB | Holland |
| Ammoniumperphenat | Sigma-Aldrich | USA |
| Pentamethylpiperidin (PMP) | Sigma-Aldrich | USA |
| Trifluoressigsäure (TFA) | Merck Serono | Deutschland |
| Acetonitril | LGC Standards GmbH | Deutschland |
| Hydrazin | Sigma-Aldrich | USA |

Tab.7: Liste über die verwendeten Materialien und Chemikalien

4.2 Verwendete Geräte

Alle in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 8 mit Herstellungsfirma und –Land aufgelistet.

| Gerät | Herstellungsfirma | Herstellungsland |
|---|-----------------------------|------------------|
| HPLC-Pumpe | Kontron Instruments | Deutschland |
| UV-HPLC-Detektor-432 | Kontron Instruments | Deutschland |
| Radiodetektor 2''NaI | Raytest | Deutschland |
| Ramona Radiochromatographie- Software | Raytest | Deutschland |
| GinaStar Radiochromatographie- Software | Raytest | Deutschland |
| HPLC-Säule LiChrospher 10 C-18 reversed phase 250 x 4 mm und Partikelgröße 5 µm | CS-Chromatographie Services | Deutschland |
| Kieselgel 60 Alufolien für Dünnschichtchromatographie | Merck Serono | Deutschland |
| ITLC Silicagel für Dünnschichtchromatographie | Pall Life services | USA |
| D 72 Zentrifuge | Andreas Hettich | Deutschland |
| Wallac Wizzard 1480 Gammacounter | PerkinElmer Life Science | USA |
| Isomed 501 Ionisationskammer | Dresden Messelektronik | Deutschland |

Tab. 8: Liste über alle verwendete Geräte

4.3 HPLC-Einstellungen

Der HPLC-Gradient und die verwendeten Lösungsmittel ermöglichen eine Überwachung und Qualitätskontrolle der chemischen Reaktionen. Eine übliche Kombination ist die Verwendung von 0,1 %-iger Trifluoressigsäure (TFA) und Acetonitril. Je nach Hydrophilie der Edukte und Produkte müssen Laufmittel und HPLC-Gradient gewählt werden damit die Reaktion qualitativ und quantitativ beurteilt werden kann. In Tabelle 9 sind die gewählten Einstellungen und Konditionen aufgetragen.

| | |
|---------------------------------|--|
| Laufmittel A (hydrophile Phase) | 0,1 %-ige Trifluoressigsäure (TFA) |
| Laufmittel B (lipophile Phase) | Acetonitril |
| HPLC-Gradient | Von 100% TFA auf 80% Acetonitril in 30 Minuten |
| Wellenlänge UV-Detektor | 254 nm |

Tab. 9: Übersicht über die verwendeten HPLC-Laufmittel und –Einstellungen

4.4 Allgemeine Arbeitsvorschriften

4.4.1 Herstellung des ^{99m}Tc -triaquatricarbonylkations

Zur Komplexierung („Tc-Carbonyl“) des Tc-99m wurde ein kommerzieller „Technetium-Carbonyl-Kit“ (Isolink[®], Tyco) eingesetzt. 1 ml ^{99m}Tc -Generatoreluat mit der gewählten Radioaktivität (200 MBq–20 GBq) wird zum Isolink-Vial zugegeben. Diese Lösung inkubiert dann 20 Minuten im Heizblock bei 100°C. Anschließend wird die Technetium-Carbonyl-Lösung durch Spülen mit kaltem Wasser auf Raumtemperatur gebracht. Durch Zugabe von 300 µl 1 M HCl wird der pH-Wert der Lösung auf 2 eingestellt. Die saure Lösung steht für 10 Minuten bei Raumtemperatur, damit das restliche Reduktionsmittel im Vial vernichtet wird. Der pH-Wert der Lösung wird ab-

schließlich durch Zugabe von 180 μl 1 M NaHCO_3 wieder in den neutralen Bereich gebracht. Die Qualitätskontrolle erfolgt mittels HPLC.

4.4.2 Abspaltung der Dde-Schutzgruppe

Zur Abspaltung der Dde-Schutzgruppe am Lysin⁷ wird 10 μl Hydrazin (98 %-Aldrich) zu der jeweiligen Peptidlösung (Volumen der Peptidlösung: 500–1100 μl) zugesetzt. Bei kleineren Volumina (200–300 μl) und Stoffmengen der Peptidlösung wird 5 μl einer 25 %-igen Hydrazinlösung (in DMF) zum Entschützen benutzt. Die Hydrazin-Peptid-Lösung inkubiert 20–25 Minuten bei Raumtemperatur. Die Ausbeute der Reaktion wird mittels HPLC bestimmt.

Die Entschützungsreaktion kann wahlweise nach Tc-Markierung und eventueller Konjugation oder vor der Markierung an einer größeren Menge an derivatisiertem/underivatisiertem Peptid erfolgen. Bei der zweiten Alternative wird ein Vorrat an Markierungsvorläufer hergestellt, um später eine schnellere oder praktischere Fertigstellung der verschiedenen Tc-Derivate zu ermöglichen, da nur noch ein Markierungsschritt zur Herstellung des gewünschten Analogons notwendig ist.

4.4.3 Aufreinigung von Tc-99m-markierten Peptiden bzw. Markierungsvorläufern

Die Aufreinigung erfolgt mittels einer mit 2 ml Acetonitril und 10 ml Wasser vorkonditionierten C-18-light-SepPak-Kartusche (Waters) beziehungsweise HR-P-Kartusche (Macherey/Nagel) für die DOTA-Derivate. Dabei wird die jeweilige Peptidlösung in 3 ml Wasser aufgenommen und über die Kartusche gegeben. Anschließend wird die Kartusche mit 10 ml Wasser gespült. Die Kartusche wird mit 2,5 ml 80 %-iger essigsaurer Ethanollösung (40 ml Ethanol, 10 ml Wasser, 100 μl CH_3COOH) umgekehrt zur Beladungsrichtung in ein 15 ml Glasvial eluiert. Der Ethanol wird unter Vakuum abgezogen, solange bis das Vial „trocken“ ist. Danach wird das Peptid in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen. Die Aktivität des Reaktionsvials, der Kartusche,

der Waschlösung und des neuen Vials für die markierten Peptide werden nach jedem Schritt in einer Ionisationskammer gemessen, um den Verlust durch unspezifische Bindung im Vial, in der Kartusche und in Spritzen zu bestimmen.

Bei Aufreinigung von nicht radioaktiv markierten Peptiden (Markierungsvorläufer) erfolgt die Verlustbestimmung im Vial und in der Kartusche beziehungsweise die Mengenbestimmung im neuen Vial durch Integration der jeweiligen HPLC-Peaks bei bekanntem in die HPLC injiziertem Volumen.

4.5 Vorläufersynthesen

4.5.1 Herstellung von DHis-DLys-NOC

- a) 1–1,5 mg Peptid wird abgewogen und in 500 µl DMF gelöst.
- b) Danach wird das Peptid gemäß 4.4.2 entschützt
- c) Das entschützte Peptid wird über eine C-18-light-SepPak-Kartusche aufgereinigt (4.4.3). Das trockene, entschützte Peptid wird danach in 500 µl destilliertem Wasser gelöst und als Vorratslösung bei -20°C eingefroren.

4.5.2 Herstellung von DHis-DLys-DOTA-NOC

- a) 1–1,5 mg Peptid wird abgewogen und in 500 µl DMF gelöst. Anschließend wird 5 µl PMP und DOTA-TFP (2 mg in 500 µl DMF) zur Peptidlösung in einem Peptid zu DOTA-Verhältnis von anfänglich 1:1 zugesetzt. Diese Lösung inkubiert 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die zugesetzte DOTA-TFP-Menge wird sukzessiv erhöht bis das Peptid vollständig konjugiert ist. Dazu ist ein DOTA zu Peptidverhältnis von 4:1 notwendig. Die Konjugation nach jeder DOTA-Zugabe wird mittels HPLC kontrolliert.

- b) Die Entschützung erfolgt wie unter 4.4.2 vorgegeben. Eine zusätzliche Kontrolle ob die DOTA-Derivatisierung tatsächlich erfolgt ist kann mittels Lutetiummarkierung und nachfolgender HPLC-Messung oder DC bestätigt werden.
- c) Das DOTA-Peptid wird mittels einer HR-P-Kartusche gemäß 4.4.3 aufgereinigt. Das trockene DOTA-Peptid wird dann in 500 µl Wasser gelöst. Die Lösung wird als Vorratslösung bei -20°C eingefroren.

4.5.3 Herstellung von DHis-DLys-TMS-NOC

- a) 1–1,5 mg Peptid wird abgewogen und in 500 µl DMF gelöst. 10mg Trimellitsäureanhydrid (TMSA) werden in 1ml DMF gelöst.
- b) Anschließend wird TMSA zunächst in einem molaren 1:1 Verhältnis zum Peptid und 5 µl PMP zugesetzt. Diese Lösung inkubiert 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die Umsetzung wird mittels HPLC kontrolliert. Die zugesetzte Menge an TMSA wird solange erhöht bis das Peptid zu 100 % konjugiert ist. Hierzu ist ein Mengenverhältnis von TMSA zu Peptid von 8:1 erforderlich.
- c) Die Entschützung wird wie unter 4.4.2 beschrieben durchgeführt.
- d) Das Gemisch wird dann gemäß 4.4.3 mittels einer C-18-light-Kartusche aufgereinigt und nach Eindampfen des Ethanol/Wassergemisches in 0,5 ml destilliertem Wasser gelöst. Der Verlust an Peptid durch unspezifische Bindung beziehungsweise die Peptidmenge im neuen Vial wird mittels Integration der HPLC-Peaks (HPLC von c) und d) bei konstantem injiziertem Volumen) bestimmt.
- e) Danach wird die TMSA-Peptid-Lösung als Vorratslösung bei -20°C eingefroren.

4.6 Radiosynthesen

Im Allgemeinen kann das jeweilige Tc-markierte (underivatisierte oder DOTA- beziehungsweise TMSA-derivatisierte) Produkt über zwei verschiedene Wege synthetisiert werden. Weg 1 ist ein indirekter Weg, wobei das Peptid zunächst mit Technetiumcarbonyl markiert und daran anschließend derivatisiert und entschützt wird.

Weg 2 ist eine direkte Tc-Carbonyl-Markierung des bereits derivatisierten und entschützten Peptids, wobei dieser Vorläufer zunächst synthetisiert werden muss. Weg 2 ist hinsichtlich radioaktiver Reaktionsschritte zu bevorzugen, weil schneller und direkter, setzt aber den Einsatz größerer Mengen des gekauften Peptids zur Vorläufersynthese voraus.

4.6.1 Herstellung von [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})$]-DHis-DLys-NOC (Weg 1)

- a) Das ^{99m}Tc -Carbonyl wird gemäß 4.4.1 hergestellt. Zu 200 μl beziehungsweise dem ganzen ^{99m}Tc -Carbonyl (1,38 ml) Ansatz wird 50 μl Peptidlösung (1 mg Peptid in 500 μl DMF) zugesetzt. Diese Lösung wird 30 Minuten bei 60°C im Heizschrank inkubiert. Die Markierungsausbeute wird mittels HPLC kontrolliert.
- b) Die Abspaltung der Dde-Schutzgruppe am Lysin⁷ (Entschützung) erfolgt, wie unter 4.4.2, beschrieben.
- c) Das markierte, entschützte Peptid wird dann mit Hilfe einer C-18-light-SepPak-Kartusche, wie unter 4.4.3, beschrieben aufgereinigt.

4.6.2 Herstellung von [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})$]-DHis-DLys-NOC (Weg 2)

- a) Das Tc-Carbonyl wird wie unter 4.4.1 beschrieben, hergestellt. Anschließend setzt man 50 μl (entspricht 100 μg des Peptides) von der Vorratslösung (Kapitel 4.5.1) mit dem entschützten Peptid zum Isolink-Vial hinzu und inkubiert die Lösung bei 60°C. Die Ausbeute wird mittels HPLC kontrolliert.

4.6.3 Synthese von [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})$]-DHis-DLys-DOTA-NOC (Weg 1)

- a) Die Tc-Carbonyl-Herstellung erfolgt wie üblich (4.4.1.)

- b) Zum Isolink-Vial wird 50 µl Peptid (1 mg in 500 µl DMF) zugesetzt. Diese Lösung wird für 30 Minuten bei 60°C im Heizschrank inkubiert. Die Markierungsausbeute wird mittels HPLC bestimmt.
- c) Das Tc-99m-markierte Peptid wird dann über eine wie üblich vorkonditionierte C-18-light-Kartusche gegeben und mit 10 ml Wasser gewaschen. Die Kartusche wird in umgekehrter Flussrichtung mit 0,5 ml DMF in ein neues Glasvial eluiert.
- d) Als nächster Schritt wird 2 mg DOTA-TFP-Ester abgewogen und zusammen mit 5 µl PMP zum gesamten Tc-Peptidaliquot (500 µl) zugesetzt. Schließlich inkubiert die Lösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die Reaktionsausbeute wird mittels HPLC bestimmt. Ein alternatives Reagenz DOTA-NCS ergab ähnliche Ausbeuten wie der DOTA-TFP-Ester, jedoch waren höhere Stoffmengen und eine 90 minütige Inkubation bei 60°C notwendig. Mit DOTA-NHS-Ester war keine Konjugation möglich. Wahrscheinlich aufgrund einer sehr schnellen Hydrolyse des Aktivesters, selbst in wasserfreiem DMF waren die Derivatisierungsversuche mit dem DOTA-NHS-Ester enttäuschend. Da die vollständige Konjugation mit DOTA-TFP-Ester schneller abläuft und bei Raumtemperatur durchführbar ist, wurde im Folgenden DOTA-TFP-Ester für die Derivatisierung des Peptids mit DOTA eingesetzt. Die verschiedenen DOTA-Derivatisierungsreagenzien sind in Abbildung 15 gezeigt.

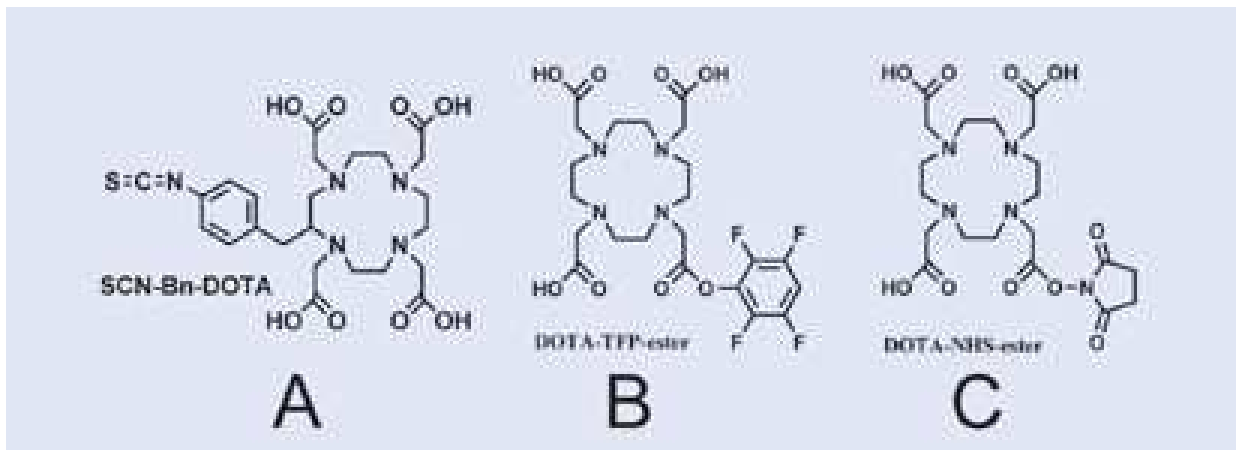


Abb. 15: a) SCN-DOTA, b) DOTA-TFP-Ester und c) DOTA-NHS-Ester wurden als Reagenzien für die DOTA-Konjugation in dieser Arbeit benutzt.

- e) Die Tc99m-Peptid-DOTA-Lösung wird wie unter 4.4.2 beschrieben entschützt.

f) Die Aufreinigung erfolgt analog der Beschreibung unter 4.4.3. Einziger Unterschied ist, dass eine HR-P-Kartusche (medium) anstelle einer C-18-light-Kartusche benutzt wird.

4.6.4 Synthese von [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})$]-DHis-DLys-DO T^{A} -NO C (Weg 2)

- Tc-Carbonyl wird wie unter 4.4.1 beschrieben hergestellt.
- 50 μl der DO T^{A} -Peptid-Lösung wird zum Tc-Carbonyl-Vial zugesetzt. Das Tc-Carbonyl-DO T^{A} -Peptid-Gemisch wird bei 60°C inkubiert. Eine HPLC-Analyse wird durchgeführt, um die Reaktionsausbeute zu bestimmen.
- Je nach Ausbeute und Sauberkeit im Chromatogramm erfolgt eine erneute Aufreinigung mittels einer HR-P-Kartusche (4.4.3). Als Besonderheit bei diesem Aufreinigungsvorgang wird die Kartusche zusätzlich mit 10 ml 10 %-igem Acetonitril gewaschen.

4.6.5 Synthese von [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})$]-DHis-DLys-TMS-NO C (Weg 1)

- Die Tc-Carbonyl-Herstellung erfolgt wie unter 4.4.1 beschrieben.
- Zum Isolinkvial wird 50 μl Peptid (1 mg in 500 μl DMF) zugesetzt. Diese Lösung inkubiert 30 Minuten bei 60°C im Heizschrank. Die Markierungsausbeute wird mittels HPLC bestimmt. Die Derivatisierung erfolgt in diesem Fall mittels Trimellitsäureanhydrid, dessen Struktur in Abbildung 16 gezeigt ist.

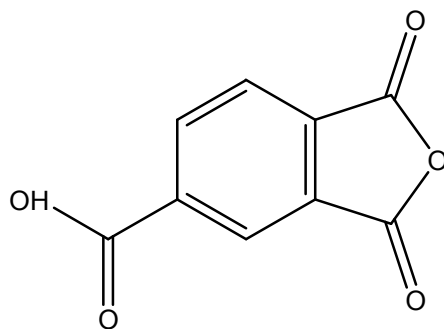


Abb. 16: Strukturformel des benutzten Konjugationsreagenz Trimellitsäureanhydrid (TMSA)

cI) 5 mg Trimellitsäureanhydrid wird abgewogen und gefolgt von 0,25 ml 1 M NaHCO₃ zu der Peptidlösung zugesetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Konjugationsausbeute wird mittels HPLC bestimmt.

cII) Alternativ wird die Tc-Peptid-Lösung über eine vorkonditionierte C-18-light-Kartusche gegeben und mit 10 ml Wasser gewaschen. Das Peptid wird mit 0,5 ml DMF in ein neues Glasvial rückwärtseluiert. Anschließend setzt man 5 mg Trimellitsäureanhydrid und 5 µl PMP hinzu. Dieses Gemisch inkubiert 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die Reaktionsausbeute wird mittels HPLC bestimmt. Dieses Syntheseverfahren bietet eine vorteilhafte wasserfreie Alternative zur Verhinderung einer Hydrolyse des Trimellitsäureanhydrids an.

d) Die Abspaltung der Dde-Schutzgruppe erfolgt gemäß 4.4.2.

e) Die ^{99m}Tc-Carbonyl-Trimellitsäureanhydrid-Peptid-Lösung wird mittels einer C-18-light-Kartusche aufgereinigt, mit 80 % Ethanol eluiert, unter Vakuum eingedampft und schließlich in 0,5-1 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst (4.4.3).

4.6.6 Synthese von [^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)]-DHis-DLys-TMS-NOC (Weg 2)

a) Die Tc-Carbonyl-Herstellung wird gemäß 4.4.1 durchgeführt.

b) 50 µl der Peptid-TMSA-Lösung wird dem Tc-Carbonyl-Vial zugesetzt und 30 Minuten bei 60°C inkubiert. Die Markierungsausbeute wird mittels HPLC kontrolliert.

c) Je nach Ausbeute und Reinheit im Chromatogramm, erfolgt eine erneute Aufreinigung mittels einer C18-light-Kartusche (4.4.3).

4.6.7 Synthese von DHis-DLys[¹⁷⁷Lu-DOTA]-NOC

a) Das DOTA-Peptid wird über Weg 2 wie unter 4.5.4 beschrieben hergestellt.

b) 50 µl von der DOTA-Peptid-Vorratslösung (1 mg/ 500µl), 40 µl Lutetium (500 MBq) und 50 µl 0,2 M Acetatpuffer werden in einem 15 ml Glasvial gemischt.

c) Diese Lösung inkubiert 45 Minuten bei 80°C im Heizschrank.

d) Anschließend wird die Lösung aufgereinigt mittels einer HR-P-Kartusche wie unter 4.4.3 beschrieben. Auch bei diesem Reinigungsvorgang wird die Kartusche zusätzlich mit 10 ml 10 %-iger Acetonitril gewaschen, um freies Lutetium und freie Lutetium-DOTA-Komplexe von dem Peptid abzutrennen. Die Ausbeute wird mittels HPLC bestimmt.

