

Aus dem Bereich Nuklearmedizin  
der Klinik für Radiologie und Nuklearmedizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Vergleichende Evaluation  
neuartiger Neurotensinrezeptor-1-Antagonisten  
im Nacktmausmodell

## **D i s s e r t a t i o n**

zur Erlangung des Doktorgrades  
Dr. med.  
(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Jörg Schulz  
aus Dresden  
Magdeburg, 2016

### Bibliographische Beschreibung:

Schulz, Jörg:

Vergleichende Evaluation neuartiger Neurotensinrezeptor-1-Antagonisten

im Nacktmausmodell. - 2016. - 73 Bl., 18 Abb., 6 Tab.

### Kurzreferat

Für eine Reihe von Tumorentitäten konnte eine erhöhte Expression des Neurotensinrezeptor-1 (NTR1) nachgewiesen werden, nicht oder nur kaum jedoch in gesundem Gewebe. Diese Eigenschaft lässt ihn als geeignete Zielstruktur für molekulare Bildgebung und zielgerichtete Radionuklid-Therapie erscheinen. Ziel der Untersuchungen dieser Arbeit war die *in-vivo*-Evaluation der drei neu entwickelten, NTR1-antagonistischen Tracer 3BP-227, 3BP-228 und 3BP-483 (3B Pharmaceuticals, Berlin), welche aufgrund ihres strukturellen Designs gleichermaßen für einen diagnostischen und therapeutischen Einsatz, als sog. Theranostika, konzipiert wurden. Für Biodistributionsstudien sowie die Bildgebung mittels Single Photon Emission computed Tomography und Computertomografie (SPECT/CT) wurden die Verbindungen mit  $^{111}\text{In}$  markiert und in einem Nacktmausmodell mit xenotransplantierten, NTR1-positiven HT29-Tumoren bzw. NTR1-negativen HEK293-Tumoren evaluiert. Die Biodistribution erbrachte eine hohe und anhaltende Tumoranreicherung im NTR1-positiven HT29 von  $^{111}\text{In}$ -3BP-227 und  $^{111}\text{In}$ -3BP-228. Die Uptakes dieser beiden Verbindungen in gesundem Gewebe, inklusive kritischer Organe wie Nieren, Leber oder Darm, überstiegen die des Tumors zu keinem Zeitpunkt. Die geringe Tumoranreicherung im NTR1-negativen HEK293 bewies die Rezeptorspezifität von  $^{111}\text{In}$ -3BP-227. Die Bioverteilung von  $^{111}\text{In}$ -3BP-483 zeigte ein ungünstigeres Muster mit geringeren Tumoranreicherungen sowie diese übersteigende Werte der Nieren. Die Ganzkörper-SPECT/CT-Aufnahmen ermöglichten eine deutliche Tumorvisualisierung mit geringer Hintergrundaktivität. Histologische sowie laborchemische Untersuchungen als Nephrotoxizitätsscreening waren bis auf eine Erhöhung von Cystatin C im Serum unauffällig.

### Schlüsselwörter

NTR1-Radiotracer, Xenograft, SPECT/CT, Biodistribution, Onkologie

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einführung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Rezeptor-Targeting in der Tumordiagnostik und -therapie .....	1
1.1.1 Nuklearmedizinische Tumordiagnostik und -therapie .....	1
1.1.2 Prinzip des Rezeptor-Targeting am Beispiel von Somatostatinanaloga.....	2
1.1.3 Entwicklung eines Tracers für das Radionuklid-Rezeptor-Targeting .....	5
1.2 Neurotensin und Neurotensin-Rezeptoren.....	7
1.2.1 Anatomie und Physiologie des neurotensinergen Systems.....	7
1.2.2 Biochemie und Pathobiochemie des neurotensinergen Systems .....	8
1.2.3 Pathologie des neurotensinergen Systems .....	9
1.3 Pharmakologische Liganden des Neurotensin-Rezeptor 1.....	12
1.3.1 Radionuklid-markierte Neurotensinanaloga .....	12
1.3.2 Antagonisten des Neurotensin-Rezeptor 1.....	12
1.4 Die Tracer 3BP-227, 3BP-228 und 3BP-483.....	13
1.4.1 Synthese und molekulare Strukturen von 3BP-227, -228 und -483.....	13
1.4.2 <i>In-vitro</i> -Eigenschaften von 3BP-227, -228 und -483.....	14
1.5. Fragestellung der Arbeit .....	15
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>16</b>
2.1 Isotopenmarkierung und Qualitätskontrolle .....	16
2.1.1 Isotopenmarkierung .....	16
2.1.2 Qualitätskontrolle, radiochemische Reinheit und spezifische Aktivität .....	16
2.1.3 Radiodünnschichtchromatografie.....	17
2.1.4 Hochleistungsdünnschichtchromatografie .....	18
2.2 Zellkultur.....	19
2.3 Nacktmaustumormodell .....	21
2.4 Biodistributionsstudien und <i>in-vivo</i> -Rezeptorspezifität von <sup>111</sup> In-3BP-227 .....	22
2.4.1 Versuchsablauf .....	22
2.4.2 Parameterbestimmung und Berechnung des Uptakes als %ID/g .....	23
2.5 SPECT/CT-Bildgebung.....	24

2.6 Evaluation Nephrotoxizität .....	26
2.6.1 Parameteranalyse.....	26
2.6.2 Nierenhistologie .....	27
2.7 Datenanalyse.....	28
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>29</b>
3.1 Isotopenmarkierung und Qualitätskontrolle .....	29
3.2 Biodistributionsstudien und <i>in-vivo</i> -Rezeptorspezifität von <sup>111</sup> In-3BP-227 .....	31
3.3 SPECT/CT-Bildgebung.....	39
3.4 Evaluation Nephrotoxizität .....	42
3.4.1 Parameteranalyse.....	42
3.4.2 Nierenhistologie .....	45
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>46</b>
4.1. <sup>111</sup> In-3BP-227, -228, -483 – Tracer und Target .....	46
4.2 Biodistributionsstudien – Vergleich der 3BP-Tracer und Vorläuferverbindungen.....	47
4.3 SPECT/CT-Bildgebungsstudien.....	52
4.4. Beziehung Biodistributions- und SPECT/CT-Bildgebungsstudien .....	52
4.5 Evaluation Nephrotoxizität .....	54
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>57</b>
<b>6. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>58</b>
<b>7. Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>59</b>
<b>8. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>60</b>
<b>9. Danksagung .....</b>	<b>71</b>
<b>10. Erklärung .....</b>	<b>72</b>
<b>11. Bildungsweg.....</b>	<b>73</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<sup>68</sup> Ga	<sup>68</sup> Gallium	MIBG	Metaiodobenzylguanidin
<sup>90</sup> Y	<sup>90</sup> Yttrium	M <sub>Org</sub>	Organmasse
<sup>111</sup> In	<sup>111</sup> Indium	min	Minute
<sup>123</sup> I	<sup>123</sup> Iod	µm	Mikrometer
<sup>131</sup> I	<sup>131</sup> Iod	mm	Millimeter
<sup>177</sup> Lu	<sup>177</sup> Lutetium	mRNA	Messenger-Ribonucleic Acid
<sup>188</sup> Re	<sup>188</sup> Rhenium	MRT	Magnetresonanztomografie
Abb.	Abbildung	natIn	Natürliches Indium
ANOVA	Analysis of Variance	NGAL	Neutrophilen Gelatinase-assoziiertes Lipocalin
A <sub>Org</sub>	Organaktivität	nM	Nanomolar
A <sub>S</sub>	Spezifische Aktivität	NSCLC	Non-Small Cell Lung Cancer
BASS	Somatostatinrezeptor-Antagonist, benannt nach R. T. Bass	NT (7-13)	C-terminales Fragment von Neurotensin, Aminosäuren 7-13
BFCA	Bifunctional chelating Agent	NT (8-13)	C-terminales Fragment von Neurotensin, Aminosäuren 8-13
Ca <sup>2+</sup>	Calcium-Ion	NTR	Neurotensinrezeptor
CD-20	Cluster of Differentiation-20	NTR1	Neurotensinrezeptor 1
cpm	Counts per Minute	NTR2	Neurotensinrezeptor 2
CT	Computertomografie	PAS	Periodic Acid-Schiff
DAG	Diacylglycerin	PET	Positronen-emissionstomografie
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure	p. i.	Post injectionem
DBPS	Dulbecco's Phosphate-buffered Saline	PKC	Proteinkinase C
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure	PRRT	Peptid-Rezeptor-Radionuklid-Therapie
ELISA	Enzyme linked Immunosorbent Assay	R	Korrelationskoeffizient
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor	Radio-TLC	Radio-Thin Layer Chromatography
GEP-NET	Gastroenteropankreatische neuroendokrine Tumore	Ras	Rat Sarcoma, ein G-Protein
G <sub>α</sub> /11	Eine G-Protein-Untereinheit	RCR	Radiochemische Reinheit
GPCR	G Protein-coupled Receptor	R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
h	Stunde	rpm	Rounds per Minute
HE	Hämatoxylin-Eosin	SCLC	Small Cell Lung Cancer
HNSCC	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma	SPECT	Single Photon Emission computed Tomography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	SRS	Somatostatinrezeptor-Szintigrafie
HRP	Horeseradish Peroxidase	SSA	Somatostatinanaloga
HT-29	Eine Zelllinie des humanen Kolonadenokarzinoms	SSTR	Somatostatinrezeptor
ID	Injizierte Dosis	Tab.	Tabelle
I <sub>Org</sub>	Impulsrate im Organ (aus Gammacounter)	TATE	Octreotat
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-triphosphat	TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
i. S.	Im Serum	TOC	Edotretoid
i. U.	Im Urin	UV	Ultraviolett
keV	Kilo-Elektronenvolt	VOI	Volume of Interest
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase	ZNS	Zentrales Nervensystem