4.7 Sonstige Synthesen

4.7.1 Herstellung des Rheniumtriaquatricarbonylkations

Um für die Rezeptorbindungsversuche eine repräsentable und quantifizierbare Peptidmenge für die Messung der Auswirkung der Carbonylgruppe auf die Rezeptoraffinität der Carbonylmarkierten Derivate zu ermöglichen, wurde das $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})]$ -DHis-DLys-NOC synthetisiert. Mit diesem Derivat hat man eine chemisch und insbesondere biologisch im Vergleich zu den Tc-Carbonylmarkierten Derivaten verwandte Verbindung, die zusätzlich eine genaue Mengenbestimmung aufgrund der festgelegten Relation zwischen stabilem und radioaktivem Rhenium in der Peptidlösung ermöglicht. Da keine Quantifizierung mittels trägerfreier Technetiummarkierter Peptide möglich ist, erfolgte diese Synthese mit einer bekannten Menge an stabilem Rhenium.

Das Rhenium-188 wird zu der Lösung zugesetzt, um die Reaktion mittels HPLC verfolgen und die Ausbeute und tatsächliche Peptidmenge am Ende der Reaktion bestimmen zu können. Die genaue Mengenbestimmung des Rheniumpeptids ist von großer Relevanz, da das rheniummarkierte Derivat nur zwecks Rezeptorbindungsstudien synthetisiert wurde.

- a) In einem 1 ml NUNC-Gefäß werden 1 ml Re-188-Perrhenat vom Generator, 30 µl stabiles Perrhenat (7 mg/ ml) und 100 µl 4 M H_3PO_4 gemischt.
- b) 15 mg Aminoboran ($\text{BH}_3\text{-NH}_3$) wird abgewogen und in ein leeres 15 ml Glasvial gegeben. Zum Aminoboran wird jetzt 1,1 ml der oben genannten Lösung zugesetzt. Dieses Gemisch inkubiert dann 20 Minuten bei Zimmertemperatur. Das bei der Reaktion entstehende H_2 -Gas wird über eine Kanüle abgelassen.
- c) Danach wird 1 ml von dieser Lösung in ein Isolink-Vial transferiert. Dieses Gemisch inkubiert 20 Minuten bei 100°C im Heizblock. Die Ausbeute wird mittels HPLC bestimmt.

4.7.2 Herstellung von $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})]$ -DHis-DLys-NOC

- a) 200 μl Re-Carbonyl (Konzentration 0,5 mM) wird in ein NUNC-Gefäß transferiert. Dem Re-Carbonyl werden 10 μl 12 M HCl zugesetzt und anschließend 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der pH-Wert wird auf etwa 7 durch Zugabe von 60–80 μl NaHCO_3 eingestellt.
- b) Danach wird 50 μl Peptid (2 mg Peptid/ ml DMF) zur Lösung zugesetzt. Dieses Gemisch inkubiert 30 Minuten bei 75°C. Die Reaktionsausbeute wird mittels HPLC bestimmt.
- c) Die Abspaltung der Schutzgruppe erfolgt wie unter 4.4.2 beschrieben.
- d) Die Aufreinigung des Re-Peptids erfolgt mit Hilfe der HPLC. Dazu wird 50 μl Re-Peptid-Lösung in eine HPLC-Spritze aufgezogen und in die HPLC injiziert. Der radioaktive und der UV-Peak werden in ein NUNC-Gefäß aufgefangen.
- e) Anschließend wird eine Verdünnungsreihe von dem benutzten radioaktiven Perrhenat hergestellt und diese Reihe zusammen mit der aufgefangenen Rhenium-Peptid-Fraktion im Gamma-counter gemessen.
- f) Die absolute Stoffmenge lässt sich somit über das Verhältnis von Radioaktivität in der aufgefangenen Fraktion zur Anfangsradioaktivität, multipliziert mit der bekannten eingesetzten stabilen Rheniummenge. Das rheniumcarbonylmarkierte Peptid ist in 1 ml einer etwa 40 %-igen Acetonitrillösung gelöst.
- g) Das Rhenium-Peptid wird während des Abklingens der Radioaktivität bei -20°C eingefroren. Täglich wird eine Dünnschichtschromatographie in Citratlösung durchgeführt um die Stabilität des Peptides zu prüfen. Der DC-Streifen wird in zwei etwa gleich große Teile zerschnitten und diese Streifen werden im Gammacounter ausgezählt. Das Prinzip besteht darin, dass das markierte Peptid unten auf dem DC-Streifen bleibt, während freies Perrhenat beziehungsweise Re-Carbonyl nach oben wandert auf dem DC-Streifen.
- h) Wenn die Restradioaktivität des Re-188 abgeklungen ist, kann das Peptid für Rezeptorbindungsversuche eingesetzt werden.

4.8 Rezeptorbindungsstudien

4.8.1 Bindungsassay-Pufferlösung

Die Pufferlösung (Waschlösung) für die Rezeptorbindungsstudien besteht aus 25 mM HEPES, 5 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂ und 0,5 % BSA, wie in der Anweisung der Firma PerkinElmer vorgegeben (Euroscreen technical data sheet, 2005). Der pH-Wert der Lösung liegt im neutralen Bereich und wird mittels eines normalen pH-Streifens kontrolliert. Die Lösung wird bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

4.8.2 Rezeptorbindungsassays

- a) Die benötigte Anzahl konischen Gläser vom Typ 1,1 ml Screw Neck Micro-Vial von Grace Alltech werden 2 Tage lang mit 1 ml 1 %-iger BSA-Lösung vorbehandelt, um die unspezifische Bindung im Glas zu minimieren. Das BSA wird mit einer Pipette abpipettiert und in jedes Gefäß wird anschließend 20–50 µl Pufferlösung zupipettiert.
- b) Das jeweilige zu untersuchende Derivat wird zu den gewünschten Konzentrationen in NUNC-Gefäßen mit Pufferlösung verdünnt. Die sstr2-Lösung (PerkinElmer Life Science, Boston, USA) wird soweit verdünnt bis 10 µl Rezeptorlösung einer Unit entspricht. Das [¹²⁵I]-Somatostatin (78,8 TBq / mmol; 2130 mCi / mmol) wird mit Pufferlösung verdünnt bis sich in 20 µl der [¹²⁵I]-Somatostatin-14-Lösung 10000-15000 Counts (einer Konzentration von 1-1.5 nM entsprechend) befindet.
- c) Anschließend wird in jedes Gefäß die ausgewählte Konzentration an Peptid, [¹²⁵I]-Somatostatin-14 und Rezeptorlösung zugegeben. Das Endvolumen in jedem Gefäß/pro Assay beträgt 100 µl und wird wenn nötig durch zusätzliche Zugabe von Pufferlösung erzielt. Die Gefäße werden dann im Gammacounter gemessen.
- d) Die Assays inkubieren unter leichtem Schütteln 60 Minuten bei Raumtemperatur.
- e) Anschließend wird 0,5 ml kalte (+4°C) Pufferlösung und 10 mg Bariumsulfat in jedes Gefäß zugegeben. Das Bariumsulfat dient als Pellet und wurde gewählt, da es die Peptide und Peptid-Rezeptor-Komplexe kaum unspezifisch bindet.

f) Die Ansätze werden vier Mal zwei Minuten zentrifugiert und pro Zentrifugationsrunde mit kalter (+4°C) 0,5 ml Pufferlösung gewaschen. Der jeweilige Überstand wird pro Waschrunde abpipettiert.

g) Die rezeptorgebundenen und unspezifisch gebundenen [¹²⁵I]-Somatostatin-14-Counts im Glas werden im Gammacounter gezählt.

h) Um die unspezifische Bindung zu bestimmen, wird ein großer Überschuss (100 µl einer 1µM-Lösung) an SS-14 zugegeben und erneut 60 Minuten inkubiert. Die Proben werden wie zuvor zentrifugiert und gewaschen. Danach erfolgt eine neue Messung im Gammacounter.

i) Die spezifische Bindung ist somit der Differenz zwischen der ersten Messung (totale Bindung) und zweiten Messung (unspezifische Bindung) im Gammacounter.

Die Bindungsaffinität wurde für das geschützte, sowie für das entschützte Peptid, als auch für das DOTA- und das TMSA-derivatisierte Peptid bestimmt. Um Rückschlüsse auf die Affinität des technetiummarkierten, nicht-derivatisierten Peptids treffen zu können, wurde das Rezeptorbindungsverhalten des underivatisierten, entschützten Rhenium-Peptids für den sstr2-Rezeptor untersucht.

4.9 Serumstabilität

a) Eine Ag-Kartusche sowie eine Anionentauscherkartusche (QMA-light) wurden mit 5ml Wasser konditioniert und nacheinander geschaltet.

b) 5 ml Pertechneatlösung (4 GBq) wurde über die Ag-Kartusche und den Anionentauscher gegeben. Die Kartuschen wurden mit 5 ml Wasser durchgespült, um das Pertechneatlösung vollständig auf dem Anionentauscher zu fangen. Der Anionentauscher wurde mittels 1 ml physiologischer Kochsalzlösung in ein Isolink-Vial eluiert (3,9 GBq). Diese zwei ersten Schritte wurden durchgeführt um die Pertechneatlösung aufzukonzentrieren (3,9 GBq / 1 ml, statt 4 GBq / 5 ml)

c) Das Tc-Carbonyl wurde sonst wie im Kapitel 4.4.1 beschrieben hergestellt. Der ganze Ansatz wurde mit 300 µl 1 M HCl und 180 µl 1 M NaHCO₃ neutralisiert.

d) Die Peptidsynthese erfolgte mit Hilfe den vorgefertigten Peptidlösungen über den Weg 2 (4.6.2/4/6). 300 µl von der Tc-Carbonyl (800 MBq / Ansatz) wurde jeweils mit 50 µl Peptidlösung (DOTA-Peptid, TMS-Peptid und underivatisiertes Peptid) bei 60°C inkubiert.

- e) Anschließend wurde 300 µl von der Tc-Peptidlösung mit 2 ml humanem Serum gemischt. Diese Lösungen wurden bei 37°C im Schrank inkubiert.
- f) Nach 1, 2, 4, 8 und 24 Stunden wurde 300 µl von dem jeweiligen Ansatz (Tc-Peptid, Tc-DOTA-Peptid und Tc-TMS-Peptid) entnommen und in ein konisches Glasgefäß transferiert.
- g) Zu diesen Ansätzen wurde, um die Proteine zu fällen, 500 µl Acetonitril hinzugesetzt. Diese Lösung wurde 15 Minuten bei 4500 Umdrehungen zentrifugiert.
- h) 25 µl von dem jeweiligen Überstand wurde mittels HPLC kontrolliert. Der restliche Überstand wurde in ein NUNC-Gefäß transferiert.
- i) Der Überstand und die gefällten Proteine wurden getrennt im Gammacounter ausgezählt, um die Proteinbindung zu bestimmen. Diese Messung erfolgte erst 72 Stunden nach Syntheseende, da die Radioaktivität zu einem früheren Zeitpunkt zu hoch für eine genaue Messung im Gammacounter war.

4.10 Biodistributionsuntersuchungen

Die drei Tc-99m-markierten Peptid-Derivate (das underivatisierte Peptid, das DOTA- und das TMS-Derivat) wurden über Weg 2 synthetisiert und aufgereinigt wie in Kapitel 4.6 beschrieben. Das DHis-D-Lys^[177Lu-DOTA]-NOC wurde gleichfalls gemäß 4.6.7 hergestellt, während das ^[177Lu]-DOTA-TATE von Chemielabor der Klinik für Nuklearmedizin zur Verfügung gestellt wurde. Anschließend wurden Aliquots mit 1 % BSA in physiologischer Kochsalzlösung verdünnt bis 20 µl Lösung 1–3 Millionen Counts (counts per minute/ cpm) enthielt. Es wurden drei Aliquots 20 µl der jeweiligen Peptidlösung abpipettiert und im Gammacounter ausgezählt. Somit konnte ein Durchschnittswert aus den drei Proben gebildet werden, der der injizierten Dosis entspricht. Jeder Maus wurden 1–3 Millionen Technetium- beziehungsweise Lutetium-177-Counts (cpm) in 20 µl 1 % BSA in physiologischer Kochsalzlösung in die Schwanzvene injiziert. Die Tiere wurden zu den gewählten Zeitpunkten (1h, 4h und 24h p.i.) nach Diethyläther-Narkose mittels Genickbruches getötet. Die Organe wurden dann einzeln exsiziert, gewogen und im Gammacounter gezählt. Die Verteilung der Tracer wurde nach 1 Stunde, 4 Stunden und 24 Stunden untersucht. Zum Vergleich wurde eine Maus mit ^[177Lu]-DOTA-TATE (etwa 3 Millionen Counts in 20 µl 1 % BSA physiologische NaCl-Lösung) injiziert und die Biodistribution die-

ses Peptids nach einer Stunde untersucht. Weiterhin wurden die Einstunden- und 24-Stunden-Verteilung des [^{177}Lu]-DOTA-NOC-Peptids untersucht.

Anhand der Organgewichte und der gemessenen Counts wurden die Ergebnisse als % injizierte Dosis pro Gramm Gewebe bestimmt (% i.D./g).

Die Tierexperimente wurden vom Komitee für Tierstudien der Bezirksregierung Köln genehmigt (AZ: 8.87-51.04.20.09.326). Die Tiere wurden artgerecht behandelt und wurden in Käfigen mit bis zu 4 Versuchstieren gehalten. Die Temperatur betrug 24-26 °C in dem klimatisierten Raum.

5 Ergebnisse

5.1 Radiosyntheseergebnisse

5.1.1 [^{99m}Tc]-Triaquatricarbonylkation

Das [^{99m}Tc]-Triaquatricarbonylkation lässt sich mit Hilfe des Isolink-Kits mit hoher Aktivität (bis zu 30 GBq) und Ausbeute herstellen. Im Radiochromatogramm beträgt die Retentionszeit des [^{99m}Tc]-Carbonyls 4 Minuten (siehe Abbildung 17), die des Pertechnetat 9,6 Minuten. Die gut reproduzierbare Reaktionsausbeute beträgt nahezu 100 %.

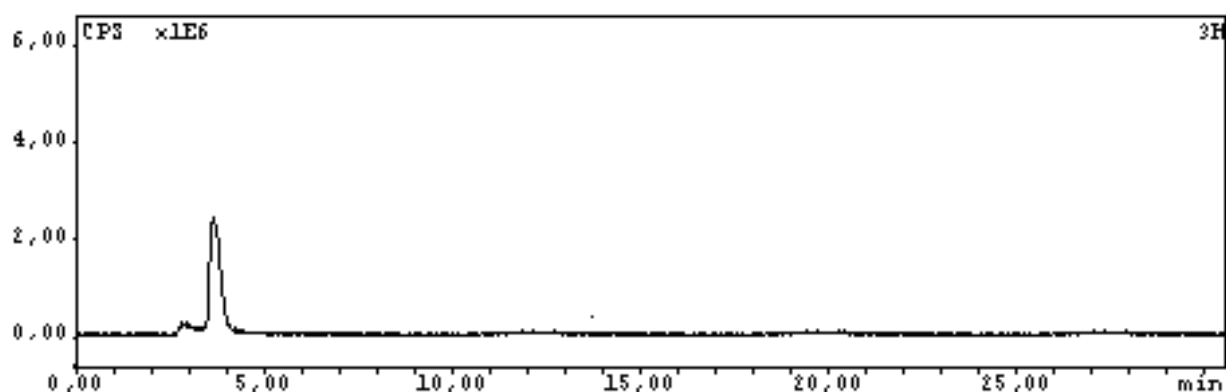


Abb. 17: Radio-HPLC des [^{99m}Tc]-Triaquatricarbonylkations mit einer Retentionszeit von 4 Minuten. Die radiochemische Reinheit von >95 % war stets gut reproduzierbar.

Die Zugabe von HCl sorgt dafür, dass restliches Reduktionsmittel im IsoLink-Vial vernichtet wird, um zu verhindern, dass es bei der nachfolgenden Peptidmarkierung nicht zu einer Öffnung der Disulfidbrücke des Peptids kommt. Eine Reduktion der Disulfidbrücke würde zu einem fast vollständigen Verlust der Rezeptoraffinität des Peptids führen. Die anschließende Zugabe von 1 M NaHCO₃ zur Einstellung des pH-Wertes auf einen Wert im neutralen Bereich (pH≈7,5), ist Voraussetzung für eine optimale Ausbeute der folgenden Peptidmarkierung (Du et al., 2001).

5.1.2 $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})]$ -DHis-DLys-NOC

Unter den gewählten chromatographischen Bedingungen liegt die Retentionszeit des markierten, geschützten Peptids bei 23 Minuten. Das nicht markierte, geschützte Peptid eluiert bei 19 Minuten, wie in Abbildung 18 dargestellt. Generell beobachtet man eine Verzögerung der Retentionszeit des Peptids um 4 Minuten, wenn das jeweilige Derivat mit $[^{99m}\text{Tc}]$ -Carbonyl markiert wurde. Die Verzögerung in Richtung höherer Lipophilie erklärt sich zum einen durch die Vergrößerung des Peptids um den Tc-Carbonylkomplex und zum anderen durch den Wegfall der Aminogruppenladung des endständigen Histidins und die damit veränderten Ladungseigenschaften.

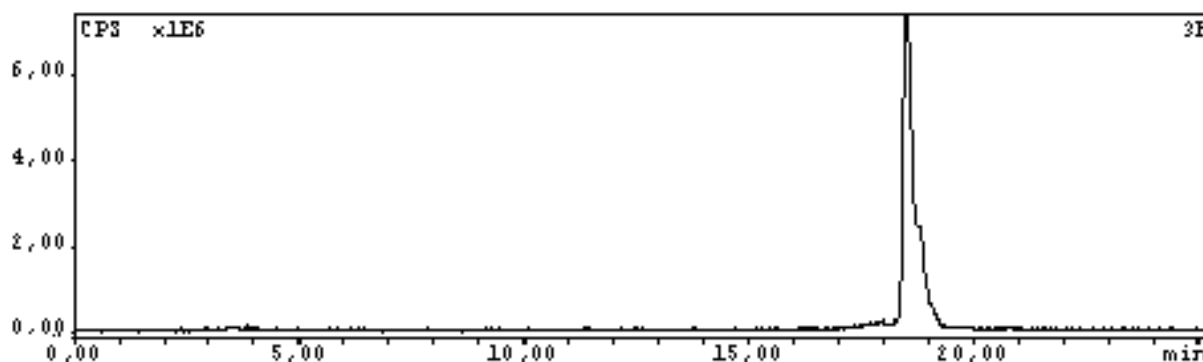


Abb. 18: Radio-HPLC von $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})]$ -DHis-DLys-NOC (synthetisiert über Weg 2) mit einer Retentionszeit von 19 Minuten. Die Ausbeute bzw. Reinheit beträgt nahezu 100 %

5.1.3 Konjugation mit DOTA-TFP-Ester

Die erfolgreiche Konjugation zeigt sich im Chromatogramm durch eine Retentionszeitverschiebung des derivatisierten DOTA-Peptids gegenüber dem underivatisierten Peptid von einer Minute. Beispielsweise von 19 Minuten auf 18 Minuten (siehe Abbildung 19), wenn das Tc-markierte, underivatisierte, entschützte Peptid mit dem Tc-markierten, entschützten DOTA-Derivat verglichen wird. Die Vollständigkeit der Reaktion wird mittels HPLC kontrolliert. Das Peptid reagiert vollständig mit dem DOTA ab.

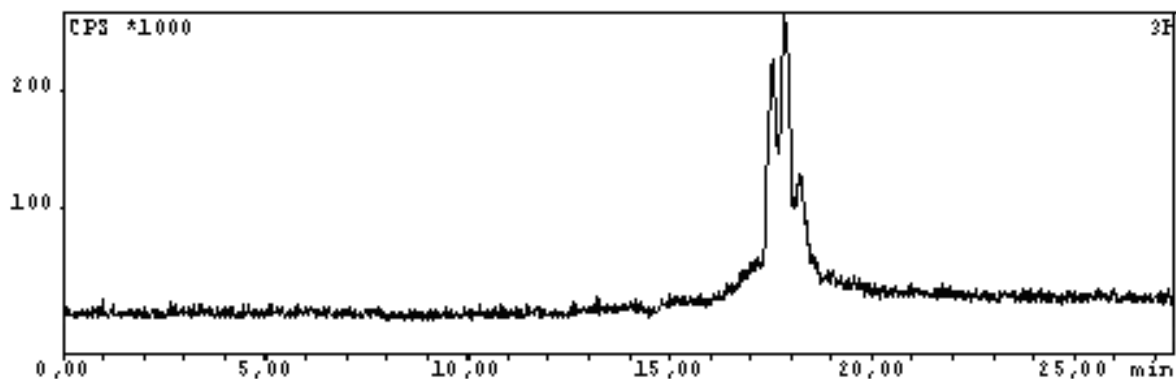


Abb. 19: Radiochromatogramm von entschütztem $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})]$ -DHis-DLys-DOTA-NOC nach Aufreinigung (synthetisiert über Weg 2) mit einem Tripple-Peak bei 18 Minuten.

Der Tripple-Peak lässt sich a.e. durch pH-bedingte verschiedene Protonierungsgrade des komplexen DOTA-Restes am Peptid erklären. Eine DOTA-Konjugation des endständigen D-Histidins schließt die Tc-Carbonylmarkierung und die des Lysins⁷ die erhaltene Rezeptoraffinität aus. Über den im Weg 2 (siehe Kapitel 4.6.4) beschriebenen Reaktionsweg wird ein Vorrat an fertig-konjugiertem Peptid für Technetium- oder Lutetiummarkierungen gewonnen. Durch dieses Verfahren kann die Fertigstellung des Tc-DOTA- beziehungsweise Lu-DOTA-Radiopeptids schneller und materialsparender erfolgen.