# 1. Einführung

## 1.1 Rezeptor-Targeting in der Tumordiagnostik und -therapie

2013 waren Krebserkrankungen mit 25 % der Sterbefälle die zweithäufigste Todesursache in Deutschland (Statistisches Bundesamt 02.02.2015) und laut Weltgesundheitsorganisation 2012 weltweit die zweithäufigste Ursache für Tode infolge nicht übertragbarer Krankheiten. Konventionelle Therapieoptionen umfassen chirurgische Verfahren sowie Chemo- und Radiotherapie – nicht selten kann nur eine supportive Behandlung angeboten werden. Die letzten Jahrzehnte sind geprägt von einem erheblichen Wissenszuwachs um die pathophysiologischen Zusammenhänge der Kanzerogenität, wodurch eine bedeutende Erweiterung des Repertoires therapeutischer Modalitäten gegen maligne Erkrankungen erreicht werden konnte. Die Herausforderung besteht insbesondere darin, Neoplasmen in einem frühen Stadium sicher zu lokalisieren und zu therapieren. Zunehmender Behandlungserfolg kann mittels zielgerichteter Therapeutika, sogenannten Targeted Therapies, erlangt werden. Diese interagieren mit spezifischen Strukturen an oder in Tumorzellen, welche in entartetem Gewebe in hoher Dichte, in gesundem jedoch nicht oder kaum zu finden sind. Einen konkreten Ansatz stellt der Somatostatinrezeptor dar, welcher in einer Reihe von Tumorentitäten überhäufig vorkommt. Die Entwicklung spezifischer Liganden für diese Zielstruktur im Sinne eines Rezeptor-Targeting ermöglicht eine therapeutische Intervention (als Targeted Therapy) und deren Bindung an radioaktive Isotope zusätzlich deren diagnostische Anwendung in der Nuklearmedizin – eine Entwicklung, mit der bedeutende Erfolge erzielt werden konnten.

### 1.1.1 Nuklearmedizinische Tumordiagnostik und -therapie

In der nuklearmedizinischen bzw. nuklearonkologischen Diagnostik und Therapie kommen spezifische und unspezifische Radiopharmaka zum Einsatz.

Dabei kann es sich um Radioisotope als solche oder mit Radioisotopen markierte Moleküle handeln. Unspezifische Radiopharmaka führen ohne tumorspezifische molekulare Zielstruktur zur Anreicherung in Karzinomen und Metastasen. So akkumuliert z. B.  $^{18}\text{F}$ -Fluordesoxyglukose in Gewebe mit erhöhtem Glukoseumsatz bzw. verstärkter Perfusion und ermöglicht somit die Sichtbarmachung mittels Positronenemissionstomografie (PET).

Spezifische Radiopharmaka dagegen interagieren mit bzw. binden konkrete, in der Entität überhäufig vorkommende, molekulare Zielstrukturen (Targets). So wird z. B. der die Iodspeicherung vermittelnde Natrium-Iodid-Symporter als spezifisches Ziel für die szintigrafische Metastasensuche mittels  $^{123}\text{I}$ - ( $^{123}\text{I}$ ) bzw.  $^{131}\text{I}$ -Natriumiodid oder die Radioiodtherapie mit  $^{131}\text{I}$ -Natriumiodid beim follikulären oder papillären differenzierten Schilddrüsenkarzinom

genutzt, wobei das Radioisotop als solches das Pharmakon darstellt und selbst das Target bindet. Im Falle der  $^{123}\text{I}$ -MIBG-Szintigrafie (Metaiodobenzylguanidin) bzw.  $^{131}\text{I}$ -MIBG-Therapie vermittelt im Gegensatz hierzu nicht das damit gebundene Radioisotop die Aufnahme in die Zelle, sondern der Guanethidin-ähnliche Rest. Über einen aktiven Transporter führt er zur spezifischen Aufnahme in die Zellen des neuroendokrinen Systems und kann so bei der Diagnostik und Therapie u. a. von Phäochromozytomen und Neuroblastomen angewendet werden. Daneben werden auch Antigen-Antikörper-Bindungen in der nuklearmedizinischen Praxis genutzt, so z. B. bei Einsatz  $^{131}\text{I}$ - oder  $^{111}\text{In}$ -markierter ( $^{111}\text{In}$ ) CD-20-Antikörper (Cluster of Differentiation-20, B-Lymphozyten-Antigen) zur Darstellung der Bioverteilung vor Radioimmuntherapie CD-20-positiver Non-Hodgkin-Lymphome.

Ein weiterer Mechanismus der nuklearmedizinischen Tumordiagnostik bzw. -therapie ist das Radionuklid-Rezeptor-Targeting, bei dem Oberflächenrezeptoren von Tumoren mittels radioaktiv markierter Rezeptor-Liganden gebunden werden.

### 1.1.2 Prinzip des Rezeptor-Targeting am Beispiel von Somatostatinanaloga

Das in der klinischen Routine am häufigsten zum Einsatz kommende Verfahren auf Grundlage von Rezeptor-Targeting ist der Einsatz Radioisotopen-markierter Somatostatinanaloga (SSA) in der Diagnostik und Therapie von gastroenteropankreatischen, neuroendokrinen Tumoren (GEP-NET, Karzinoidtumoren), die aus entarteten neuroendokrinen Zellen des Respiration- und Gastrointestinaltrakts hervorgehen.

Grundlage ist die Überexpression von Somatostatinrezeptoren (SSTR) auf den Zelloberflächen der meisten GEP-NET (de Herder, W W et al. 2003). Der G-Protein gekoppelte Rezeptor (G Protein-coupled Receptor, GPCR) weist fünf Subtypen mit jeweils unterschiedlicher Verteilung im zentralen Nervensystem (ZNS) und der Peripherie auf. Der Subtyp SSTR<sub>2(a)</sub> wird auf über 80% der GEP-NET-Zellen exprimiert (Reubi et al. 1998a; Reubi et al. 2001). Die physiologischen Liganden Somatostatin-14 und -28 sind für eine pharmakologische Anwendung aufgrund ihrer kurzen biologischen Halbwertszeit ungeeignet.

Durch die Herstellung von SSA mit höherer biologischer Stabilität gelang die klinische Nutzbarmachung. SSA bilden mit den SSTR Liganden-Rezeptor-Komplexe, welche von der Zelle internalisiert werden, wodurch es zur zytoplasmatischen Akkumulation kommt. Dieser Mechanismus wird klinisch ausgenutzt. So wird das  $^{111}\text{In}$ -markierte Pentetretotid (OctreoScan®) und andere Radionuklid-gebundenen SSA für die Somatostatinrezeptorszintigrafie (SRS), auch in Form von Single Photon Emission computed Tomography (SPECT), als Tracer mit vorrangiger SSTR<sub>2(a)</sub>-Bindung verwendet und hiermit eine Gesamtsensitivität für alle gut differenzierten GEP-NET und deren Metastasen von 80 % erreicht. Die SRS spielt in Verbindung mit konventioneller anatomischer Bildgebung wie Computertomografie (CT) und Mag-

netresonanztomografie (MRT) eine wichtige Rolle in der Primärdiagnostik und beim Therapiemonitoring dieser Tumoren. Außerdem wird sie verwendet um die Wirksamkeit der Behandlung mit SSA abzuschätzen und Patienten für eine Peptid-Rezeptor-Radionuklid-Therapie (PRRT) auszuwählen (Oberge et al. 2004; Bodei et al. 2013). Die Somatostatinrezeptor-PET(-CT) mittels der  $^{68}\text{Ga}$ -markierten ( $^{68}\text{Ga}$ ) und 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure (DOTA) konjugierten Tracer Octreotid (-NOC), Octreotat (-TATE) sowie Edotreotid (-TOC) und weitere, welche sich durch ihre SSTR-Affinitätsprofile unterscheiden, stellt eine Fortentwicklung der SRS dar. Aufgrund der höheren Rezeptoraffinität ihrer Tracer, der höheren Auflösung, der gesteigerten Sensitivität von 90 % und der besseren Durchführbarkeit kommt sie zunehmend zum Einsatz und löst die SRS nach und nach ab (Sundin 2012; Wild et al. 2013; Haug et al. 2012; Schraml et al. 2013; Ambrosini et al. 2012).

Auch therapeutisch wird die SSTR-Positivität der meisten GEP-NET genutzt. So kommen neben chirurgischen Verfahren, Biologicals und Zytostatika auch SSA zum Einsatz. Verwendet werden SSA in ungebundener und radioaktiv markierter Form. SSA in ungebundener Form, Octreotid und Lanreotid, dienen der Symptomkontrolle bei Karzinoid-Syndrom und anderer durch die Hormonsekretion der Tumoren verursachten Beschwerdebilder, womit sie zur Verbesserung der Lebensqualität beitragen (Baldelli et al. 2014), und bewirken zum Teil, wie in klinischen Studien nachgewiesen, eine Verlangsamung des Tumorwachstums, jedoch ohne zytoreduktiven Effekt (Rinke et al. 2009; Caplin et al. 2014). Bei der PRRT werden radioaktiv markierte Analoga verwendet, welche durch den oben beschriebenen Mechanismus in das Zytoplasma der rezeptortragenden Tumorzelle gelangen und so eine intrazelluläre Radiation bewirken, was zur Zytoreduktion führen kann. Die PRRT ist eine effektive Therapie v. a. bei fortgeschrittenen NET (Brabander et al. 2016). Gute Ergebnisse konnten mit den  $^{90}\text{Y}$ -markierten ( $^{90}\text{Y}$ ) Substanzen DOTA-TOC oder DOTA-TATE sowie  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-TATE ( $^{177}\text{Lu}$ ) erzielt werden. So zeigte die Behandlung mit  $^{90}\text{Y}$ -DOTA-TOC bzw. -TATE in 4-34 % der Fälle mit NET Komplett- oder Partialremission (Imhof et al. 2011; Waldherr et al. 2002; Valkema et al. 2006; Forrer et al. 2006; Bushnell et al. 2010; Cwikla et al. 2010). Mit  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-TATE konnte dieses Ergebnis in 13-60 % der Fälle erzielt werden (Kwekkeboom et al. 2008; Bodei et al. 2011; Ezziddin et al. 2014; Sabet et al. 2015). Die parallele Applikation von  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-TATE und  $^{90}\text{Y}$ -DOTA-TATE im Vergleich zur alleinigen Gabe von  $^{90}\text{Y}$ -DOTA-TATE erbrachte ein höheres Gesamtüberleben (Kunikowska et al. 2011).