Einen weiteren Beweis für die erfolgreiche DOTA-Konjugation stellt die problemlose Lutetiummarkierung dieses Derivates (siehe Kapitel 5.1.7) dar.

5.1.4 Konjugation mit Trimellitsäureanhydrid

Eine Verzögerung der Retentionszeit des underivatisierten Peptids von 1 Minute zeigt die TMSA-Konjugation des Peptids an. Zum Beispiel hat das entschützte DHis-DLys-NOC eine Retentionszeit von 15 Minuten, während das DHis-DLys-TMS-NOC eine Retentionszeit von 16 Minuten

unter den gewählten Chromatographiebedingungen aufweist. Durch den eingesetzten Überschuss an TMSA, reagiert sämtliches Peptid ab.

Auch hier wird über den Weg 2 eine Vorratslösung an konjugiertem unmarkiertem TMS-Peptid hergestellt, das eine schnellere und materialsparendere Fertigstellung des fertigen Tc-TMS-Peptids als der Syntheseweg 1 ermöglicht. Sowohl beim Weg 1 als auch beim Weg 2 beträgt die Konjugationsausbeute und Reinheit nahezu 100 %. In Abbildung 20 ist das Radiochromatogramm des Tc-Carbonylmarkierten TMS-Derivates dargestellt.

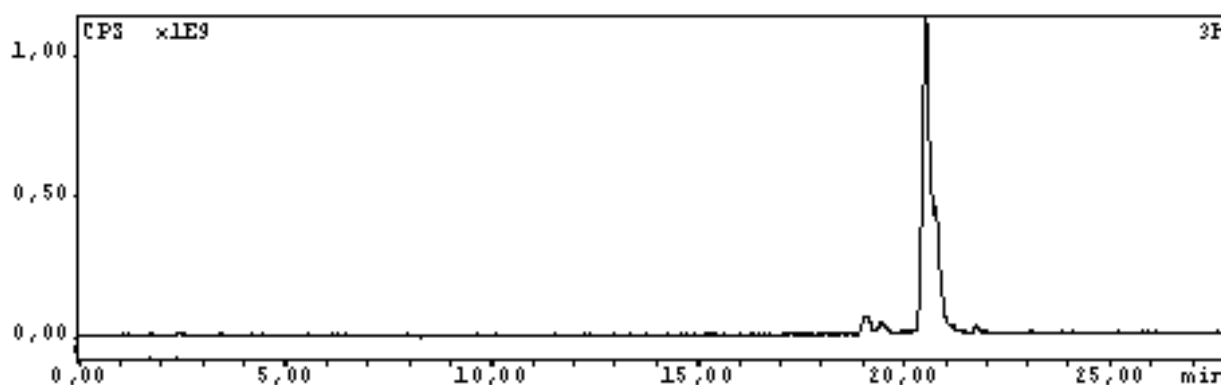


Abb. 20: Radiochromatogramm von dem bei 20 Minuten eluierenden $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})]$ -DHis-DLys-TMS-NOC. Die Ausbeute und Reinheit liegen reproduzierbar über 90 %.

Das konjugierte, entschützte Peptid zeigt sich im UV-Spektrum der HPLC durch eine 1-minütige Verschiebung der Retentionszeit von 19 auf 20 Minuten.

5.1.5 Abspaltung der Dde-Schutzgruppe

Die Dde-Schutzgruppe wird bei allen Synthesen beschrieben mittels Zusatz von 10 μl Hydrazin in 500 μl Reaktionsgesamtvolumen oder alternativ bei kleineren Stoffmengen mittels 5 μl 25 %-iger Hydrazinlösung abgespalten. Die Abtrennung der Schutzgruppe bewirkt eine Vorverschiebung der Retentionszeit im Chromatogramm von cirka 4 Minuten. Da die Dde-Gruppe auch selbst eine relativ starke UV-Absorption besitzt, beobachtet man zudem eine Abnahme des Integrals des

UV-Peaks des jeweiligen, entschützten Peptids. In Tabelle 10 sind die Retentionszeiten der hergestellten Derivate jeweils mit und ohne Dde-Schutzgruppe aufgelistet.

| Peptidderivat | Retentionszeit geschützt | Retentionszeit entschützt |
|---|-------------------------------------|--------------------------------------|
| DHis-DLys-NOC | 19 Minuten | 15 Minuten |
| DHis-DLys-DOTA-NOC | 18 Minuten | 14 Minuten |
| DHis-DLys-TMS-NOC | 20 Minuten | 16 Minuten |
| [Re(CO) ₃ (H ₂ O)]-DHis-DLys-NOC | 23 Minuten | 19 Minuten |
| [^{99m} Tc(CO) ₃ (H ₂ O)]-DHis-DLys-NOC | 23 Minuten | 19 Minuten |
| [^{99m} Tc(CO) ₃ (H ₂ O)]-DHis-DLys-DOTA-NOC | 22 Minuten | 18 Minuten |
| [^{99m} Tc(CO) ₃ (H ₂ O)]-DHis-DLys-TMS-NOC | 24 Minuten | 20 Minuten |
| DHis-DLys[¹⁷⁷ Lu-DOTA]-NOC | 19 Minuten | 15 Minuten |

Tab. 10: Retentionszeiten (Chromatographiebedingungen sind im Kapitel 3.3 beschrieben) markierter und unmarkierter Peptide vor und nach Abspaltung der Dde-Schutzgruppe

5.1.6 Aufreinigung der Peptide

Die Reinigung wird mit Hilfe einer C-18-light-Kartusche beziehungsweise einer HR-P-Kartusche für das DOTA-konjugierte Peptid durchgeführt. Die HR-P-Kartusche wurde für die Reinigung des DOTA-derivatisierten Peptids, aufgrund zu hohen Verlustes in der C-18-light-Kartusche durch fehlende Retention und hohe unspezifische Bindung, gewählt. Die Reinigung ist zum einen notwendig um potentielle gesundheitsschädigende Chemikalien wie z.B. Hydrazin und Lösungsmittel zu entfernen, sowie die Peptidlösung von freiem Perchnetat und Technetiumcarbonyl zu befreien. Zum anderen ist die Aufreinigung notwendig um das markierte Peptid in einem injektionsgeeigneten Medium für die Biodistributionsuntersuchungen zu lösen. Bei Direktmarkierungen über Weg 2 (4.6.2/4/6) ist dieser Reinigungsprozess nicht zwingend erforderlich, da die Reaktionen ohnehin in Wasser beziehungsweise physiologischer Kochsalzlösung durchgeführt werden und das Reduktionsmittel bereits zerstört war. Auf die Reinigung kann bei diesen

Syntheseverfahren jedoch nur verzichtet werden, wenn das Chromatogramm eine nahezu 100 %ige radiochemische Ausbeute anzeigt. Nach erfolgter Reinigung liegt das Produkt in starker ethanolischer Lösung (80 %) vor. Dies kann ebenfalls nicht für Biodistributionsversuche in Mäusen injiziert werden und daher wird der Ethanol in Vakuum abgedampft und nach Erreichen der Trockene mit physiologischer NaCl-Lösung aufgenommen.

Eine Alternative zur Vakuumverdampfung des Ethanols, ist es den Alkoholgehalt durch Verdünnung zu erniedrigen. Hierbei muss jedoch von Synthesebeginn an ausreichend Radioaktivität eingesetzt werden, um die gewünschte spezifische Volumenaktivität am Ende zu erreichen.

5.1.7 DHis-DLys[¹⁷⁷Lu-DOTA]-NOC

Die Synthese des [¹⁷⁷Lu]-DOTA-NOC-Peptids gelingt mittels des im Kapitel 4.6.7 beschriebenen Syntheseweges mit relativ hoher Reinheit. Nur relativ geringe Reste an freiem Lutetium-DOTA-Komplex (7,5 Minuten) beziehungsweise freiem Lutetium (4,7 Minuten) ist noch chromatographisch zu sehen (siehe Abbildung 21). Das freie Lutetium und Lutetium-DOTA wurden durch die HR-P-Aufreinigung (mit 10 % Acetonitril) weitgehend von der Peptidlösung abgetrennt.

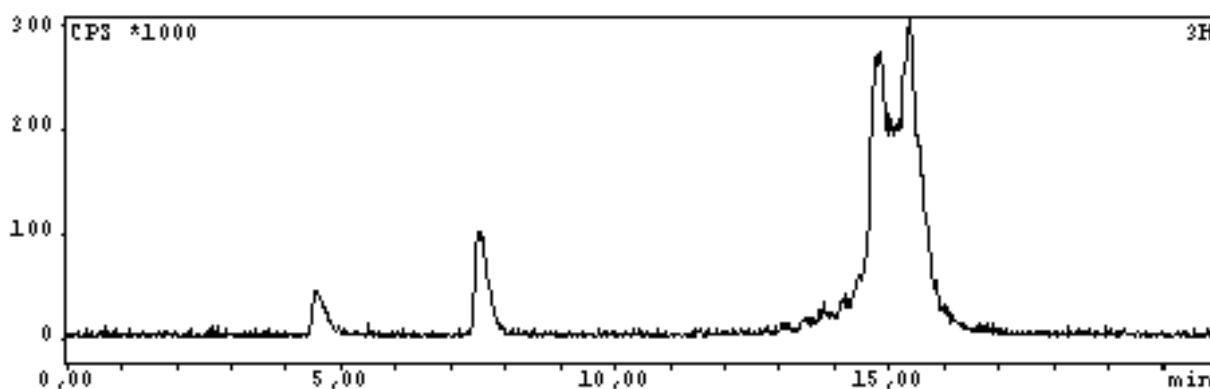


Abb. 21: RadioHPL-Chromatogramm der Reaktionslösung vor Aufreinigung mittels HR-P-Kartusche -DHis-DLys[¹⁷⁷Lu-DOTA]-NOC(Doppelpeak bei 15 min), freies Lu-177-DOTA (7,5 min), freies Lu-177 (4,7 min).

Der Doppelpeak bei 15 Minuten kann durch Entstehung von Diastereoisomeren je nach Konfiguration der Carboxylgruppen im Lutetium-DOTA-Komplex am Peptid erklärt werden. Eine zweifache DOTA-Konjugation des Peptids am endständigen D-Histidin schliesst die einwandfreie Tc-Carbonylmarkierung des hier benutzten Markierungsvorläuferpeptids aus.

5.2 Nicht radioaktive Synthesen

5.2.1 Rhenium-triaquatricarbonylkation

Das Re-Carbonyl lässt sich mit dem unter 4.7.1 beschriebenen Verfahren mit einer variablen Ausbeute von 30–60 % herstellen. Allerdings benötigt die Herstellung drastischere Bedingungen als bei der Tc-Carbonyl-Herstellung, was dazu führt dass ein Teil Perrhenat „über“-reduziert wird. Im Chromatogramm (Abbildung 22) treten drei Peaks auf. Die jeweils Perrhenat (10 Minuten), Re-Carbonyl (4,5 Minuten) und weiter reduziertes Perrhenat ($(\text{Re}^{5+?})$ (2 Minuten)) darstellen.

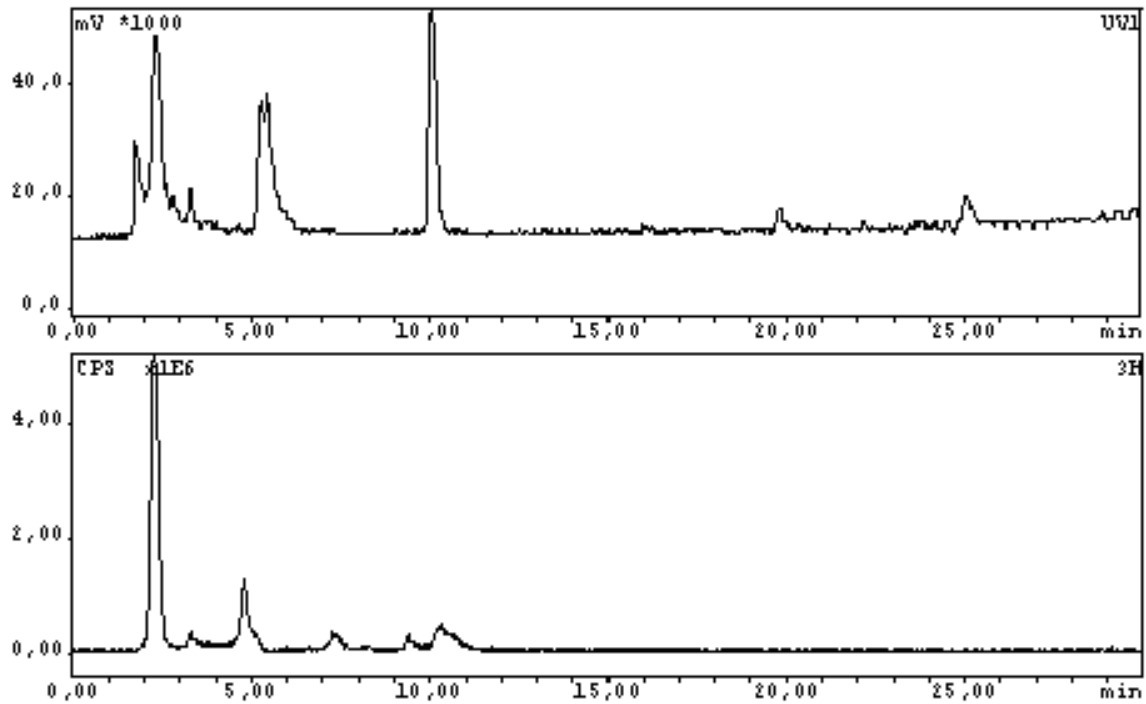


Abb. 22: HPLC von Re/Re-188-Carbonyl (mit einer Retentionszeit von 5 Minuten) oben im UV- und unten im Radioaktivkanal

5.2.2 $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})-\text{DHis-DLys-NOC}]$

Die Herstellung des stabilen Rhenium-Peptid-Komplexes gelingt mit diesem Verfahren wegen der drastischeren Bedingungen mit einer Ausbeute von nur 1,0 % bezogen auf $\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$. Verglichen mit der anfangs angesetzten Menge beziehungsweise Radioaktivität beträgt die Ausbeute nur 1,27 Promille. Die Retentionszeit des „stabil-markierten“ Peptids, liegt ähnlich wie die des Tc-99m-Peptids bei etwa 18,5 Minuten.

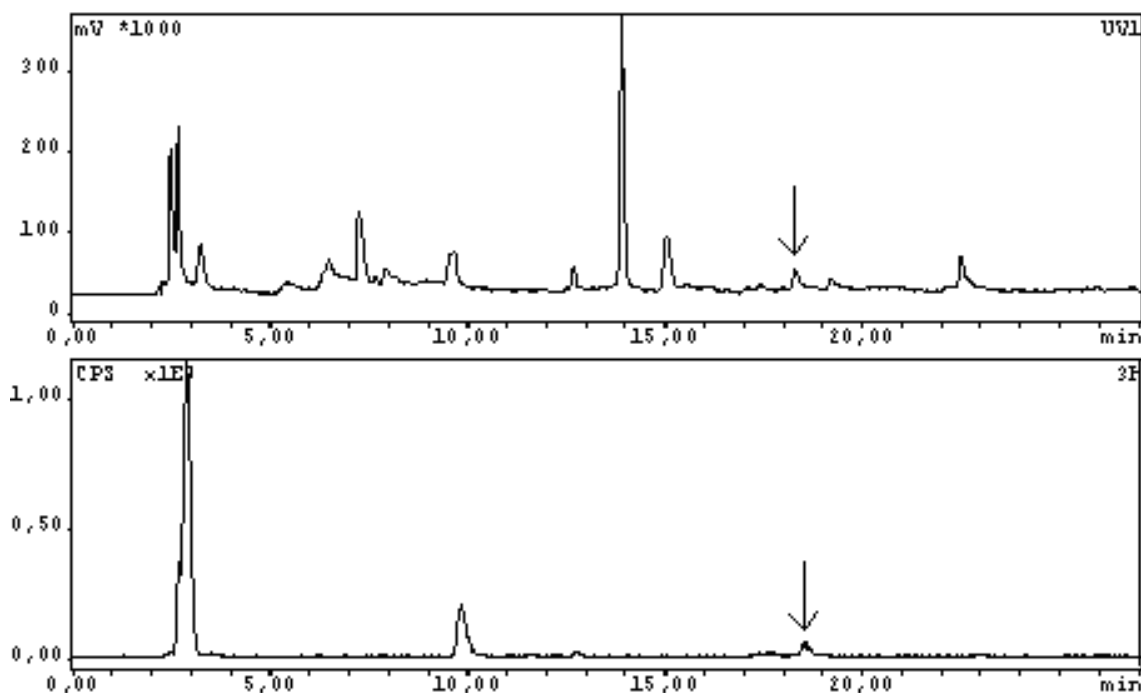


Abb. 23: $[\text{Re}^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})]$ -DHis-DLys-NOC (Retentionszeit 18,5 Minuten) nach Entschützung oben im UV- und unten im Radioaktivkanal

Durch Umrechnung der Ausbeute des radioaktiven Re-188 auf die Menge an stabilem Rhenium kann berechnet werden, dass cirka 1 nmol Re-Peptid in 1 ml 40 %-iger Acetonitrillösung enthalten ist, was einer Konzentration von etwa 1 μM entspricht. Diese Lösung wurde entsprechend mit Pufferlösung für Rezeptorbindungsstudien verdünnt, als die Radioaktivität weitgehend abgeklungen war. Die täglich durchgeführte DC-Kontrolle konnte keine Dissoziation des Re-Carbonyl-Peptidkomplexes nachweisen.

5.3 Rezeptorbindungsstudien

Die IC_{50} -Werte wurden für das geschützte DHis-DLys-NOC (zur negativen Kontrolle), das entschützte DHis-DLys-NOC, das DHis-DLys-DOTA-NOC, das DHis-DLys-TMSA-NOC, sowie für das $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})]$ -DHis-DLys-NOC bestimmt. Es ist in der Literatur akzeptiert, dass das Bindungsverhalten des rheniummarkierten Peptids weitgehend dem des Technetium-markierten

Peptids entspricht. Da wägbare Mengen an Tc-Peptid aufgrund der Trägerfreiheit des Technetiums nicht herstellbar sind und der extremen Langlebigkeit von Tc-99g (Grundzustand), welches auch nur schwer erhältlich ist, erfolgte die Herstellung des $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})]$ -DHis-DLys-NOC mit stabilem Rhenium. Dies gelingt mit dem im Kapitel 4.7.1 und 4.7.2 beschriebenen Verfahren. Die Rezeptoraffinität der untersuchten Peptidderivate zur Somatostatinrezeptor der Subgruppe 2 ist der Tabelle 11 zu entnehmen.

| Derivat | IC ₅₀ [nM] |
|----------------------------|-----------------------|
| Geschütztes DHis-DLys-NOC | >20000 |
| Entschütztes DHis-DLys-NOC | 2 |
| DHis-DLys-DOTA-NOC | 4,4 |
| DHis-DLys-TMSA-NOC | 4,8 |
| Re-Carbonyl-DHis-DLys-NOC | 35 |
| DOTA-TATE | 2,0 |

Tab. 11: Die synthetisierten DHis-DLys-NOC-Derivate mit Affinitätsprofil (IC₅₀) zu sstr2

5.4 Serumstabilität

Die Chromatogramme der analytischen Radio-HPLC der drei Tc-99m-markierten Peptide ($[\text{Tc}^{99\text{m}}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})]$ -Carbonyl-DHis-DLys-NOC, $[\text{Tc}^{99\text{m}}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})]$ -DHis-DLys-DOTA-NOC und $[\text{Tc}^{99\text{m}}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})]$ -DHis-DLys-TMS-NOC mit humanem Serum bei 37°C inkubiert) zeigen zu allen gewählten Zeitpunkten (1 h, 2 h, 4 h, 8 h und 24 h) ein unverändertes Signal mit den jeweiligen Retentionszeiten (18, 19 und 20 Minuten) an, welche den intakten Peptiden entsprechen. Ein repräsentatives Beispiel wird in Abbildung 24, die das $[\text{Tc}^{99\text{m}}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})]$ -DHis-DLys-NOC nach 24-stündiger Inkubation in humanem Serum anzeigt, gegeben.

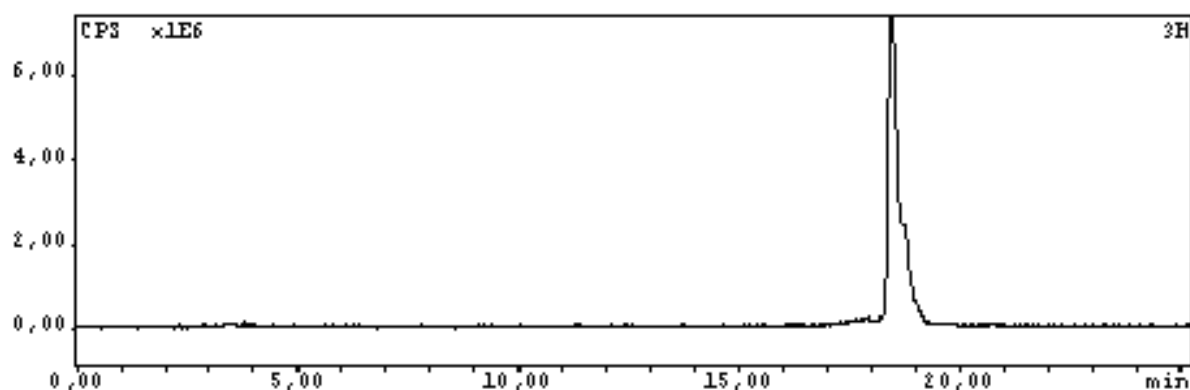


Abb. 24: [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})$]-DHis-DLys-NOC nach 24 h Inkubation im Serum. Es zeigt sich ein unverändertes solitäres Signal bei 19 Minuten, was für eine hohe Serumstabilität auch über 24 Stunden spricht.