Diese Formen der PRRT gelten als sichere Therapien (Brabander et al. 2016), dennoch treten in relativ geringem Maße Nebenwirkungen auf. Einerseits kann es zu meist milden, akuten unerwünschten Wirkungen wie Übelkeit, Erbrechen und Schmerzzunahme im Bereich



des Tumors bei Injektion bis wenige Tage danach kommen. Diese sind in der Regel symptomatisch kontrollierbar (Kwekkeboom et al. 2000). Andererseits können aufgrund der Radio-toxizität ernste Schädigungen in gesunden Organen auftreten. Gefährdet sind v. a. das Knochenmark und die Nieren – deren erreichte Aufnahme als Dosislimitation gelten – wie auch in geringerem Maße die Leber.

Die verursachte Myelotoxizität reicht von transienter Myelodepression mit oder ohne Transfusionsbedürftigkeit bis hin zur seltenen Entwicklung eines myelodysplastischen Syndroms. In klinischen Studien zeigten sich überwiegend reversible hämatotoxische Nebenwirkungen bei 11 % bzw. 9,5 % der Patienten nach Gabe von  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-TATE (Sabet et al. 2013; Kwekkeboom et al. 2008) und in 12,8 % bzw. 14,2 % der Fälle nach Applikation von  $^{90}\text{Y}$ -DOTAT-TATE (Bodei et al. 2015; Imhof et al. 2011).

Die meisten radiomarkierten Peptide werden renal ausgeschieden und zu unterschiedlichen Anteilen reabsorbiert, was eine erhebliche renale Strahlendosis zur Folge haben kann (Konijnenberg et al. 2004). Die Koapplikation von Aminosäuren kann die Aufnahme der Radiopeptide in den Nieren signifikant senken (Rolleman et al. 2003). In histologischen Untersuchungen von Nierenbiopsien von  $^{90}\text{Y}$ -DOTA-TOC-behandelten Patienten ließen sich thrombotische Mikroangiopathien und tubuläre Veränderungen nachweisen (Moll et al. 2001). Auch die Gabe von  $^{90}\text{Y}$ -DOTA-TATE führte zu einer renalen Schädigung bei 6-9 % der Patienten bis hin zur terminalen Niereninsuffizienz (Cybulla et al. 2001; Imhof et al. 2011; Bodei et al. 2015). Die Behandlung mit  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-TATE erbrachte bei 0,4-1,3 % der Fälle nephrotoxische Nebenwirkungen (Kwekkeboom et al. 2008; Sabet et al. 2013).

Hepatotoxizität ist selten und bei Auftreten meist blande und reversibel (Forrer et al. 2007).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die SSTR-vermittelten Verfahren die Bandbreite der Diagnostik und Therapie von GEP-NET entscheidend erweitert haben.

Ein neuerer Ansatz ist die Verwendung von SSTR-Antagonisten anstatt -Agonisten. So konnte in präklinischen Studien gezeigt werden, dass die Aufnahme des Antagonisten  $^{111}\text{In}$ -DOTA-BASS (pNO<sub>2</sub>-Phe-c(DCys-Tyr-DTrp-Lys-Thr-Cys)DTyrNH<sub>2</sub>, benannt nach R. T. Bass, Bass et al. 1996) im Tumor höher als die des Agonisten ist (Wild et al. 2011). Dieses Verhalten lässt sich dadurch erklären, dass DOTA-BASS an mehr Rezeptorbindungsstellen koppelt als DOTA-TATE (Cescato et al. 2011).

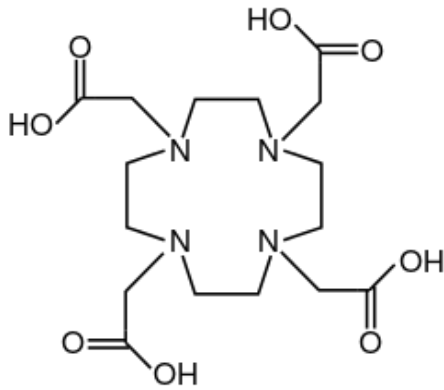
### 1.1.3 Entwicklung eines Tracers für das Radionuklid-Rezeptor-Targeting

#### 1.1.3.1 Anforderungen und Ablauf der Entwicklung eines Tracers für das Radionuklid-Rezeptor-Targeting

An die Entwicklung eines Tracers auf der Grundlage des Rezeptor-Targetings bestehen folgende Anforderungen: Zunächst muss ein molekulares Target, in dem Fall ein Rezeptor, ausgemacht werden, das in einer relevanten Entität überhäufig, also in hoher Dichte, und in gesundem Gewebe nicht oder nur in geringem Maße exprimiert wird. Hiernach muss ein Agens identifiziert werden, welches eine hohe Affinität für das Target und ausreichende metabolische Stabilität aufweist. Auch die Methode der Isotopenmarkierung, welche abhängig vom zu verwendenden Radionuklid ist, hat entscheidenden Einfluss auf Stabilität, Spezifität und Affinität. Das Radionuklid wird nach Eignung für den diagnostischen und/oder therapeutischen Einsatz gewählt, determiniert durch die jeweiligen Zerfallseigenschaften, Verfügbarkeit und Kosten. Mit dem Markierungsverfahren sollte eine hohe radiochemische Ausbeute bzw. Reinheit und spezifische Aktivität erzielbar sein. Im Anschluss muss eine *in-vitro*-Charakterisierung vorgenommen werden um etwa die Rezeptorbindungsaffinität, *in-vitro*-Stabilität und Internalisierung in die rezeptortragenden Zellen zu evaluieren. Es folgt die *in-vivo*-Charakterisierung, wie die Testung der *in-vivo*-Stabilität, Biodistributions- und Bildgebungsstudien in einem geeigneten Tumormodell, üblicherweise an Nacktmäusen. Auf dieser Stufe befindet sich die Entwicklung der Tracer, mit denen sich diese Arbeit befasst. Toxikologische Studien im Tiermodell und Untersuchungen zur Abschätzung der Dosis, welche im Patienten erreicht werden sollen, vervollständigen die präklinische Evaluation, woran sich klinische Studien der Phasen I, II und III anschließen (Dash et al. 2015).

#### 1.1.3.2 Strategien der Radionuklidmarkierung

Die Radionuklidmarkierung kann direkt oder indirekt erfolgen. Bei der direkten Radionuklidmarkierung werden natürlich auftretende funktionelle Gruppen verwendet um Isotope zu binden. Die indirekte Radionuklidmarkierung mittels Einführung von bifunktionellen Chelatbildnern (BFCA, Bifunctional chelating Agent) erfolgt über metabolisch resistente kovalente Bindung direkt an den Tracer oder über sogenannte Linker. BFCA bilden stabile Komplexe hoher Ausbeute mit metallischen Radionukliden (Liu 2008). Zur Verfügung stehen azyklische, wie z. B. Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA), und zyklische BFCA. Verbindungen mit letzteren sind wesentlich stabiler. DOTA (**Abb. 1**), als zyklischer BFCA, findet derzeit die breiteste Anwendung in der PRRT und gilt aufgrund seiner kinetischen Robustheit als beste Wahl (Dash et al. 2015).



**Abbildung 1** Strukturformel von 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure (DOTA).

### 1.1.3.3 Wahl des Radionuklids

Die elektromagnetische Strahlung der  $\gamma$ -Emission kann aufgrund ihres hohen Durchdringungsvermögens in der Diagnostik verwendet werden. Die Radiotoxizität wird hierbei von der Energie der  $\gamma$ -Photonen und der eingesetzten Dosis bestimmt. Partikel-emittierende Radioisotope sowie Nuklide, die durch Elektroneneinfang und interne Konversion zerfallen und damit Auger- und Coster-Kroning-Elektronen emittieren, eignen sich aufgrund dieser lokalisierten (geringes Durchdringungsvermögen), ionisierenden Strahlung zur therapeutischen Applikation.

Die Verwendung von DOTA erlaubt die Komplexierung metallischer Radionuklide, wie  $^{68}\text{Ga}$  zur PET-Diagnostik,  $^{111}\text{In}$  für die Szintigrafie bzw. SPECT, sowie  $^{90}\text{Y}$  oder  $^{177}\text{Lu}$  zur Therapie. Somit ist es für die Synthese von Tracern, die durch die Bindung verschiedener Isotope gleichermaßen als Diagnostikum und Therapeutikum, auch als Theranostikum bezeichnet, geeignet.

In dieser Arbeit wird  $^{111}\text{In}$  zur Markierung der Tracer verwendet.  $^{111}\text{In}$  hat eine Halbwertszeit von 2,81 Tagen, bei dessen Zerfall  $\gamma$ -Photonen einer mittleren Energie von 171 und 245 keV (Kilo-Elektronenvolt) entstehen. Außerdem werden Konversions- (245 keV) und Auger-Elektronen (25 keV) mit einer maximalen Reichweite im Gewebe von 550 bzw. 10  $\mu\text{m}$  frei.  $^{111}\text{In}$  wird vorrangig diagnostisch eingesetzt, in hoher Dosis appliziert hat es auch therapeutisches Potential (zu diesem Zweck nicht in klinischer Anwendung).

Die Wahl des Radionuklids für den therapeutischen Einsatz richtet sich u. a. nach der Größe des Tumors. So haben z. B. die  $\beta^-$ -Partikel von  $^{90}\text{Y}$  eine maximale Reichweite im Gewebe von 12 mm und die von  $^{177}\text{Lu}$  3 mm.  $^{90}\text{Y}$  emittiert ausschließlich  $\beta^-$ -Partikel, wohingegen beim Zerfall von  $^{177}\text{Lu}$  zusätzlich  $\gamma$ -Photonen frei werden, welche auch diagnostisch genutzt werden können, z. B. zur intratherapeutischen Bildgebung für die Visualisierung und Quantifizierung der Anreicherung im Zielgewebe und der absorbierten Dosis.

## 1.2 Neurotensin und Neurotensinrezeptoren

Der diagnostische und therapeutische Erfolg, der, wie oben beschrieben, mit Somatostatinanaloga (bzw. -antagonisten) erzielt werden konnte, bildet die Grundlage der Entwicklung und Etablierung der nuklearenkologischen Methodik der rezeptorgesteuerten Diagnostik und Therapie. Ebenso wie SSTR werden auch andere Neuropeptidrezeptoren auf den Zellmembranen von Tumoren überexprimiert. Insbesondere die Rezeptoren für Neurotensin, Bombesin und Neuropeptid-Y stellen sich als Targets mit hohem Potential für eine derartige Anwendung dar. Diese Arbeit fokussiert auf den Neurotensinrezeptor 1 als Zielstruktur.