Zusätzlich zur Stabilität wurde die Proteinbindung bestimmt. Das im Gammacounter gemessene Pellet zeigt eine Proteinbindung von 45 % nach 1 Stunde Inkubation bis maximal 53 % für das underivatisierte Peptid nach 24 Stunden in humanem Serum. 65 % – 75 % Proteinbindung wurden für das Tc-DOTA-Peptid, sowie 69 % – 80 % für das Tc-TMS-Peptid ermittelt. Die Proteinbindung nimmt im Laufe der Zeit bei allen 3 Verbindungen stetig zu. Tabelle 12 zeigt die Proteinbindung der untersuchten Peptide zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten, die Durchschnittswerte aller Messzeitpunkte (1h, 2h, 4h, 8h und 24h) können der Abbildung 25 entnommen werden.

| Derivat | 1 h | 2 h | 4 h | 8 h | 24 h |
|---|------|------|------|------|------|
| [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})$]-DHis-DLys-NOC | 45 % | 47 % | 48 % | 47 % | 53 % |
| [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})$]-DHis-DLys-DOTA-NOC | 65 % | 69 % | 71 % | 73 % | 75 % |
| [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})$]-DHis-DLys-TMS-NOC | 69 % | 74 % | 75 % | 77 % | 80 % |

Tab. 12: Proteinbindung der untersuchten technetiummarkierten Derivate nach 1, 2, 4, 8 und 24 Stunden Seruminkubation

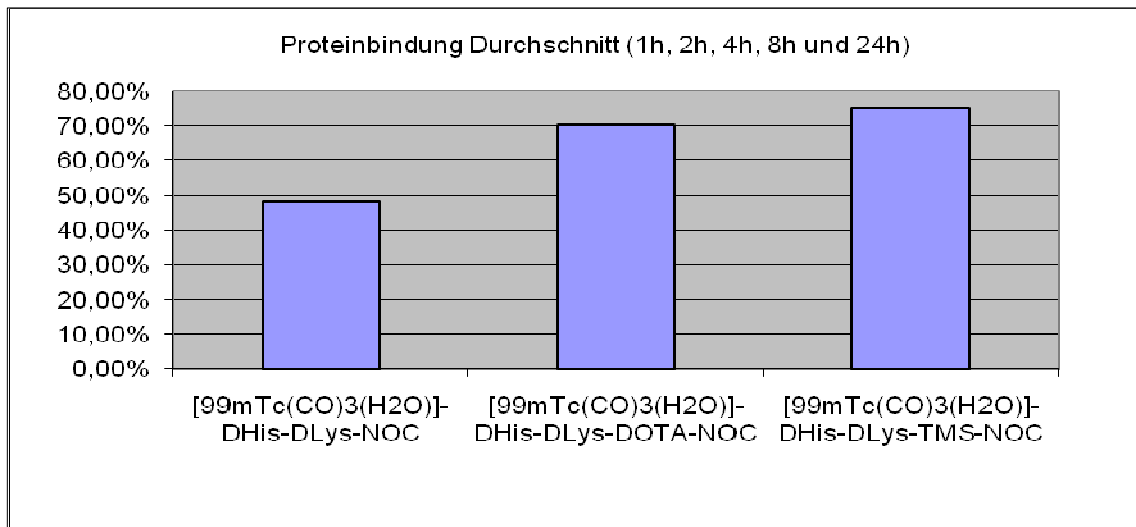


Abb. 25: Durschnittswerte aller Messzeitpunkte für die Proteinbindung der untersuchten technetiummarkierten Derivate

Der Durschnitt der Proteinbindung beträgt für das underivatisierte Peptid 48 %, das DOTA-derivatisierte Derivat 71 % und für das [^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)]-Carbonyl-DHis-DLys-TMS-NOC 75 %.

5.5 Biodistribution

Um die Organverteilung der Peptidderivate *in vivo* zu untersuchen, wurden tumorfreie Mäuse verwendet, die jeweils mit der zu untersuchenden Substanz in die Schwanzvene injiziert wurden. Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse der Biodistributionsuntersuchung für die radioaktiven Derivate tabellarisch und graphisch ausgewertet. Zudem wird für die einzelnen Derivate die Biokinetik ausgewählter Organe graphisch dargestellt.

5.5.1 [^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)]-DHis-DLys-NOC

Abbildung 26 zeigt die Bioverteilung des Peptids zu den gewählten Zeitpunkten und Abbildung 27 den Verlauf der Anreicherung in den Organen. Zusätzlich zeigt Tabelle 13 die Werte der in Abbildung 26 ausgewerteten Organe.

| Organ | 1 h | 4 h | 24 h |
|--------------|------------|------------|-------------|
| Herz | 4,70 % | 0,63 % | 0,92 % |
| Lunge | 13,80 % | 6,45 % | 4,00 % |
| Leber | 15,23 % | 6,82 % | 6,64 % |
| Milz | 6,37 % | 2,67 % | 1,48 % |
| Niere | 19,50 % | 9,46 % | 6,19 % |
| Magen | 11,83 % | 6,18 % | 4,70 % |
| Dünndarm | 4,94 % | 1,26 % | 2,23 % |
| Dickdarm | 2,34 % | 1,85 % | 3,49 % |
| Blut | 4,67 % | 0,30 % | 0,24 % |
| Muskel | 1,24 % | 0,41 % | 0,21 % |
| Knochen | 1,40 % | 2,02 % | 3,00 % |

Tab. 13: Tabellarische Auflistung der Bioverteilung des [^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)]-DHis-DLys-NOC

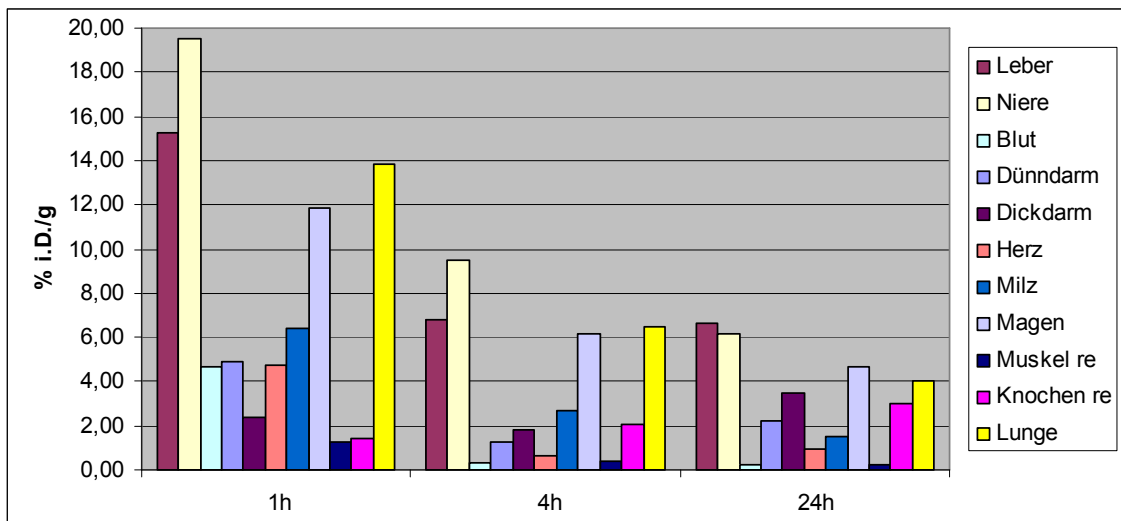


Abb. 26: Schematische Darstellung der Bioverteilung des $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})]$ -DHis-DLys-NOC

Sowohl an Tabelle 10 als auch an Abbildung 26 ist eine ausgeprägte Anreicherung in den Nieren, der Leber, der Lunge, im Herzen und im Blut zu erkennen. Im Gastrointestinaltrakt ist eine mittelmässige Traceranreicherung feststellbar. In Knochen und Muskel hingegen ist kaum Tracerakkumulation zu sehen.

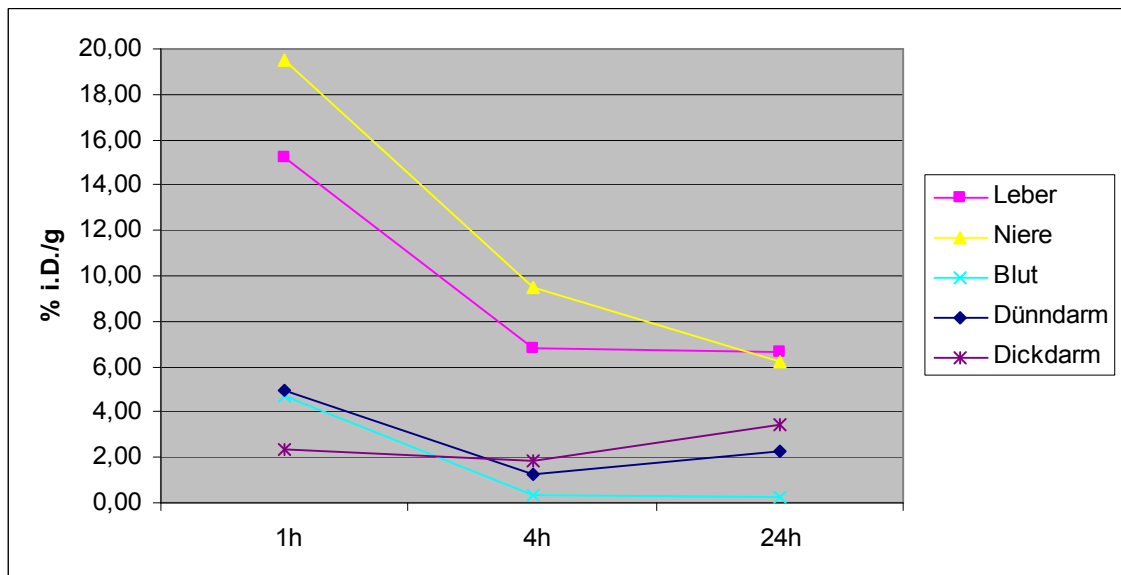


Abb. 27: Biokinetik über 24 Stunden der relevanten Organe (Leber, Niere, Blut, Dün- und Dickdarm)

Der stetigen Abnahme der Traceranreicherung in der Niere, der Leber und im Blut steht eine Zunahme der Aktivität im Darm gegenüber.

5.5.2 $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})\text{-DHis-DLys-TMS-NOC}$

Die Organverteilung des $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})\text{-DHis-DLys-TMS-NOC}$ in vivo kann Abbildung 28, sowie Tabelle 14 entnommen werden. Die Abbildung 29 zeigt wiederum den zeitlichen Verlauf der Tracerverteilung in einigen ausgewählten Organen.

| Organ | 1 h | 4 h | 24 h |
|----------|--------|--------|---------|
| Herz | 3,29 % | 2,11 % | 2,68 % |
| Lunge | 5,95 % | 3,93 % | 6,93 % |
| Leber | 6,96 % | 5,41 % | 7,33 % |
| Milz | 2,82 % | 2,02 % | 2,67 % |
| Niere | 9,77 % | 7,94 % | 10,3 8% |
| Magen | 2,38 % | 2,01 % | 3,96 % |
| Dünndarm | 1,98 % | 1,47 % | 3,08 % |
| Dickdarm | 1,20 % | 2,79 % | 6,93 % |
| Blut | 5,26 % | 2,19 % | 0,49 % |
| Muskel | 0,63 % | 0,52 % | 0,80 % |
| Knochen | 1,79 % | 1,02 % | 0,83 % |

Tab. 14: Tabellarische Übersicht der Bioverteilung des $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})\text{-DHis-DLys-TMS-NOC}$

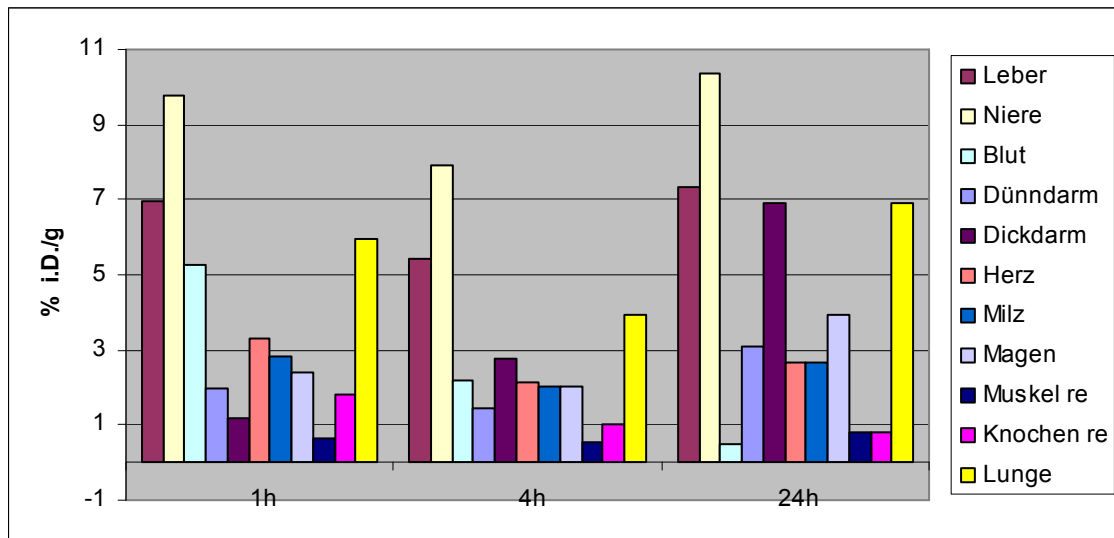


Abb. 28: Biodistribution nach 1, 4, und 24 Stunden des $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})]$ -DHis-DLys-TMS-NOC

Bei diesem Derivat sind ebenfalls hohe Aktivitäten in Leber, Lunge, Nieren, Blut und im Herzen festzustellen. Im Gastrointestinaltrakt findet sich erneut eine mittelmässige Tracerakkumulation. Muskel- und Knochengewebe reichern auch für dieses Derivat kaum an.

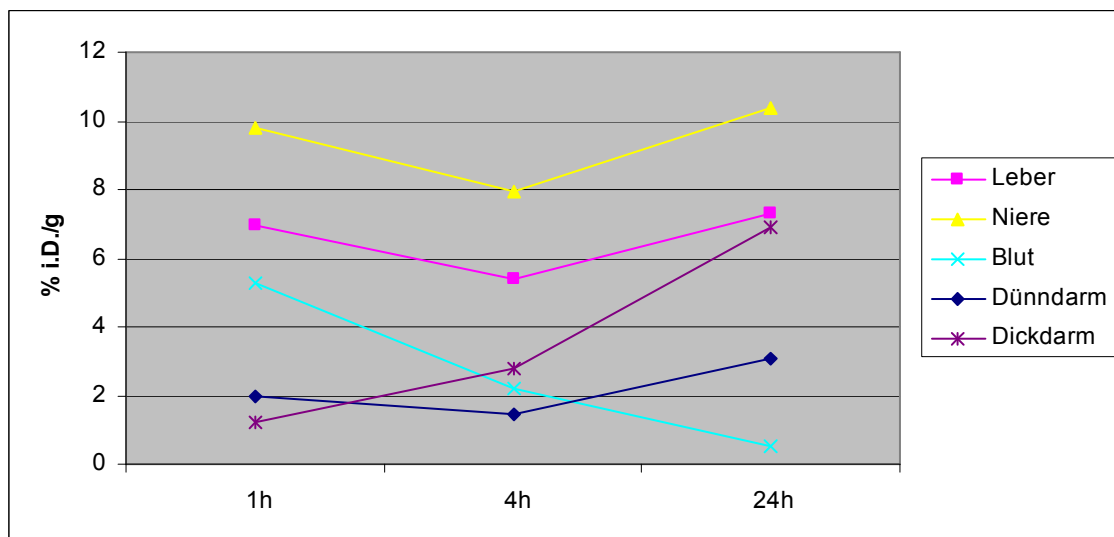


Abb. 29: Biokinetik über 24 Stunden der relevanten Organe (Leber, Niere, Blut, Dün- und Dickdarm)

Man beobachtet eine Zunahme der Aktivität in Nieren und in Leber zur späten Zeitpunkt (24 h), sowie erwartungsgemäss im Dickdarm. Zusätzlich ist eine leichte Zunahme der Anreicherung im Dünndarm zu sehen. Die Aktivität im Blut nimmt fast linear über den Zeitraum ab.

5.5.3 $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})]\text{-DHis-DLys-DOTA-NOC}$

Tabelle 15 und Abbildung 30 zeigen die Biodistribution des Tc-DOTA-Peptids, sowie Abbildung 31 die Kinetik in ausgewählten Organen.

| Organ | 1 h | 4 h | 24 h |
|--------------|------------|------------|-------------|
| Herz | 1,94 % | 3,79 % | 2,20 % |
| Lunge | 7,42 % | 9,38 % | 12,60 % |
| Leber | 5,81 % | 14,63 % | 9,96 % |
| Milz | 3,23 % | 5,29 % | 3,35 % |
| Niere | 12,27 % | 26,85 % | 20,69 % |
| Magen | 5,08 % | 5,80 % | 5,07 % |
| Dünndarm | 1,86 % | 3,10 % | 2,45 % |
| Dickdarm | 1,32 % | 4,29 % | 9,41 % |
| Blut | 3,24 % | 3,89 % | 1,80 % |
| Muskel | 1,13 % | 1,51 % | 0,26 % |
| Knochen | 1,26 % | 2,70 % | 1,93 % |

Tab. 15: Tabellarische Auflistung der Bioverteilung des $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})]\text{-DHis-DLys-DOTA-NOC}$

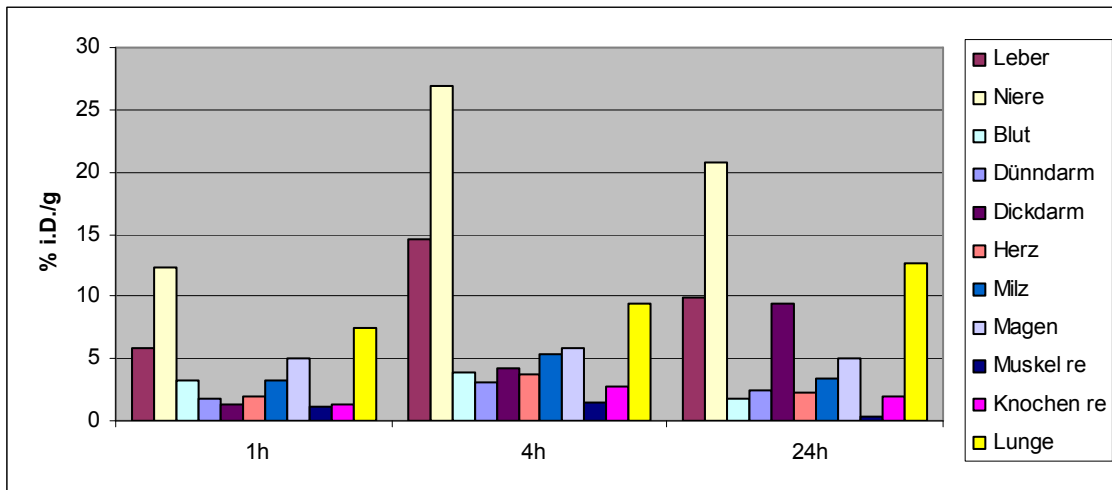


Abb. 30: Bioverteilung des $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})]$ -DHis-DLys-DOTA-NOC 1, 4 und 24 Stunden nach Injektion

Bei dem DOTA-derivatisierten Peptid sind eine ausgeprägte Anreicherung in den Nieren und eine relativ hohe Akkumulation in der Leber und in der Lunge festzustellen. Alle anderen Organe speichern $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})]$ -DHis-DLys-DOTA-NOC nur gering bis mässig.