### 1.2.1 Anatomie und Physiologie des neurotensinergen Systems

1973 wurde Neurotensin von Carraway und Leeman aus bovinen Hypothalami isoliert. Es handelt sich um ein Tridekapeptid (pGlu-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu), das aus dem Vorläuferprotein Proneurotensin/Neuromedin N entsteht und aus dem sich auch Neuromedin N ableitet. Es wirkt einerseits als Neurotransmitter und andererseits als parakrines und endokrines Hormon in der Peripherie. Neurotensinrezeptoren (NTR) kommen im zentralen Nervensystem und peripheren Gewebe vor (Carraway und Leeman 1973; 1976).

In ersterem spielt Neurotensin als Neuromodulator eine Rolle, etwa im dopaminergen System, wobei es für den Morbus Parkinson von Bedeutung ist, sowie bei der Opioid-unabhängigen Analgesie und der Hormonsekretion des Hypophysenvorderlappens, z. B. bei der Inhibition der Nahrungsaufnahme. Es gilt als potenter Effektor einer Hypothermie und ist in die Pathophysiologie der Schizophrenie involviert (Kitabgi 2002). Die zentralnervöse Bedeutung des Neurotensin/NTR-Komplexes ist Gegenstand aktueller Forschung, bleibt bei den Untersuchungen diese Arbeit jedoch unberücksichtigt.

Stimuliert durch Lipidingestion wird Neurotensin gastrointestinal von enteroendokrinen N-Zellen sezerniert, welche im distalen Darm lokalisiert sind (Polak et al. 1977; Draviam et al. 1987; Rosell und Rökaeus 1979). Der Neurotensin/NTR-Komplex ist hier beteiligt an der Stimulation der Sekretion des Pankreas, sowie von Gallen- und Magensäure (Sakamoto et al. 1984), der Begünstigung der Fettsäureabsorption, der Stimulation der Dickdarmmotilität (Thor und Rosell 1986), der Inhibition der Magen- und Dünndarmmotilität (Andersson et al. 1977) und an der mukosalen Immunantwort des Darms (Evers et al. 1994; Lemaire 1988). Außerdem wurde experimentell in Ratten gezeigt, dass er Zellwachstum in einer Reihe von gesundem, gastrointestinalen Gewebe vermittelt, wie im Pankreas, Magenantrum, Dünndarm und Dickdarm (Feurle et al. 1987; Wood et al. 1988a; 1988b; Evers et al. 1992b; 1992a). Das

sechs Aminosäuren lange C-terminale Fragment von Neurotensin, NT(8-13), vermittelt als Bindungssequenz die Aktivierung des NTR (White et al. 2012; Vincent et al. 1999).

Bisher wurden drei NTR identifiziert. Der Neurotensinrezeptor 1 (NTR1) und der Neurotensinrezeptor 2 (NTR2) sind GPCR, welche aufgrund ihrer Struktur zur Familie der 7-Transmembrandomänen-Rezeptoren gehören. Der Neurotensinrezeptor 3 ist nicht G-Protein gekoppelt und weist die Struktur einer einzelnen transmembranösen Domäne auf (Petersen et al. 1997).

Neurotensin bindet den NTR1 mit hoher, den NTR2 mit geringerer Affinität. Neuromedin N ist ein weiterer niedrig affiner Agonist für den NTR2, das Pharmakon Levocabastin bindet ihn ebenso agonistisch (Alexander, Stephen P H et al. 2013; Vincent et al. 1999; Mazella und Vincent 2006).

NTR1 ist die Zielstruktur der Untersuchungen dieser Arbeit. Der GPCR, der aufgrund seiner subnanomolaren Affinität für Neurotensin der primäre Mediator für das Peptidhormon und damit verantwortlich für seine physiologischen und pathologischen Effekte ist, besteht aus 418 Aminosäuren (White et al. 2012; Tanaka et al. 1990). Peripher kommt er vorrangig in Dünn- und Dickdarm sowie der Leber vor (Johnson 2012, S. 167). Die durch den Neurotensin/NTR1-Komplex induzierten Signaltransduktionskaskaden wurden an Tumorzelllinien erforscht (siehe unten).

### 1.2.2 Biochemie und Pathobiochemie des neurotensinergen Systems

1993 entwickelten Gully et al. einen selektiven, nicht peptidischen, organischen Antagonisten hoher NTR1- und geringerer NTR2-Affinität, bezeichnet als SR48692. Er inhibiert Neurotensin kompetitiv, weist keinen residualen Agonismus auf und vermindert so konzentrationsabhängig die Neurotensin-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausschüttung in der humanen Kolonadenokarzinomzelllinie, HT29 (Gully et al. 1993). Die Verfügbarkeit des Antagonisten erweiterte das methodische Spektrum der Erforschung des neurotensinergen Systems.

Die Stimulation des NTR1 durch Neurotensin führt zur Aktivierung seiner Second Messenger sowie in 60-70 % der Fälle zur Internalisierung des Liganden-Rezeptor-Komplexes (Chabry et al. 1994).