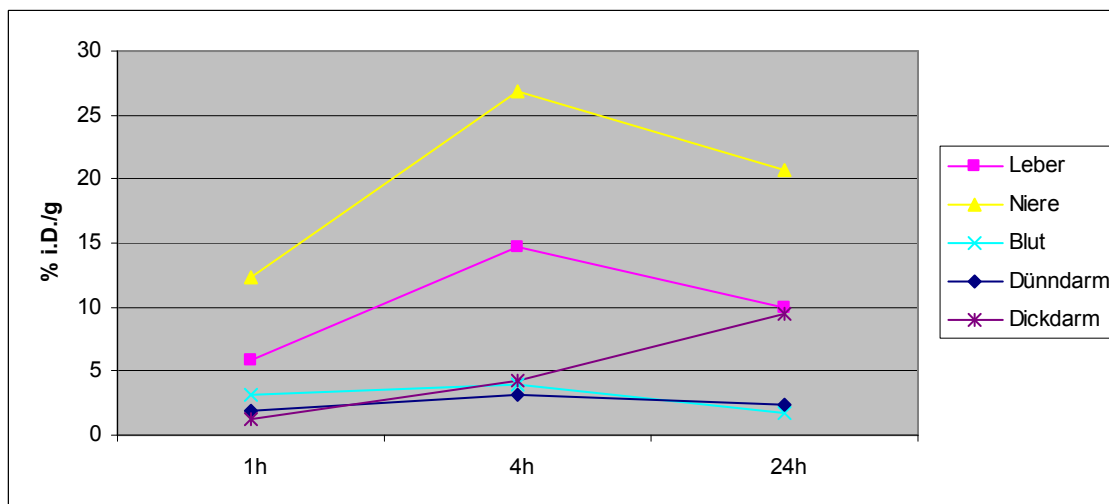


Abb. 31: Biokinetik über 24 Stunden der relevanten Organe (Leber, Niere, Blut, Dünndarm und Dickdarm)

In den Nieren, in der Leber und im Dünndarm ist zunächst eine Zunahme der Aktivität, die jedoch erwartungsgemäss wieder abnimmt, zu beobachten. Die zunehmende Tracerakkumulation im Colon ist durch Weitertransport und Ausscheidung zu erklären. Die Aktivität im Blut bleibt über den gesamten Untersuchungszeitraum weitgehend konstant.

5.5.4 DHis-DLys [¹⁷⁷Lu-DOTA]-NOC

Tabelle 16, sowie die Abbildungen 32 und 33 zeigen die Biodistribution des DHis-DLys [¹⁷⁷Lu-DOTA]-NOC, die Abbildung 34 und 35 die Kinetik in einigen ausgewählten Organen. Aufgrund der relativ hohen Anreicherung in den Nieren wurden diese in Abbildung 33 und 35 nicht berücksichtigt.

| Organ | 1 h | 24 h |
|----------|---------|---------|
| Herz | 0,54 % | 0,02 % |
| Lunge | 1,57 % | 0,50 % |
| Leber | 0,66 % | 0,50 % |
| Milz | 0,35 % | 0,21 % |
| Niere | 17,06 % | 17,62 % |
| Magen | 0,89 % | 1,00 % |
| Dünndarm | 1,86 % | 0,31 % |
| Dickdarm | 0,32 % | 2,43 % |
| Blut | 1,10 % | 0,02 % |
| Muskel | 0,32 % | 0,02 % |
| Knochen | 0,27 % | 0,11 % |

Tab. 16: Tabellarische Auflistung der Bioverteilung des [¹⁷⁷Lu]-DHis-DLys-DOTA-NOC

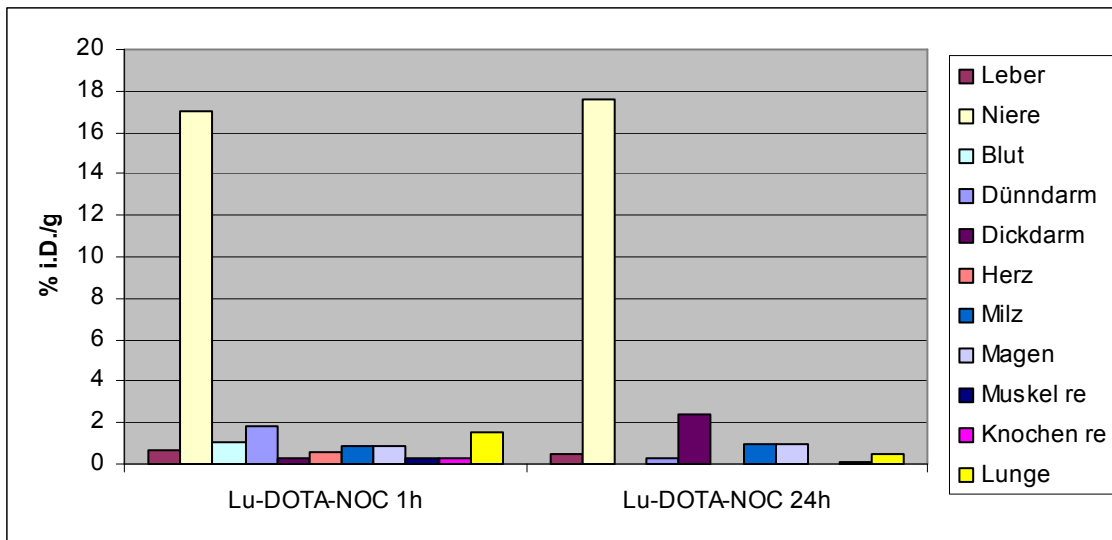


Abb. 32: Bioverteilung des DHis-DLys¹⁷⁷Lu-DOTA]-DOTA-NOC 1 und 24 Stunden p.i.

In dieser Abbildung wird die ausgeprägte renale Anreicherung dieses Derivats verdeutlicht, während die übrigen Organe im Vergleich nur eine spärliche Traceranreicherung zeigen.

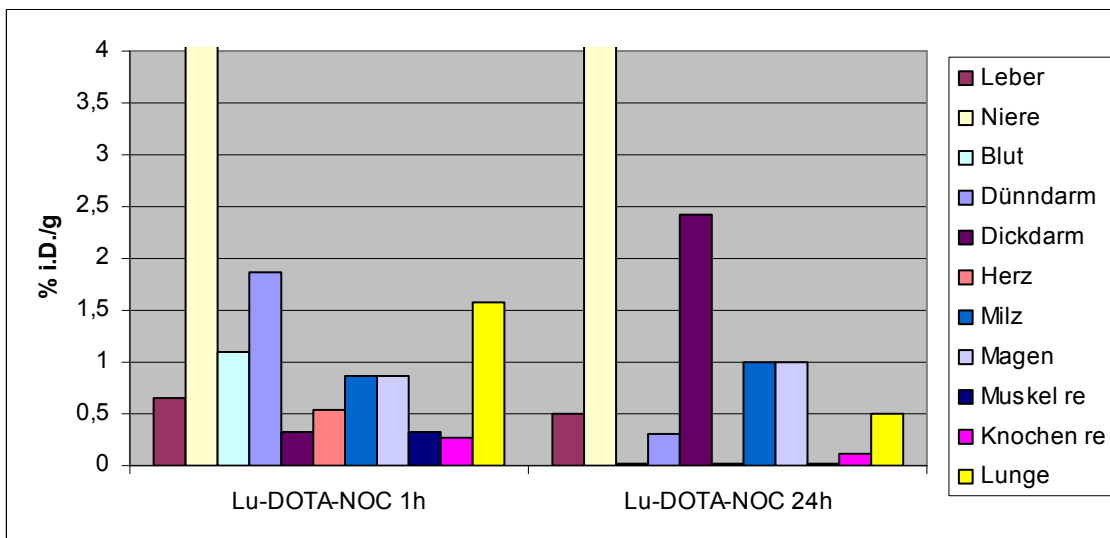


Abb. 33: Bioverteilung des DHis-DLys¹⁷⁷Lu-DOTA]-DOTA-NOC 1 und 24 Stunden nach Injektion. Die y-Achse ist aufgrund des ausgeprägten renalen Uptakes hier kleiner skaliert.

Bei diesem Peptid ist in Relation zu den übrigen Organen eine deutliche Traceranreicherung in den Nieren zu beobachten. Alle anderen Organe zeigen nur niedrige Aktivitäten auf, wobei von

diesen Organen die intestinalen in den Vordergrund rücken. Eine Tracerretention im Blut ist nicht festzustellen.

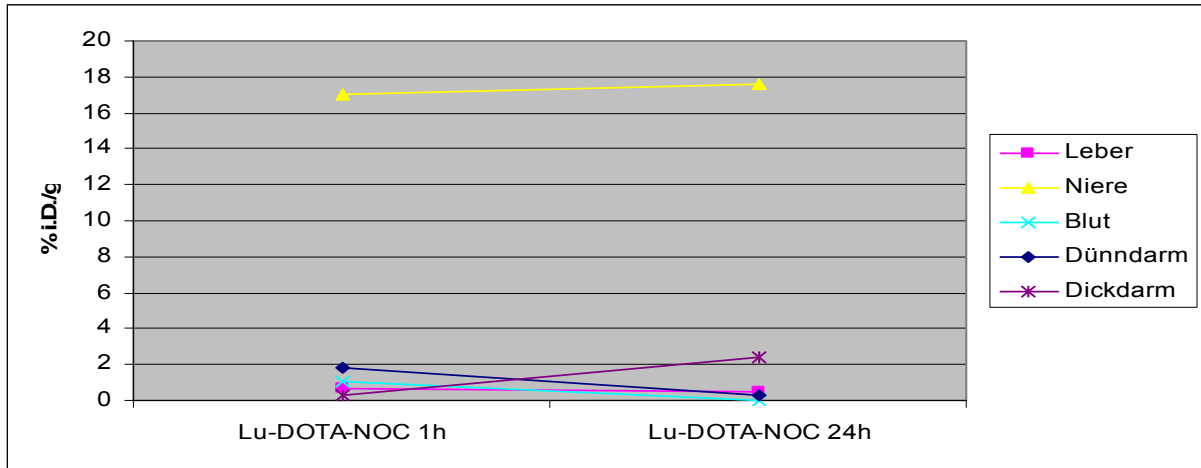


Abb. 34: Biokinetik des DHis-DLys[¹⁷⁷Lu-DOTA]-DOTA-NOC über 24 Stunden der relevanten Organe (Leber, Niere, Blut, Dün- und Dickdarm)

In dieser Abbildung ist eine deutliche Tracerretention in den Nieren zu sehen, sogar ist eine leichte Zunahme der renalen Aktivität festzustellen.

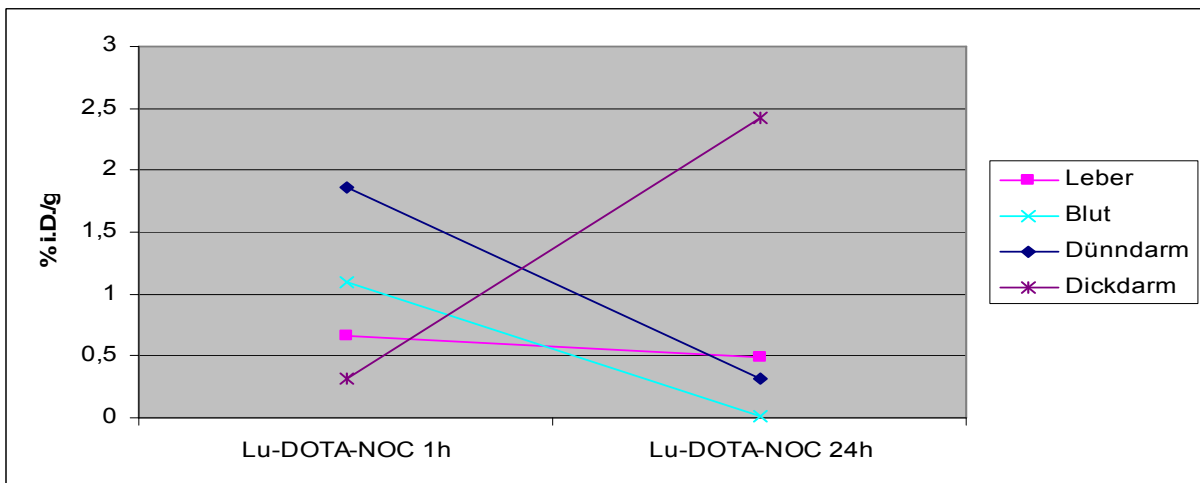


Abb. 35: Biokinetik des DHis-DLys[¹⁷⁷Lu-DOTA]-DOTA-NOC über 24 Stunden der relevanten Organe (Leber, Niere, Blut, Dün- und Dickdarm)

Die Aktivität im Dickdarm nimmt erwartungsgemäss zu, während die Aktivitäten in der Leber, im Dünndarm und im Blut fast linear abnehmen. Jedoch sind diese Werte im Vergleich zu den Nierenwerten sehr niedrig.

5.5.5 [¹⁷⁷Lu]-DOTA-TATE

Für das Präparat [¹⁷⁷Lu]-DOTA-TATE wurde die Verteilung nach 1 Stunde untersucht, um einen Vergleich mit einem in der klinischen Routine bewährten SS-Analogon zu erhalten. Abbildung 36 und Tabelle 17 zeigt die Verteilung dieses Tracers zum Zeitpunkt eine Stunde p.i.

| Organ | 1 h |
|--------------|------------|
| Herz | 0,18 % |
| Lunge | 6,63 % |
| Leber | 0,40 % |
| Milz | 4,44 % |
| Niere | 2,78 % |
| Magen | 4,27 % |
| Dünndarm | 1,52 % |
| Dickdarm | 1,32 % |
| Blut | 0,14 % |
| Muskel | 0,05 % |
| Knochen | 0,73 % |

Tab. 17: Tabellarische Darstellung der Bioverteilung des [¹⁷⁷Lu]-DOTA-TATE

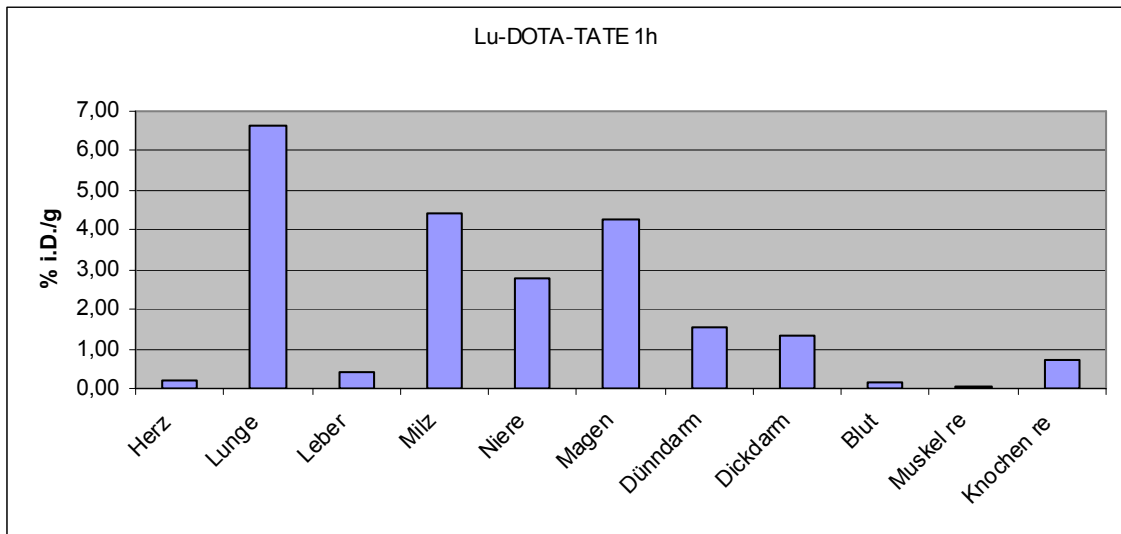


Abb. 36: Schematische Darstellung der Biodistribution des [^{177}Lu]-DOTA-TATE

Bei diesem Peptid sind zunächst hohe Anreicherungen in der Lunge, der Milz, im Magen und in den Nieren zu sehen. Die gastrointestinalen Organe Dün- und Dickdarm reichern nur mässig dieses Präparat an. Tracerakkumulationen im Blut oder in der Leber sind kaum vorhanden.

6 Diskussion

In diesem Kapitel werden die in dieser Arbeit vorgestellten Peptide ($[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})]$ -DHis-DLys-NOC, $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})]$ -DOTA-NOC, $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})]$ -TMS-NOC und DHis-DLys $[^{177}\text{Lu}$ -DOTA]-NOC) mit $[^{177}\text{Lu}]$ -DOTA-TATE, anderen gängigen Somatostatinanaloga sowie untereinander verglichen. Zu den Eigenschaften, die verglichen wurden, gehören Retentionszeit (Lipophilie), Biodistribution in Mäusen, Proteinbindung im Serum, Serumstabilität und Rezeptoraffinität. Zudem werden die einzelnen Synthesen und -schritte mit deren jeweiligen Besonderheiten und potentiellen Problemen diskutiert.

6.1 Radiochemische Verfahren

6.1.1 $[^{99m}\text{Tc}]$ -triaquatricarbonylkation

Die Herstellung des $[^{99m}\text{Tc}]$ -triaquatricarbonylkations gelingt hoch reproduzierbar, schnell und mit sehr hoher Ausbeute (>95 %). Radioaktivitäten von bis zu 20 GBq $[^{99m}\text{Tc}]$ -Pertechnetat wurde dabei untersucht.

Durch Zugabe von HCl wird das überschüssige Reduktionsmittel im Vial vernichtet, so dass keine Reduktion der Disulfidbrücke der Peptide bei den nachfolgenden Markierungen stattfindet. Der optimale pH-Wert (pH=7) für die Peptidmarkierung wird durch die Zugabe von Natriumbicarbonat erreicht. Dass keine Disulfidbrückenreduktion (Ringöffnung) stattgefunden hat, wird nochmals dadurch bestätigt, dass die Affinität des carbonylmarkierten Peptids zum sstr-Rezeptor im erwarteten nanomolaren Bereich gemessen wurde (siehe Kapitel 5.3).

6.1.2 $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})]$ -DHis-DLys-NOC

Die Markierung des Peptids mittels des $[^{99m}\text{Tc}]$ -triaquatricarbonylkations gelingt ebenfalls hoch reproduzierbar und mit sehr guter Ausbeute von über 95 %. Diese Ausbeute lässt sich auch bei

hoher eingesetzter Radioaktivität (bis zu 20 GBq) reproduzieren. Die Temperatur für diesen Reaktionsschritt wurde ohne Auswirkung auf die Ausbeute nach 30 Minuten Inkubationszeit zwischen 60 und 80°C variiert. Im Radiochromatogramm der Markierungslösung war neben Spuren von Pertechetat 1 Hauptpeak bei 23 Minuten beziehungsweise bei 19 Minuten nach Entschützung zu beobachten.

6.1.3 Konjugation mit DOTA-TFP-Ester

DOTA-TFP-Ester ist ein Aktivester und daher relativ hydrolyseempfindlich, weshalb die Reaktionen in wasserfreiem DMF durchgeführt wurden. Die sterisch gehinderte Base Pentamethylpiperidin (PMP) wurde hinzugefügt, um das Lysin² zu deprotonieren und somit Reaktivität gegenüber dem Aktivester zu erreichen. Diese Peptidmodifikation an Lysin² muss jedoch vor der Entschützung stattfinden, um zu verhindern dass das Lysin⁷ im Pharmakophor ebenfalls acyliert wird. Dies würde möglicherweise die Rezeptoraffinität des Peptids zu Nichte machen. Andererseits besteht auch die Gefahr, dass Histidin als Aminoterminus des Peptids ebenfalls konjugiert wird, falls die DOTA-Kopplung vor der Tc-Carbonylmarkierung durchgeführt wird. Wegen der deutlich höheren Reaktivität der Lysin-Aminogruppe ist diese Gefahr jedoch nur gegeben, wenn ein großer Überschuss an Aktivester vorliegt. Daher wird der DOTA-TFP-Ester unter HPLC-Kontrolle portionsweise zur Peptidlösung zugesetzt bis das Peptid zu annähernd 100 % mit DOTA konjugiert ist, was erst bei einem Mengenverhältnis von 4:1 (DOTA-TFP zu Peptid) der Fall ist. Die stark unterschiedlichen Basizitäten der Aminogruppen (ϵ -Amin) des Lysins und der endständigen Histidin (α -Amin) begünstigt dabei die Selektivität der Reaktion sehr stark ($\Delta pK_A \sim 3$). Die gute Markierbarkeit mittels des [^{99m}Tc]-triaquatricarbonylkations des DOTA-derivatisierten Peptids schließt die eventuelle unerwünschte Zweitkonjugation des Histidins mit DOTA ebenfalls weitgehend aus. Somit lässt der im HPLC entstandene Trippel-Peak am ehesten durch unterschiedliche Protonierungsgrade der Carboxylgruppen erklären.

Bei der Konjugationsreaktion entsteht naturgemäß Tetrafluorphenol (TFP) als Reaktionsprodukt des DOTA-TFP-Esters. TFP ist ein relativ lipophiles Molekül und ist mit Hilfe einer einfachen HR-P-Kartusche nicht von der Peptidlösung abzutrennen. Aufgrund seiner hohen Flüchtigkeit wird TFP aber zusammen mit dem Ethanol unter Vakuum praktisch quantitativ entfernt. Ein weit-

erer Beweis neben der nachweisbaren Verschiebung der Retentionszeit für die erfolgreiche DOTA-Konjugation zeigt sich durch die Markierbarkeit des Produkts mit Lutetium-177 (siehe Kapitel 5.1.7).

Weitere DOTA-Konjugationsversuche wurden mit DOTA-NCS mit ähnlichen Ausbeuten durchgeführt. Nachteilig für DOTA-NCS gegenüber DOTA-TFP waren größere erforderliche Mengen an Reagenz, deutlich längere Reaktionszeiten (90-120 Minuten) und zwingend erhöhte Temperaturen. Konjugationsversuche mit DOTA-NHS-Ester waren sämtlich nicht erfolgreich. Deswegen ist die Konjugation mit dem DOTA-TFP-Ester unter den untersuchten Methoden die schnellste und gleichzeitig schonendste für die Konjugation des Peptids mit DOTA.

6.1.4 Konjugation mit Trimellitsäureanhydrid (TMSA)

Analog der DOTA-Konjugation findet auch diese Derivatisierung vor der Entschützung statt. Das TMSA reagiert gleichfalls mit dem deprotonierten Lysin² unter ähnlichen Reaktionsbedingungen wie bei der DOTA-Konjugation. Auch bei der TMSA-Derivatisierung besteht die Gefahr der Histidinkonjugation, falls die Reaktion vor der Tc-Markierung durchgeführt wird. Daher wurde auch hier unter HPLC-Kontrolle und portionierter TMSA-Zugabe gearbeitet. Eine vollständige Konjugation des Peptids konnte erst bei einem Mengenverhältnis von 8:1 (TMSA zu Peptid) festgestellt werden.

Die scheinbare erhöhte Lipophilie dieses Derivates im Chromatogramm lässt sich durch die saure Laufmittellösung (0,1 % TFA) relativieren. Dadurch liegen bei der Chromatographie die eingeführten Carboxylgruppen ungeladen vor. In Vivo ist der pH-Wert aber im neutralen Bereich und somit liegen die Carboxylgruppen eher deprotoniert vor und das Peptid bekommt wieder zusätzliche Ladungen und wird somit etwas hydrophiler.

6.1.5 Abspaltung der Dde-Schutzgruppe

Die Abspaltung der Dde-Schutzgruppe mittels Hydrazinolyse erfolgt bei Raumtemperatur schnell (20 Minuten) und vollständig.

Bedingt durch die potentiell reduzierenden Eigenschaften des Hydrazins besteht theoretisch die Gefahr, dass die Disulfidbrücke des Peptids gespalten wird, falls zu viel Hydrazin zugesetzt wird oder die Lösung zu lange inkubiert. Deswegen müssen die entschützten Peptide immer zügig nach der Entschützung aufgereinigt werden. Eine weitere potentielle Reaktionsmöglichkeit ist, dass das Hydrazin den Wasserliganden des Tc-Carbonyls verdrängt und somit zu einer weiteren Änderung des Peptids beiträgt. Diese Reaktionsalternative besteht jedoch nur, wenn die Entschützung nach der Tc-Markierung stattfindet (Weg 1). Diese potentielle Reaktionsmöglichkeit kann durch die identischen Retentionszeiten der Peptide unabhängig vom Syntheseweg (Weg 1 oder Weg 2) unter diesen Reaktionsbedingungen jedoch weitgehend ausgeschlossen werden.

6.1.6 Aufreinigung der Peptide

Durch eine Aufreinigung der Tc-markierten Peptide mittels C-18-light- (Waters) beziehungsweise HR-P-Kartuschen (Macherey/Nagel) geht etwa 20-30 % der Aktivität durch unspezifische Bindung, meist im Reaktionsvial aber auch an Spritzen und in der Kartusche selbst verloren. Diese hohe unspezifische Bindung könnte mit der relativ hohen Lipophilie der technetiummarkierten Peptide zusammenhängen, da solch hohe Verluste bei DHis-DLys[¹⁷⁷Lu-DOTA]-NOC nicht in dem Ausmaß zu beobachten waren. Wie die Chromatogramme auch zeigen, ist das DHis-DLys[¹⁷⁷Lu-DOTA]-NOC deutlich hydrophiler als die Technetiumderivate. Eine Möglichkeit die Verluste im Vial durch unspezifische Bindung zu verringern ist die Peptide mittels Essigsäure angesäuertem (pH = 5) Wasser zu verdünnen und das Vial mehrfach mit dieser Lösung zu spülen. Dadurch sinkt der Verlust durch unspezifische Bindung von etwa 20-30 % auf 15-20 %. Dieser Verlust ist aber dennoch signifikant und muss bei der Synthesepaltung berücksichtigt werden.

6.1.7 Herstellung des Rheniumtriaquatricarbonylkations

Bei dieser Synthese stand die Herstellung eines geträgerten und somit quantifizierbaren Mengen an Rheniumtriaquatricarbonyl für eine spätere Peptidmarkierung im Mittelpunkt. Da dies mittels Technetiums nicht möglich ist, erfolgte die Carbonylsynthese mittels des mit Technetium chemisch eng verwandten Rheniums. Zwecks stöchiometrischer Berechnungen wurde eine bestimmte Menge an stabilem Rhenium zusammen mit einer geringen Menge radioaktives Rhenium-188 zur Reaktionsverfolgung mittels Radio-HPLC zur Herstellung des Carbonylkomplexes benutzt. Das Rheniumcarbonyl lässt sich mit für die in dieser Arbeit erforderlichen Zwecke in zufriedenstellender Ausbeute und Menge herstellen. Durch Aufreinigung des Produktes mittels HPLC werden die unerwünschten Substanzen in der Reaktionslösung, wie reduziertes Perrhenat und freies Rhenium, entfernt. Durch eine relativ hohe eingesetzte Stoffmenge beziehungsweise Radioaktivität am Syntheseanfang ist die suboptimale Ausbeute trotzdem ausreichend für die Durchführung der anschließenden Peptidmarkierung. Durch Zusatz von Ascorbinsäure zum Produkt lässt sich die Reoxidation des Produktes zu Perrhenat verhindern.

Da in dieser Arbeit das Rheniumcarbonyl nur für die Herstellung einer ausreichenden Menge an quantifizierbarem rheniumcarbonylderivatisiertem Peptid für Rezeptorbindungsversuche synthetisiert wurde, wurde auf eine Reaktionsoptimierung verzichtet.

6.1.8 Herstellung von $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})]$ -DHis-DLys-NOC

Die Herstellung des $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})]$ -DHis-DLys-NOC erfolgte zum Zweck von Rezeptorbindungsstudien der in dieser Arbeit Tc-Carbonylmarkierten Peptide. Da quantifizierbare Mengen an Technetiummarkierten Peptiden aufgrund deren Trägerfreiheit nicht herstellbar sind, ist es in der Literatur allgemein akzeptiert, das chemisch eng verwandte Element Rhenium an Stelle des Technetiums einzusetzen. So lässt sich eine quantifizierbare Peptidmenge synthetisieren, die wiederum das pharmakologische Verhalten eines Technetiummarkierten Peptids hinsichtlich Rezeptorbindungsvermögens weitgehend widerspiegelt. Hauptsächlich sollte diese Untersuchung

nachweisen, dass die Disulfidbrücke nicht durch die im Kapitel 3 beschriebenen Synthesebedingungen gespalten wird, da dies zu einem starken Verlust an Rezeptoraffinität führen würde.

Durch die bekannte eingesetzte Menge an stabilem Rhenium am Anfang der Reaktion, sowie der bekannten Radioaktivität an Rhenium-188 am Anfang der Reaktion lässt sich die entstandene Menge an $[\text{}^{188}\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})]$ -DHis-DLys-NOC und somit die Konzentration an stabilem $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})]$ -DHis-DLys-NOC bequem aus der Aktivität berechnen. Dies war unentbehrlich für die Bestimmung des Rezeptorbindungsverhaltens des Carbonylmarkierten Somatostatinanalogons.

Die Peptidmarkierung mittels des Re-Carbonylkations gelang zwar nur mit einer Ausbeute von etwa 1,0 %, sogar mit langen Inkubationszeiten und hohen Temperaturen bis 80°C ließ sich die Ausbeute nicht relevant erhöhen. Die geringe Ausbeute ist am ehesten bedingt durch das relativ zu Technetium inerte Rhenium. Die geringe Ausbeute könnte auch zum Teil durch die relativ hohe Menge an stabilem Perrhenat in der Reaktionslösung bedingt sein. Da die Synthese nur Zwecks Herstellung eines quantifizierbaren Carbonylmarkierten DHis-DLys-NOC-Peptids erfolgte, wurde in dieser Arbeit trotz geringer Ausbeute auf eine weitere Reaktionsoptimierung verzichtet. Die täglich durchgeführten DC-Kontrollen des rheniummarkierten Peptids konnte eine Dissoziation des Re-Carbonyl-Peptidkomplexes weitgehend ausschließen.

6.1.9 DHis-DLys[^{177}Lu -DOTA]-NOC

Dieses Derivat wurde aus zweierlei Gründen hergestellt. Einerseits zeigt die gelungene Markierung mit Lu-177 die erfolgreiche Konjugation des Peptids mit DOTA an, andererseits ermöglicht dieses Derivat eine Aussage über die Auswirkung der Einführung der Tc-Carbonylgruppe auf die Biodistribution.

Das Lutetium-177-markierte Peptid deutet mit der kürzeren Retentionszeit (15 Minuten) an, dass es etwas hydrophiler als das Tc-Carbonylmarkierte DOTA-Derivat ist. Jedoch wird unter den gewählten Chromatographiebedingungen ein Doppelpeak gesehen. Dies könnte, wie im Kapitel

5.1.7 beschrieben, durch die Entstehung von Diastomeren durch eine unterschiedliche Konfiguration der Carboxylgruppen des Lu-DOTA-Komplexes erklärt werden.

Die unter den gewählten Bedingungen erhaltene Markierungsausbeute ist hauptsächlich durch die geringe eingesetzte Peptidmenge relativ zur Lutetiummenge zu erklären. Wegen der relativ niedrigen spezifischen Aktivität des Lutetium-177 (569,8 GBq/mg) war ein Überschuss an Lutetium in der Markierungslösung. Eine weitere Verunreinigung war die Bildung von freiem nicht an Peptid gekoppeltem Lu-177-DOTA. Durch Aufreinigung mittels HR-P-Kartuschen wurde die Peptidlösung von ungebundenem Lu-177 und Lu-177-DOTA befreit.

6.2 Rezeptorbindungsstudien

Die Werte für die sstr2-Affinität der untersuchten Derivate entsprechen weitgehend den in der Literatur angegebenen Werten (Reubi et al., 2000) für strukturell ähnliche SS-Analoga. In Tabelle 18 sind Werte aus der Literatur zu entnehmen. Tabelle 19 zeigt die gemessenen Werte an, die mit dem unter 4.8.2 beschriebenen Verfahren ermittelt wurden. Zur Positivkontrolle des Verfahrens, wurde auch die verfügbaren Peptide DOTA-TATE und SS-14 auf Rezeptoraffinität untersucht. Diese Werte liegen mit 1,5 nM (DOTA-TATE) beziehungsweise 0,15 nM (SS-14) in der Literatur und 2,0 nM (DOTA-TATE) beziehungsweise 0,2 nM (SS-14) mit unserem Verfahren nahe beieinander und zeigen dass mittels des in dieser Arbeit benutzten Verfahrens, plausible Werte für die Rezeptoraffinität der Derivate erzielt wurden.

| Peptid | IC ₅₀ [nM] |
|-------------------------------|-----------------------|
| Somatostatin-28 | 2,7 ± 0,3 |
| Octreotid | 0,54 ± 0,08 |
| DOTA-Octreotid | 14 ± 3 |
| DOTA-[Tyr] ³ -OC | 14 ± 2,6 |
| [Tyr] ³ -OC | 2,1 ± 1,0 |
| DOTA-Lanreotid | 26 ± 3,4 |
| DOTA-[1-Nal] ³ -OC | 3,3 ± 0,2 |
| DOTA-TATE | 1,5 ± 0,4 |
| Somatostatin-14 | 0,15±0,02 |

Tab. 18: Affinitätsprofil (IC₅₀) zu sstr2 von Somatostatin-28 und gängigen Octreotidanaloga

| Derivat | IC ₅₀ [nM] |
|----------------------------|-----------------------|
| Geschütztes DHis-DLys-NOC | > 20000 |
| Entschütztes DHis-DLys-NOC | 2 |
| DHis-DLys-DOTA-NOC | 4,4 |
| DHis-DLys-TMS-NOC | 4,8 |
| Re-Carbonyl-DHis-DLys-NOC | 35 |
| DOTA-TATE | 2,0 |
| Somatostatin-14 | 0,2 |

Tab. 19: Affinitätsprofil (IC₅₀) zu sstr2 Somatostatin-14, DOTA-TATE und unterschiedlichen DHis-DLys-NOC-Derivaten

Die gemessenen Werte der Peptide stimmen mit den Literaturwerten gut überein. Ein Verlust an sstr2-Rezeptoraffinität um etwa einen Faktor 10 durch die Re-Carbonylgruppe ist jedoch festzustellen. Wieso diese vom Pharmakophor relativ weit entfernte Modifikation eine herabgesetzte Rezeptoraffinität zu Folge hat, kann möglicherweise durch die erhöhte Lipophilie und damit verbundene erhöhte unspezifische Bindungsphänomene erklärt werden.

Jedoch besitzt das praktizierte Zentrifugeverfahren einige Nachteile, die darin bestehen, dass viele von einander unabhängige Variable, das Untersuchungsergebnis beeinflussen können. Die Zentrifugierzeit muss pro Assay gleich bleiben, es muss immer gleich viel aus dem Glas abpipettiert werden. Zudem führt die sukzessive Liganden-Verdünnung im Glas pro Waschrunde zu einer Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts zugunsten einer Dissoziation des Liganden vom Liganden/Rezeptorkomplex. Dadurch werden eventuell weniger gebundene Counts gemessen als initial tatsächlich gebunden waren.

Ausreißer wurden durch eine hohe Anzahl an durchgeführten Assays pro Konkurrentkonzentration erkannt und somit konnte diese Fehlerquellen relativ gering gehalten werden. Nicht desto trotz ist das Zentrifugierverfahren fehlerbelastet, aber mit anderen prinzipiell möglichen Verfahren, wie Filtration mittels Glasfaserfilter (GF/C Whatman) oder Sterilfilter, sowie Trennung nach Molekülgröße mittels Gelchromatographie konnten hier keine plausiblen beziehungsweise reproduzierbaren Werte erzielt werden. Die Werte in Tabelle 16 sind Durchschnittswerte (drei Assays pro Konkurrentkonzentration, insgesamt drei Messungen pro Derivat) von insgesamt neun durchgeführten Messungen pro Konkurrentkonzentration.

6.3 Serumstabilität/ Proteinbindung

Da die durchgeführten HPLC-Kontrollen der drei auf Serumstabilität geprüften technetiummarkierten Derivate über den gesamten Untersuchungszeitraum (1 h-24 h) Peaks mit unveränderten Retentionzeiten und keine neu aufgetretenen sonstigen Peaks zeigten, kann davon ausgegangen werden, dass die Peptide im Blutserum über 24 Stunden stabil bleiben und nicht oder nur sehr langsam im Blut abgebaut werden.

Tabelle 20 zeigt die Proteinbindung der drei untersuchten Peptide nach 4 h Seruminkubation und Literaturwerte für die Proteinbindung im Blut für [^{99m}Tc]-EDDA-HYNIC-TOC sowie für [^{177}Lu]-DOTA-TATE.

| | | | | |
|--|--|---|---|--|
| $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})]$ - DHis-DLys- DOTA-NOC (4h inkubiert) | $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})]$ - DHis-DLys- DOTA-NOC (4h inkubiert) | $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})]$ - DHis-DLys-TMS- NOC (4h inkubiert) | $[^{99m}\text{Tc}]$ - EDDA- HYNIC-TOC (Decristoforo et al., 2000) | $[^{177}\text{Lu}]$ - DOTA- TATE (Pawlak et al.) |
| 48,6 % | 70,6 % | 74,7 % | < 10 % | 4 % |

Tab. 20: Proteinbindung von den drei technetiummarkierten Peptiden, $[^{99m}\text{Tc}]$ -EDDA-HYNIC-TOC und $[^{177}\text{Lu}]$ -DOTA-TATE nach 4h Seruminkubation

Verglichen mit dem $[^{99m}\text{Tc}]$ -EDDA-HYNIC-TOC ist eine signifikant höhere Proteinbindung bei allen drei Tc-Carbonyl-Derivaten zu sehen. Diese Eigenschaft ist am ehesten auf den freien Wasserliganden im bidentaten Tc-Carbonylrest zurückzuführen.

Die mit der Zeit zunehmende Proteinbindung ist kein Zufallsbefund, da dies bei allen drei Derivaten der Fall war. Bemerkenswert ist aber dass die technetiummarkierte DOTA-Verbindung höhere Werte aufweist als das underivatisierte Peptid. Da das DOTA-Derivat hydrophiler ist, wäre eine niedrigere Proteinbindung zu erwarten gewesen. Dies könnte an dem freien nicht mit Metall belegtem DOTA-Rest liegen, der eventuell unspezifisch mit unterschiedlichen Proteinen und Metallen Wechselwirkung im Serum hat. Eine Möglichkeit dies zu untersuchen wäre das DOTA vor der Seruminkubation vollständig mit zum Beispiel stabilem Lutetium zu komplexieren und erneut die Proteinbindung zu untersuchen.

6.4 Biodistribution

Bei den Biodistributionsuntersuchungen ist zu beachten, dass die Messungen sehr anfällig für Kontamination sind, da mit sehr wenig Radioaktivität gearbeitet wird. Es zeigten sich auch Unterschiede in der Bioverteilung der Tiere, die mit demselben Derivat injiziert wurden. Vieles lässt sich mit biologischer Variabilität erklären, aber auch spielt beispielsweise die Füllung des

Magen-Darmtraktes bei der Gewichtsmessung und folglich auf die Werte, diese in %i.D./g angegeben, eine signifikante Rolle. Diese Störfaktoren wurden minimiert beziehungsweise gemittelt indem drei Mäuse pro Substanz und Zeitpunkt eingesetzt wurden. Die folgenden Abbildungen (37, 38 und 39) geben einen Überblick über die Bioverteilung des jeweiligen untersuchten Derivats zu den gewählten Zeitpunkten (1 h, 4 h und 24 h).

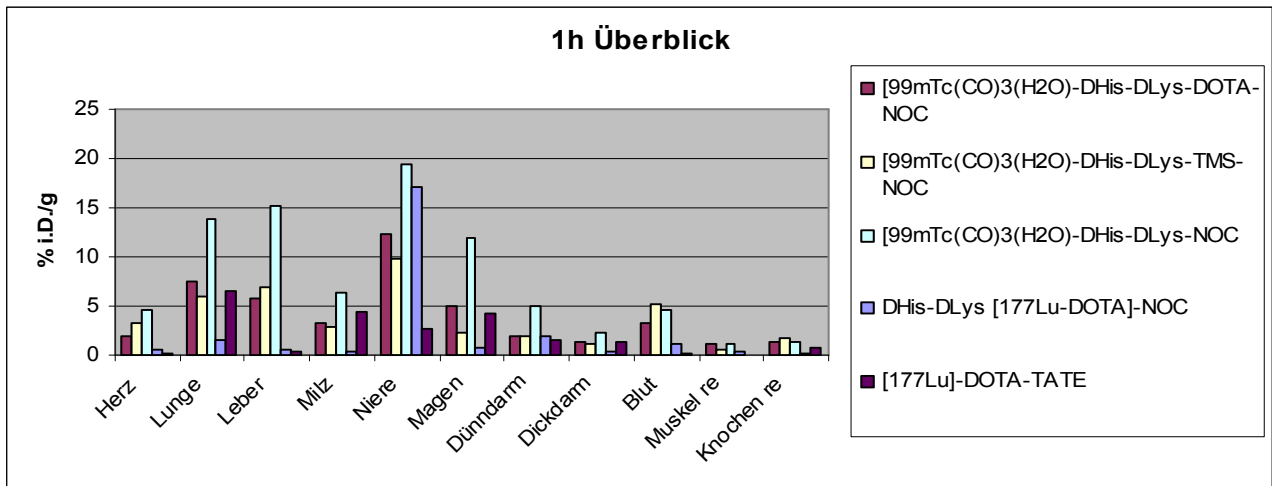


Abb. 37: Schematische Darstellung der Biodistribution aller untersuchten Derivate 1 Stunde nach Injektion

Insgesamt sieht man in der Bioverteilungsuntersuchung 1h nach Injektion des Tracers bei den Tc-Carbonylmarkierten Derivaten im Vergleich zu den mit Lu-177-markierten Peptiden eine höhere Anreicherung in den gastrointestinalen Organen, im Herz und im Blut. Weiterhin ist die deutliche renale Anreicherung des DHis-DLys^{[177Lu-DOTA]-NOC} zu erkennen.

Die Unterschiede zwischen ^{[177Lu]-DOTA-TATE} und DHis-DLys-^{[177Lu-DOTA]-NOC} lassen sich möglicherweise durch die zusätzlichen positiven Ladungen am Histidin erklären. Auch ergibt sich eine zusätzliche positive beziehungsweise negative Ladung weniger. Es ist bekannt dass positive Ladungen zur Nierenretention beitragen (Trejtnar et al., 2000; Trejtnar und Laznicek, 2002; Lepsy et al., 2003; Tett et al., 2003; Feng et al., 2010) und diese könnten somit eine plausible Erklärung für die festgestellten Unterschiede der lutetiummarkierten Peptide darstellen.

Nach 4 Stunden ist die Bioverteilung aller Tc-Carbonylmarkierter Derivate weiterhin relativ ähnlich. Lediglich bei dem DOTA-konjugierten Peptid ist eine vergleichsweise hohe renale Aktivität zu beobachten. Anzumerken ist, dass zu diesem Zeitpunkt eine generell hohe $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})]$ -DHis-DLys-DOTA-NOC-Speicherung in allen Organen zu sehen ist. Dennoch ist das Verteilungsmuster dieses Derivates nicht entscheidend anders die der beiden anderen untersuchten Tc-Carbonylmarkierten Derivaten. In Abbildung 38 ist die Biodistribution der Tc-99m-markierten Peptide 4 Stunden p.i. abgebildet.

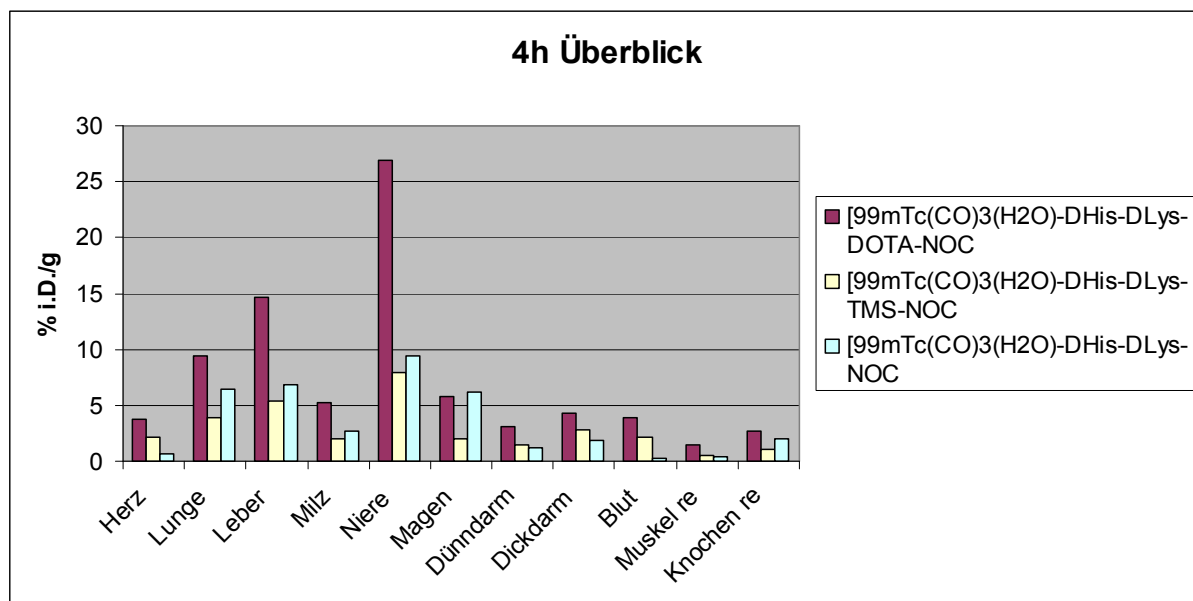


Abb. 38: Schematische Darstellung der Biodistribution aller technetiummarkierten Derivate 4 Stunden nach Injektion

Die Verteilungsmuster der Tc-Carbonylmarkierten Derivate blieben auch nach 24 Stunden gegenüber den 4 Stunden Werten im allgemeinen unverändert. Es ist weiterhin eine relativ hohe Anreicherung in den Nieren und auch im Gastrointestinaltrakt festzustellen. Bei dem DHis-DLys $[^{177}\text{Lu-DOTA}]$ -NOC ist erneut eine hohe renale Retention zu sehen, die sich über den Untersuchungszeitraum nicht wesentlich geändert hat. Ein Überblick über die Bioverteilung der Tc-99m-markierten Derivate und des $[^{177}\text{Lu}]$ -DOTA-NOC-Peptides 24 Stunden nach Injektion ist in Abbildung 39 abgebildet.

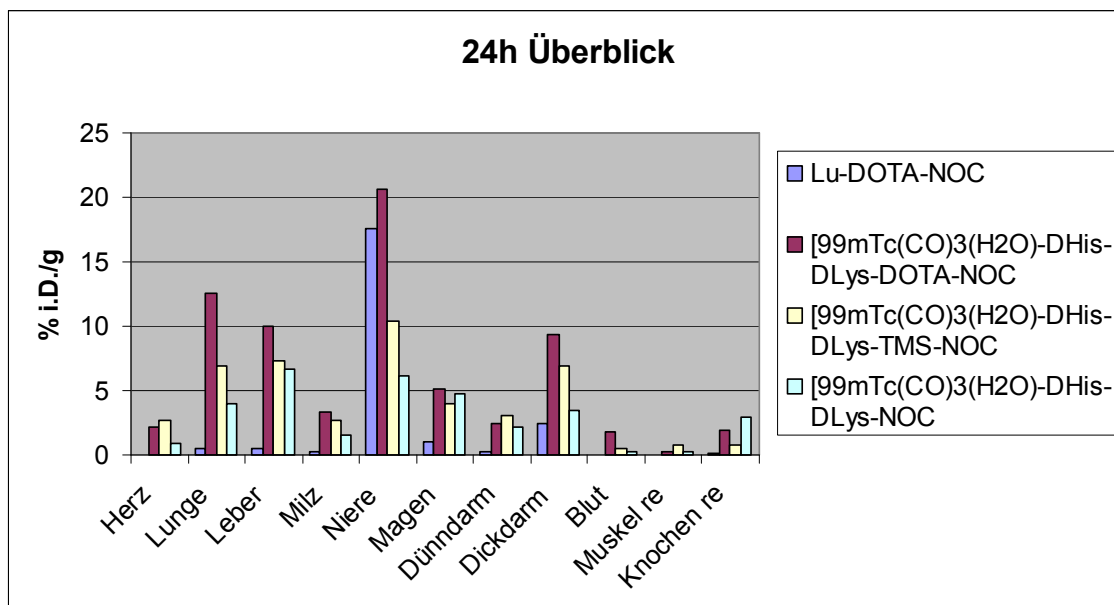


Abb. 39: Biodistribution der Tc-99m-markierten Derivate und DHis-DLys[¹⁷⁷Lu-DOTA]-NOC 24 Stunden nach Injektion

Insgesamt zeigen die Bioverteilungsuntersuchungen dass die Konjugation mit DOTA beziehungsweise TMSA die erhöhte Lipophilie bedingt durch die Einführung des Tc-Carbonyls nicht kompensieren oder relevant ändern kann.

6.5 Vergleich der hergestellten SS-Analoga untereinander und mit literaturbekannten Verbindungen

6.5.1 [^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)]-DHis-DLys-NOC

Bei diesem Derivat belegt zwar die renale Elimination einen höheren Anteil als die hepatobiliäre Ausscheidung, aber im Vergleich mit den beiden anderen technetiummarkierten Derivaten, ist es das Derivat, was im Relation zum Leberanteil am wenigsten über die Niere ausgeschieden wird. Weiterhin ist eine niedrigere Retention im Blut, als bei dem DOTA- beziehungsweise TMS-Derivat, zu sehen. Dies hängt wahrscheinlich mit der niedrigeren Proteinbindung dieses Derivates zusammen. Tabelle 21 zeigt einen Vergleich dieses Derivates mit zwei weiteren literaturbeschriebenen Somatostatinanaloga jeweils 4 Stunden p.i..

| Organ | [¹¹¹ In]-DOTA-NOC 4 h p.i. (Ginj et al., 2006) | [^{99m} Tc]-EDDA/ /HYNIC-TOC 4 h p.i. (Decristoforo et al., 2000) | [^{99m} Tc(CO) ₃ (H ₂ O)]- DHis-DLys-NOC 4 h p.i. |
|-------|--|---|--|
| Blut | 0.03 %±0.02 | 0.28 %±0.04 | 0.29 % |
| Niere | 14.2 %±0.8 | 4.71 %±1.38 | 9.46 % |
| Milz | 1.7 %±0.07 | 0.40 %±0.15 | 2.67 % |
| Magen | 7.4 %±2.0 | 1.58 %±0.39* | 6.17 % |
| Darm | 1.9 %±0.1 | 1.58 %±0.39* | 3.10 % |
| Leber | 1.8 %±0.1 | 0.75 %±0.67 | 6.82 % |
| Lunge | nicht gemessen | nicht gemessen | 6.48 % |
| Herz | 1.5 %±0.2 | nicht gemessen | 0.63 % |

Tab. 21: Biodistribution von [^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)]-DHis-DLys-NOC im Vergleich mit Literaturwerten für [¹¹¹In]-DOTA-NOC und [^{99m}Tc]-EDDA/ /HYNIC-TOC

Die Werte von der Literatur können jedoch nur bedingt verglichen werden, da bei den Literaturuntersuchungen AR4-2J-tumortragende Nacktmäuse benutzt wurden. Für unsere Untersuchungen wurden tumorfreie Mäuse benutzt, was möglicherweise die höheren Werte insbesondere in den Ausscheidungsorganen und in den sonstigen Organen erklärt. Trotzdem kann einen Anhaltspunkt hinsichtlich der Bioverteilung der Tc-Derivate im Vergleich zu anderen bereits bekannten SS-Analoga gewonnen werden. Auffallend ist im Vergleich zum [^{99m}Tc]-HYNIC-TOC eine höhere Anreicherung in der Leber und im Gastrointestinaltrakt zu sehen, die wahrscheinlich mit der höheren Lipophilie und daraus resultierender Proteinbindung zusammenhängt. Im Vergleich zum [¹¹¹In]-DOTA-NOC ist die Verteilung relativ ähnlich außer der ausgeprägteren Anreicherung hepatisch und Retention im Blut beim [^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)]-DHis-DLys-NOC.

6.5.2 [^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)]-DHis-DLys-DOTA-NOC

Verglichen mit den beiden anderen technetiummarkierten Peptiden rückt die renale Elimination bei diesem Derivat eher in den Vordergrund. Weiterhin fällt eine proteinbindungsabhängige relativ hohe Retention im Blut und eine vermutlich rezeptorabhängige Anreicherung des Magens (Reubi, 1995). Wobei der Wert der Anreicherung des Magens sehr mit dem Füllungszustand dieses Organs variiert und somit zu falsch niedrigen Werten führen kann. Tabelle 22 zeigt die Bioverteilung [^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)]-DHis-DLys-DOTA-NOC im Vergleich zu zwei anderen ähnlichen Peptiden.

| Organ | [¹¹¹In]-DOTA-NOC 4 h p.i. (Nacktmäuse) (Ginj et al., 2006) | [^{99m}Tc]-EDDA/ /HYNIC-TOC 4 h p.i. (Decristoforo et al., 2000) | [^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)]- DHis-DLys-DOTA- NOC 4 h p.i. |
|--------------|--|---|---|
| Blut | 0.03 %±0.02 | 0.28 %±0.04 | 3.80 % |
| Niere | 14.2 %±0.8 | 4.71 %±1.38 | 26.9 % |
| Milz | 1.7 %±0.07 | 0.40 %±0.15 | 5.29 % |
| Magen | 7.4 %±2.0 | 1.58 %±0.39* | 5.80 % |
| Darm | 1.9 %±0.1 | 1.58 %±0.39* | 7.60 % |
| Leber | 1.8 %±0.1 | 0.75 %±0.67 | 14.63 % |
| Lunge | nicht gemessen | nicht gemessen | 9.38 % |
| Herz | 1.5 %±0.2 | nicht gemessen | 3.79 % |

Tab. 22: Biodistribution von [^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)]-DHis-DLys-DOTA-NOC 4 Stunden nach Injektion im Vergleich mit [¹¹¹In]-DOTA-NOC und [^{99m}Tc]-EDDA/ /HYNIC-TOC

Analog wie im Kapitel 6.5.1 sieht man auch bei diesem Derivat verglichen mit dem [¹¹¹In]-DOTA-NOC und dem [^{99m}Tc]-EDDA/HYNIC-TOC allgemein höhere Retentionswerte in allen Organen, auch hier insbesondere im Gastrointestinaltrakt und der Leber.

6.5.3 [^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)]-DHis-DLys-TMS-NOC

Bei diesem Derivat nehmen die Werte im Blut langsamer ab als bei den beiden anderen Tc-Carbonylmarkierten Derivaten, was wahrscheinlich mit der hohen Proteinbindung des Peptids von 69–80 % zusammenhängt. Bezüglich der erhofften renalen Elimination sind die Nierenwerte ebenfalls niedriger als bei dem Tc-Carbonyl-DOTA-Derivat, aber doch höher als bei dem nicht-derivatisierten Peptid. Der Vergleich des Tc-Carbonyl-TMS-Derivates mit dem [¹¹¹In]-DOTA-NOC und dem [^{99m}Tc]-EDDA/ /HYNIC-TOC ist in Tabelle 23 dargestellt.

| Organ | [¹¹¹ In]-DOTA-NOC 4 h p.i. (Ginj et al., 2006) | [^{99m} Tc]-EDDA/ /HYNIC-TOC 4 h p.i. (Decristoforo et al., 2000) | [^{99m} Tc(CO) ₃ (H ₂ O)]- DHis-DLys-TMS- NOC 4 h p.i. |
|-------|--|---|--|
| Blut | 0.03 %±0.02 | 0.28 %±0.04 | 2.19 % |
| Niere | 14.2 %±0.8 | 4.71 %±1.38 | 7.94 % |
| Milz | 1.7 %±0.07 | 0.40 %±0.15 | 2.02 % |
| Magen | 7.4 %±2.0 | 1.58 %±0.39* | 2.00 % |
| Darm | 1.9 %±0.1 | 1.58 %±0.39* | 4.26 % |
| Leber | 1.8 %±0.1 | 0.75 %±0.67 | 5.41 % |
| Lunge | nicht gemessen | nicht gemessen | 3.93 % |
| Herz | 1.5 %±0.2 | nicht gemessen | 2.11 % |

Tab. 23: Bioverteilung von [^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)]-DHis-DLys-TMS-NOC 4 Stunden nach Injektion im Vergleich mit [¹¹¹In]-DOTA-NOC und [^{99m}Tc]-EDDA/ /HYNIC-TOC

Ähnlich wie im Kapitel 6.5.2 sieht man auch bei dem [^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)]-Carbonyl-DHis-DLys-TMS-NOC verglichen mit dem [¹¹¹In]-DOTA-NOC und dem [^{99m}Tc]-EDDA/HYNIC-TOC allgemein höhere Retentionswerte in allen Organen, auch hier insbesondere im Gastrointestinaltrakt und in der Leber.

6.5.4 DHis-DLys[¹⁷⁷Lu-DOTA]-NOC

Verglichen mit den Tc-Peptiden, ist bei [¹⁷⁷Lu]-DOTA-NOC-Peptid kaum eine Anreicherung in der Leber oder Retention im Blut festzustellen. Die höchste Dosis an Radioaktivität ist in den Nieren zu finden, was für eine hauptsächlich renale Elimination spricht. Ausser einer geringgradig vermehrten allgemeinen Retention des DHis-DLys[¹⁷⁷Lu-DOTA]-NOC ist kaum ein Unterschied zum [¹¹¹In]-DOTA-NOC festzustellen (Vgl. Tabelle 24). Chemisch gesehen steht dieses Derivat dem [¹¹¹In]-DOTA-NOC auch am nächsten und somit ist dieses Ergebnis durch die chemische Ähnlichkeit gut erklärbar. Auf der anderen Seite zeigt diese Verbindung, dass der Tc-Carbonyl-Ligand einen erheblichen Einfluss auf die Biodistribution hat, der in diesem Ausmass nicht erwartet wurde.

| Organ | [¹¹¹In]-DOTA-NOC 24 h p.i. (Ginj et al., 2006) | DHis-DLys[¹⁷⁷Lu- DOTA]-DOTA-NOC 24 h p.i. |
|--------------|--|---|
| Blut | 0.1 %±0.00 | 0.02 % |
| Niere | 9.0 %±1.2 | 17.63 % |
| Milz | 0.5 %±0.09 | 0.21 % |
| Magen | 1.7 %±0.4 | 1.00 % |
| Darm | 0.6 %±0.1 | 2.74 % |
| Leber | 0.6 %±0.05 | 0.50 % |
| Lunge | nicht gemessen | 0.50 % |
| Herz | 0.1 %±0.02 | 0.02 % |

Tab. 24: Biodistribution 24 Stunden p.i. von DHis-DLys[¹⁷⁷Lu-DOTA]-NOC im Vergleich mit [¹¹¹In]-DOTA-NOC

6.5.5 Vergleich von DHis-DLys[¹⁷⁷Lu-DOTA-NOC] mit [¹⁷⁷Lu]-DOTA-TATE

Vergleicht man [¹⁷⁷Lu]-DOTA-TATE mit DHis-DLys[¹⁷⁷Lu-DOTA]-NOC ist eine relativ hohe Anreicherung in der Lunge, Magen und in der Milz festzustellen, die bei DHis-DLys[¹⁷⁷Lu-DOTA]-NOC deutlich weniger ausgeprägt ist. Die Ausscheidung über den hepatobiliären Weg ist bei beiden Tracern ähnlich stark ausgeprägt. Ein weiterer Unterschied, was auch die höhere Retention des [¹⁷⁷Lu]-DOTA-NOC-Derivates erklären könnte, sind die vergleichsweise höheren Werte im Blut. In Tabelle 25 sind die jeweiligen Werte aufgetragen.

| Organ | DHis-DLys[¹⁷⁷Lu-DOTA]-NOC 1 h p.i. | [¹⁷⁷Lu]-DOTA-TATE 1 h p.i |
|--------------|--|---|
| Blut | 1.10 % | 0.14 % |
| Niere | 17.06 % | 2.77 % |
| Milz | 0.35 % | 4.44 % |
| Magen | 0.87 % | 4.27 % |
| Darm | 2.18 % | 2.84 % |
| Leber | 0.66 % | 0.40 % |
| Lunge | 1.57 % | 6.63 % |
| Herz | 0.54 % | 0.18 % |

Tab. 25: Vergleich der Biodistribution 1 Stunde nach Injektion von DHis-DLys[¹⁷⁷Lu-DOTA]-NOC mit [¹⁷⁷Lu]-DOTA-TATE

Offenbar zu sehen ist nochmals die Auswirkung des Tc-Carbonyls auf die pharmakokinetischen Eigenschaften des Peptids. Wenn man die Lutetiumderivate mit den Tc-Carbonylmarkierten Derivaten vergleicht, sieht man dass die Einführung der Tc-Carbonylgruppe zu höheren Werten sowohl im Blut als auch im Gastrointestinaltrakt führt. Zwei mögliche Erklärungen dafür wären die erhöhte Lipophilie durch Einführung der Tc-Carbonylgruppe oder dass der freie Wasserligand des Tc-Carbonyls mit verschiedenen Proteinen im Blut unspezifisch interagiert.

6.6 Schlussfolgerung

Insgesamt sind die Organverteilungsmuster der Tc-Carbonylmarkierten Derivate verglichen mit in der Literatur bekannten Verbindungen und den zwei lutetiummarkierten Analoga unvorteilhaft. Gewünschte Eigenschaften wie hauptsächlich renale Elimination, niedrige Proteinbindung und niedrige allgemeine Organretention konnte die trotz Konjugation mit DOTA oder TMSA nicht erzielt werden. Da sich diese ungünstigen Eigenschaften teilweise durch den freien Wasserliganden im Tc-Carbonkomplex erklären lassen, sollte diese Markierungsmöglichkeit biologischer Moleküle, insbesondere wegen der Möglichkeit einer potentiellen Rheniummarkierung nicht aufgegeben werden, sondern weiter mit tridentaten Tc-Carbonylbindenden wie beispielsweise DTPA oder PADA untersucht und gegebenenfalls optimiert werden.

7 Zusammenfassung und Ausblick

7.1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde das von der Firma Bachem im Auftrag angefertigte Somatostatinanalogon DHis-DLys-NOC mit Technetium markiert. Die Markierung mittels $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$ erfolgte mit sehr guter Ausbeute mit Hilfe des IsoLink-Kits. Das Peptid konnte mit hohen Ausbeuten sowohl mit DOTA als auch mit TMSA problemlos derivatisiert werden. Zusätzlich wurde das DHis-DLys-NOC mittels des stabilen rheniumanalogen Carbonylreagenz zwecks Rezeptoraffinitätsuntersuchung umgesetzt. Hier zeigte sich erwartungsgemäß ein Rezeptorbindungsvermögen im nanomolaren Bereich, jedoch nahm die Affinität um etwa einen Faktor 10 ab durch die Einführung der Carbonylgruppe. Zudem wurde das DOTA-Derivat mit Lutetium markiert und ebenfalls in Bioverteilungsstudien untersucht. Die drei ^{99m}Tc -carbonyl-Derivate wurden auf Serumstabilität, Proteinbindung im Blut, sowie die Rezeptoraffinität und Pharmakokinetik untersucht.

Bei allen untersuchten Verbindungen war eine ähnliche Affinität zum sstr2-Rezeptor festzustellen, wobei die Affinität um etwa einen Faktor 10 sinkt durch die Komplexbildung mit Rhenium. Alle drei ^{99m}Tc -markierten Derivate sind über 24 Stunden im Serum stabil und zeigen eine hohe Proteinbindung. Erwartungsgemäß im Sinne einer Lipophilie-Reihenfolge war sie bei dem unterderivatisierten am geringsten und bei dem TMSA-derivatisierten Peptid am meisten ausgeprägt. In der Bioverteilungsstudie zeigt das Tc-Carbonyl-DOTA-Peptid unter den Tc- 99m -markierten Verbindungen die günstigsten Eigenschaften bezüglich einer erwünschten renalen Ausscheidung, aber auch bei dieser Substanz wie bei den anderen Tc-Derivaten ist eine deutliche proteinbindungsbedingte Retention im Blut, Gastrointestinaltrakt und in der Leber zu sehen. [^{177}Lu]-DOTA-NOC erwies sich als das Derivat, das am ehesten die erwünschten pharmakokinetischen Eigenschaften, mit vorwiegend renaler Elimination und niedriger Serumproteinbindung, besitzt.

7.2 Ausblick

Die Bioverteilungs- und pharmakokinetischen Eigenschaften der ^{99m}Tc -markierten Somatostatinanaloge müssen noch weiter optimiert werden. Bei den in dieser Arbeit synthetisierten Derivaten ist unter den ^{99m}Tc -markierten Verbindungen das ^{99m}Tc -DOTA-Derivat, dasjenige welches den gewünschten Eigenschaften am nächsten kommt. Die größten Nachteile dieses Derivates sind noch die hohe Proteinbindung mit resultierender Retention im Blut und die mäßige Anreicherung in der Leber. Dies lässt sich am ehesten mit dem noch verbleibenden Wasserliganden im Tc-Carbonylkomplex und an der generell unerwünscht hohen Lipophilie durch die Einführung der Tc-Carbonylgruppe begründen. Um den noch verbliebenen Wasserliganden zu verdrängen, muss eine Substanz benutzt werden, die die peptidische Disulfidbrücke schont. Phosphine, die zur Wasserligandenverdrängung prinzipiell einsetzbar wären, sind jedoch wegen ihrer hohen Reduktionskraft nicht für diesen Zweck geeignet, da sie die Disulfidbrücke in der Verbindung spalten und damit die Rezeptoraffinität aufheben. Eine gangbare Alternative wäre die ^{99m}Tc -Carbonylgruppe an einem dreizähligen Liganden anzubinden. Wenn die pharmakokinetischen Eigenschaften des Peptids optimiert worden sind, wären die nächsten Schritte die Tumorinternalisierung an AR4-2J-Zellen und die Bioverteilung in tumortragenden Mäusen zu untersuchen.

Wie die Untersuchungen am Lu-177-markierten Peptid zeigen, wäre eine weitere interessante Markierungsalternative die Gallium-68-Markierung des DOTA-Derivates, das als PET-Tracer gut geeignet wäre. Für das Gallium, analog wie bei den Nukliden Mo-99/Tc-99m, existiert ein Generatorsystem, der Germanium-68/Gallium-68-Generator. Das Gallium hat mit 68 Minuten zudem eine kurze Halbwertszeit. Aus diesen Gründen stellt das Gallium-68 eine gute Alternative zur Radiomarkierung von Peptiden und anderen Biomolekülen zwecks Diagnostik dar.

Jedoch war es Ziel dieser Arbeit Tc-99m-markierte Verbindungen auf Carbonylbasis zu untersuchen, da analoge Re-188-Carbonylderivate prinzipiell zur Therapie eingesetzt werden könnte und damit ein ideales Paar für Diagnostik (Tc-99m) und Therapie (Re-188) zur Verfügung stünde. Auf Basis der hier durchgeführten Untersuchungen, wahrscheinlich ungünstiger Bioverteilungseigenschaften und komplexer Synthese ist ein Re-188-carbonylmarkiertes Derivat momentan keine Alternative für das [^{177}Lu]-DOTA-TATE für die Radiorezeptortherapie. Besonders

aus Kostengründen und Verfügbarkeit wäre ein Rhenium-188-Somatostatinanalogon eine gute Alternative zu den üblichen Lu-177-DOTA-Peptiden von Interesse. Die kürzere Halbwertszeit des Rheniums (17 h), statt 6,7 Tage beim Lutetium-177, wäre auch durch die niedrigere Strahlenbelastung der Patienten und den kürzeren stationären Aufenthalt vom Vorteil.

8 Literaturverzeichnis

Albert R, Smith-Jones P, Stolz B, Simeon C, Knecht H, Bruns C, Pless J. Direct synthesis of [DOTA-DPhe¹]-octreotide and [DOTA-DPhe¹,Tyr³]-octreotide (SMT487): two conjugates for systemic delivery of radiotherapeutical nuclides to somatostatin receptor positive tumors in man. *Bioorg Med Chem Lett* 1998; 19: 1207-1210

Alberto R, Schibli R, Egli A, Schubiger AP, Abram A, Kaden TA. A novel Organometallic Aqua Complex of Technetium for the Labelling of Biomolecules: Synthesis of [^{99m}Tc(OH₂)₃(CO)₃]⁺ from [^{99m}TcO₄]⁻ in Aqueous Solution and Its Reaction with a Bifunctional Ligand. *J Am Chem Soc* 1998; 120: 7987-7988

Alberto R, Schibli R, Schubiger PA, Abram U, Pietzsch HJ, Johannsen B. First application of fac-[^{99m}Tc(H₂O)₃(CO)₃]⁺ in bioorganometallic chemistry: Design, structure and in vitro affinity of a 5-HT_{1A} receptor ligand labeled with ^{99m}Tc. *J Am Chem Soc* 1999; 121: 6076-6077

Alberto R, Schibli R, Waibel R, Abram U, Schubiger PA. Basic aqueous chemistry of [M(H₂O)₃(CO)₃]⁺ (M=Re, Tc) directed towards radiopharmaceutical application. *Coord Chem Rev.* 1999; 192: 901-919

Alberto R, Ortner K, Wheatley N, Schibli R, Schubiger AP. Synthesis and properties of borano-carbonate: a convenient in situ CO source for the aqueous preparation of [^{99m}Tc(OH₂)₃(CO)₃]⁺. *J Am Chem Soc* 2001; 123: 3135-3136

Alumets J, Sundler F, Hakanson R. Distribution, ontogeny and ultrastructure of somatostatin immunoreactive cell in the pancreas and gut. *Cell Tissue Res* 1977; 185: 465-479

Bakker WH, Krenning EP, Breeman WA, Koper JW, Kooij PP, Reubi JC, Klijn JG, Visser TJ, Docter R, Lamberts SW. Receptor-scintigraphy with a radioiodinated somatostatin analogue: radiolabeling, purification, biologic activity, and in vivo application in animals. *J Nucl Med* 1990; 31: 1501-1509

Bakker WH, Krenning EP, Reubi JC, Breeman WA, Setyono-Han B, de Jong M, Kooij PP, Bruns C, van Hagen PM, Marbach P. In vivo application of [^{111}In -DTPA-D-Phe 1]-octreotide for detection of somatostatin receptor-positive tumors in rats. *Life Sci* 1991; 49: 1593-1601

Bangard M, Behe M, Guhlke S, Otte R, Bender H, Maecke HR, Biersack HJ. Detection of somatostatin receptor-positive tumours using the new $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -trincine-HYNIC-D-Phe 1 -Tyr 3 -Octreotide: first results in patients and comparison with ^{111}In -DTPA-D-Phe 1 -Octreotide. *Eur J Nucl Med* 2000; 27: 628-637

Bauer W, Briner U, Doepfner W, Haller R, Huguenin R, Marbach P, Petcher TJ, Pless J. SMS-201-995: a very potent and selective octapeptide analogue of somatostatin with prolonged action. *Life Sci* 1982; 31: 1133-1140

Béhé M. Radioaktivmarkierte Peptide. Technetiummarkierungen von Somatostatinanaloga zur Lokalisation von neuroendokrinen Tumoren. Basel. Universität Basel 1999.

Bodei L, Cremonesi M, Grana C, Rocca P, Bartolomei M, Chinol M, Paganelli G. Receptor radionuclide therapy with ^{90}Y -[DOTA] 0 -Tyr 3 -octreotide (^{90}Y -DOTATOC) in neuroendocrine tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2004; 31: 38-46

Brazeau P, Vale W, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J, Guillemin R. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 1973; 179: 77-79

Cescato R, Schulz S, Waser B, Eltschinger V, Rivier JE, Wester HJ, Culler M, Ginj M, Liu Q, Schonbrunn A, Reubi JC. Internalization of sst $_2$, sst $_3$ and sst $_5$ receptors: effect of somatostatin agonists and antagonists. *J Nucl Med*. 2006; 47: 502-511

Danoff A, Kleinberg D. Somatostatin analogs as primary medical therapy for acromegaly. *Endocrine* 2003; 20: 291-297

Decristoforo C, Mather SJ. Preparation, ^{99m}Tc -labeling, and in vitro characterization of HYNIC and N_3S modified RC-160 and $[\text{Tyr}^3]$ octreotide. *Bioconjugate Chem* 1999; 10: 701-702.

Decristoforo C, Mather S J, Cholewinski W, Donnemiller E, Riccabona G, Moncayo R. ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-TOC: a new ^{99m}Tc -labelled radiopharmaceutical for imaging somatostatin receptor-positive tumours; first clinical results and intra-patient comparison with ^{111}In -labelled octreotide derivatives. *Eur J Nucl Med* 2000; 27: 1318-1325

Decristoforo C, Melendez-Alafort L, Sosabowski JK, Mather SJ. ^{99m}Tc -HYNIC-Tyr3-Octreotide for Imaging Somatostatin-Receptor-Positive Tumors: Preclinical Evaluation and Comparison with ^{111}In -Octreotide. *J Nucl med* 2000; 41: 1114-1119

de Jong M, Bakker WH, Krenning EP, Breeman WA, van der Pluijm ME, Bernard BF, Visser TJ, Jermann E, Béhé M, Powell P, Mäcke HR. Yttrium-90 and Indium-111 labelling, receptor binding and biodistribution of $[\text{DOTA}^0, \text{D-Phe}^1, \text{Tyr}^3]$ octreotide, a promising somatostatin analogue for radionuclide therapy. *Eur J Nucl Med* 1997; 24: 368-371

de Jong M, Breeman WA, Bernard BF, Bakker WH, Schaar M, van Gameren A, Bugaj JE, Erion J, Schmidt M, Srinivasan A, Krenning EP. $[\text{Lu-}^{177}\text{DOTA}^0, \text{Tyr}^3]$ octreotate for somatostatin receptor-targeted radionuclide therapy. *Int J Cancer* 2001; 92: 628-633

Du J, Hiltunen J, Marquez M, Nilsson S, Holmberg AR. Technetium-99m labelling of glycosylated somatostatin-14. *Appl Radiat Isot.* 2001; 55: 181-187

Duncan JR, Stephenson MT, Wu HP, Anderson C J. Indium-111-diethylenetriaminepentaacetic acid-octreotide is delivered in vivo to pancreatic, tumor cell, renal and hepatocyte lysosomes. *Cancer Res* 1997; 57: 659-671

Epelbaum J. Somatostatin in the central nervous system: physiology and pathological modifications. *Prog Neurobiol* 1986; 27: 63-100

Esser JP, Krenning EP, Teunissen JJ, Kooij PP, van Gameren AL, Bakker WH, Kwekkeboom DJ. Comparison of [(177)Lu-DOTA(0),Tyr(3)]octreotate and [(177)Lu-DOTA(0),Tyr(3)]octreotide: which peptide is preferable for PRRT?. *Eur J Nucl Med Mol Imag* 2006; 33: 1346-1351

Euroscreen. Technical Data Sheet. Human sstr2, ES-521-M, Batch: 1206, 2005

Feng B, Laperle JL, Chang G, Varma MV. Renal clearance in drug discovery and development: molecular descriptors, drug transporters and disease state. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2010

Freidinger RM, Schwenk-Perlow D, Randall WC, Saperstein R, Arison BH, Veber DH. Conformational modifications of cyclic hexapeptide somatostatin analogs. *Int J Peptide Protein Res* 1984; 23: 142-150

Ginj M, Chen J, Walter MA, Eltschinger V, Reubi JC, Maecke HR. Preclinical evaluation of new and highly potent analogues of octreotide for predictive imaging and targeted radiotherapy. *Clin cancer Res*. 2005; 11: 1136-1145

Ginj M, Hanwen Z, Waser B, Cescato R, Wild D, Wang X, Erchegyi J, Rivier J, Maecke H, Reubi JC. Radiolabeled somatostatin receptor antagonists are preferable to agonists for in vivo receptor targeting of tumors. *PNAS* 2006; 103: 16436-16441

Guillermet J, Saint-Laurent N, Rochaix P, Cuvillier O, Levade T, Schally AV, Pradayrol L, Buscail L, Susini C, Bousquet C. Somatostatin receptor subtype 2 sensitizes human pancreatic cancer cells to death ligand-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 155-160

Henze M, Schuhmacher J, Hipp P, Kowalski J, Becker DW, Doll J, Mäcke HR, Hofmann M, Debus J, Haberkorn U. PET imaging of somatostatin receptors using [⁶⁸Ga]DOTA-D-Phe¹-Tyr³-octreotide: first results in patients with meningiomas. *J Nucl Med* 2001; 42: 1053-1056

Hokfelt T, Efendic S, Hellerstrom C, Johansson O, Luft R, Arimura A. Cellular localization of somatostatin in endocrine-like cells and neurons of the rat with special references to the A1-cells of the pancreatic islets and to the hypothalamus. *Acta Endocrinol Suppl* 1975; 200: 5-41

Hoyer D, Bell GI, Berelowitz M, Epelbaum J, Feniuk W, Humphrey PP, O'Carroll AM, Patel YC, Schonbrunn A, Taylor JE. Classification and nomenclature of somatostatin receptors. *Trend Pharmacol Sci* 1995; 16: 86-88

Kolan H, Li J, Thakur ML. Sandostatin labeled with ^{99m}Tc : in vitro stability, in vivo validity and comparison with ^{111}In -DTPA-octreotide. *Pept Res* 1996; 9: 144-150

Krenning EP, Bakker WH, Breeman WA, Koper JW, Kooij PP, Ausema L, Lameris JS, Reubi JC, Lamberts SW. Localization of endocrine-related tumours with radioiodinated analogue of somatostatin. *Lancet* 1989; 1: 242-244

Krenning EP, Kwekkeboom DJ, Bakker WH, Breeman WA, Kooij PP, Oei HY, van Hagen M, Postema PT, de Jong M, Reubi JC. Somatostatin receptor scintigraphy with [^{111}In -DTPA-D-Phe¹]- and [^{123}I -Tyr³]-octreotide: the Rotterdam experience with more than 1000 patients. *Eur J Nucl Med* 1993; 20: 716-731

Kwekkeboom DJ, Bakker WH, Kooij PP, Konijnenberg MW, Srinivasan A, Erion JL, Schmidt MA, Bugaj JL, de Jong M, Krenning EP. [^{177}Lu -DOTA⁰,Tyr³]octreotate: comparison with [^{111}In -DTPA⁰]octreotide in patients. *Eur J Nucl Med* 2001; 28: 1319-1325

Lepsy CS, Guttendorf RJ, Kugler AR, Smith DE. Effects of organic anion, organic cation, and dipeptide transport inhibitors on cefdinir in the isolated perfused rat kidney. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47: 689-696

Maina T, Nock B, Nikolopoulou A, Sotiriou P, Loudos G, Maintas D, Corpopatis P, Chiotellis E. [^{99m}Tc]Demotate, a new ^{99m}Tc -based[Tyr³]octreotate analogue for the detection of somatostatin receptor-positive tumours: synthesis and preclinical results. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2002; 29: 742-753

Otte A, Mueller-Brand J, Dellas S, Nitzsche E, Herrmann R, Maecke HR. Yttrium-90-labelled somatostatin-analogue for cancer treatment. *Lancet*. 1998; 417-418

Paganelli G, Zoboli S, Cremonesi M, Bodei L, Ferrari M, Grana C, Bartolomei M, Orsi F, De Cicco C, Mäcke HR, Chinol M, de Braud F. Receptor-mediated radiotherapy with ^{90}Y -DOTA-D-Phe¹-Tyr³-octreotide. *Eur J Nucl Med* 2001; 28: 426-434

Patel YC. Somatostatin and its receptor family. *Front. Neuroendocrinol* 1999; 20: 157-198

Patel YC. Molecular pharmacology of somatostatin receptor subtypes. *J Endocrinol Invest* 1997; 20: 348-367

Pawlak D, Korsak A, Mikolajczak R, Janota B, Karczmarczyk U, Jakubowska E. Preclinical evaluation of therapeutic radiopharmaceuticals based on ^{90}Y and ^{177}Lu . *World J Nucl Med* 2009; 8: 229-229

Pless J, Bauer W, Briner U et al. Chemistry and pharmacology of SMS 201-995. a long-acting octapeptide analogue of somatostatin. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1986; 119: 54-64

Reichlin S. Somatostatin. *N Engl J Med* 1983; 309: 1495-1501

Reisine T, Bell GI. Molecular biology of somatostatin receptors. *Endocr Rev* 1995; 16: 427-442

Reubi JC, Landolt AM. High density of somatostatin receptors in pituitary tumors from acromegalic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1984; 59: 1148-1151

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

Reubi JC, Laissue J, Krenning E, Lamberts SW. Somatostatin receptors in human cancer: incidence, characteristics, functional correlates and clinical implications. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992; 43: 27-35

Reubi JC, Schaer JC, Waser B, Mengod G. Expression and localization of somatostatin receptor SSTR1, SSTR 2 and SSTR3 mRNAs in primary human tumors using in situ hybridization. *Cancer Res* 1994; 54: 4355-5459

Reubi JC, Schaer J, Waser B, Wenger S, Heppeler A, Schmitt JS, Mäcke HR. Affinity profiles for human somatostatin receptor sst1-sst5 of somatostatin radiotracers selected for scintigraphic and radiotherapeutic use. *Eur J Nucl Med* 2000; 27: 273-282

Reubi JC, Waser B. Concomitant expression of several peptide receptors in neuroendocrine tumors: molecular basis for in vivo multipreceptor tumor targeting. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003; 30: 781-793

Schibli R, La Bella R, Alberto R, Garcia-Garayoa E, Ortner K, Abram U, Schubiger PA. Influence of the denticity of ligand systems on the in vitro and in vivo behavior of ^{99m}Tc(I)-tricarbonyl complexes; a hint for the future functionalization of biomolecules. *Bioconjugate Chem* 2000; 11: 345-351

Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 1995; 9: 726-735

Sharma K, Srikant CB. Induction of wild-type p53, Bax and acidic endonuclease during somatostatin-signaled apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *Int J Cancer* 1998; 76: 259-266

Stolz B, Weckbecker G, Smith-Jones PM, Albert R, Raulf F, Bruns C. The somatostatin receptor-targeted radiotherapeutic [⁹⁰Y-DOTA-DPhe¹, Tyr³]octreotide (⁹⁰Y-SMT 487) eradicates experimental rat pancreatic CA 20948 tumours. *Eur J Nucl Med* 1998; 25: 668-674

Tett SE, Kirkpatrick CM, Gross AD, McLachlan AJ. Principles and clinical application of assessing alterations in renal elimination pathways. *Clin Pharmacokinet.* 2003; 42: 1193-1211

Trejtner F, Laznicek M, Laznickova A, Mather SJ. Pharmacokinetics and renal handling of ^{99m}Tc-labeled peptides. *J Nucl Med.* 2000; 41: 177-182

Trejtner F, Laznicek M. Analysis of renal handling of radiopharmaceuticals. *Q J Nucl Med.* 2002; 46: 181-194

Waibel R, Alberto R, Willuda J, Finnern R, Schibli R, Stichelberger A, Egli A, Abram U, Mach JP, Pluckthun A, Schubiger PA. Stable one-step technetium-99m labeling of His-tagged recombinant proteins with a novel Tc(I)-carbonyl complex. *Nat Biotechnol* 1999; 17: 897-901

Waldherr C, Pless M, Maecke HR, Schumacher T, Crazzolara A, Nitzsche EU, Haldemann A, Mueller-Brand J. Tumor response and clinical benefit in neuroendocrine tumors after 7,4 GBq ⁹⁰Y-DOTA-TOC. *J Nucl Med* 2002; 43: 610-616

Wild D, Schmitt JS, Ginj M, Maecke HR, Bernard BF, Krenning EP, De Jong M, Wenger S, Reubi JC: DOTA-NOC, a high affinity ligand of somatostatin receptor subtypes 2, 3 and 5 for labeling with various metals. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003; 30: 1338-1347

Wild D, Maecke HR, Waser B, Reubi JC, Ginj M, Rasch H, Muller-Brand J, Hofmann M. ⁶⁸Ga-DOTANOC: a first compound for PET imaging with high affinity for somatostatin receptor subtypes 2 and 5. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2005; 32: 724

Yamada Y, Post SR, Wang K, Tager HS, Bell GI, Seino S. Cloning and functional characterization of a family of human and mouse somatostatin receptors expressed in brain, gastrointestinal tract, and kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 251-255

Zamora PO, Gulhke S, Bender H, Diekmann D, Rhodes BA, Biersack HJ, Knapp FF Jr. Experimental radiotherapy of receptor-positive human prostate adenocarcinoma with ¹⁸⁸Re-RC-160, a directly-radiolabeled somatostatin analogue. *Int J Cancer* 1996; 65: 214-220

9 Danksagung

Zuerst möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Stefan Guhlke für die hervorragende Betreuung während dieser Arbeit und bei Herrn Prof. Dr. Hans-Jürgen Biersack für die Möglichkeit diese Doktorarbeit anzufangen bedanken.

Ein großer Dank gilt auch Magdalena und Karl-Heinz Schmoll für ihre bedingungslose und immer bereite Hilfe.

Zuletzt möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Axel Graupner und meiner Familie bedanken für die Unterstützung und Beistand in der Zeit dieser Doktorarbeit.