Die Signaltransduktion des NTR1 nach Neurotensinbindung führt über seine G-Protein-Untereinheit  $G_{\alpha q/11}$  zur Aktivierung der Phospholipase C (Wang und Wu 1996; Najimi et al. 2002). Diese spaltet Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat in Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $\text{IP}_3$ ) und Diacylglycerin (DAG).  $\text{IP}_3$  induziert die Mobilisation von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem endoplasmatischen Retikulum, welches, wie auch DAG, die Proteinkinase C (PKC) aktiviert (Snider et al. 1986; Turner et al. 1990). Intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  und die PKC vermitteln die physiologischen

und onkogenetischen Effekte des Neurotensin/NTR1-Komplexes. Die durch sie induzierten Signaltransduktionkaskaden sind vielfältig, zellabhängig und potentiell beteiligt an Zellproliferation, -überleben, -migration, -invasion und Neoangiogenese.

Die induzierte PKC führt Ras-unabhängig (Ras - Rat Sarcoma, ein G Protein), vermittelt durch Raf-1 (rapidly accelerated Fibrosarcoma-1, eine Proteinkinase), zur Aktivierung von der Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK). Alternativ erfolgt die MAPK-Induktion über die Transaktivierung des Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR; Guha et al. 2003). Die EGFR-Transaktivierung kann dabei PKC-abhängig wie z. B. in der Prostatakarzinomzelllinie, PC3 (Prostate Cancer-3, Hassan et al. 2004), oder PKC-unabhängig wie im Fall der humanen Kolonkarzinomzelllinie, HT29 (Müller et al. 2011), stattfinden. Insgesamt ist von einer synergistischen, auf vielfältige Weise verknüpften Wirkung des neurotensinergen und EGFR-Systems auszugehen (Wu et al. 2012). Die so induzierte Aktivierung der MAPK-Kaskade führt zur Gentranskription und ist assoziiert mit unkontrolliertem Zellwachstum (Harikumar et al. 2010; Kisfalvi et al. 2010).

Über die Modulation der small Rho-GTPasen (Ras homologue, Guanosintriphosphat) Rac1 (Ras-related C3 Botulinum Toxin Substrate 1), Cdc42 (Cell Division Control Protein 42) und RhoA, welche das Zytoskelett beeinflussen, hat das neurotensinerge System fördernden Effekt auf die Zellmigration (Zhao et al. 2003; Servotte et al. 2006).

In vom humanen Mammaadenokarzinom stammenden MCF-7-Zellen (Michigan Cancer Foundation-7) konnten antiapoptotische Effekte von Neurotensin, vermittelt durch die MAPK-abhängige Erhöhung der Bcl-2-mRNA- (B-cell Lymphoma 2, Messenger-Ribonucleic Acid) und -Protein-Konzentration, nachgewiesen werden (Somaï et al. 2002).

Ushiro et al. zeigten 1997, dass das Neurotensinanalogon TJN-950 *in vitro* die Migration vaskulärer Endothelzellen erhöht, sowie *in vivo* zur Neovaskularisation führt.

### 1.2.3 Pathologie des neurotensinergen Systems

Zur Evaluation der Rezeptorexpression in Tumoren und vergleichsweise in gesundem Gewebe kommen die quantitative Rezeptorautoradiografie und die semiquantitative Immunochemie bzw. -histochemie zur Anwendung. Zusätzlich werden Rezeptor-mRNA- und Neurotensinkonzentrationen in Tumoren untersucht. So konnte gezeigt werden, dass NTR in einer Reihe von Tumorzelllinien und humanen Tumoren – mit zum Teil erheblicher epidemiologischer Bedeutung und/ oder infauster Prognose – vorkommen.

NTR1-exprimierende Tumorzelllinien sind zahlreich, darunter z. B. welche stammend vom nichtkleinzelligen Lungenkarzinom, Neuroblastom und Kolonkarzinom, wie HT29 (Reubi 2003; Haase et al. 2006; Kitabgi 2002; Vita et al. 1993).

Klinisch relevant ist v. a. der NTR-Nachweis in Tumorgewebe, das primär Erkrankten entnommen wurde. Es zeigt sich eine Überexpression in den meisten Meningeomen (Przedborski et al. 1991), im Ewing-Sarkom (Reubi et al. 1999), im duktalem Pankreasadenokarzinom, invasiv duktalem Mammakarzinom, Prostatakarzinom, kleinzelligen und nicht kleinzelligen Lungenkarzinomen, Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereichs, Kolonkarzinom (siehe unten) und mit geringerer Inzidenz im Astrozytom, Medulloblastom und medullären Schilddrüsenkarzinom (Reubi et al. 1999; Haase et al. 2006).

1998 zeigten Reubi et al., dass 75 % der **duktalem Pankreasadenokarzinome** (Pancreatic duktal Adenocarcinoma, PDAC) NTR exprimieren, während gesundes pankreatisches Gewebe, Proben chronischer Pankreatitis oder endokrine Pankreaskarzinome Rezeptor-negativ waren. 2015 wies seine Arbeitsgruppe den Rezeptor außerdem in 14 von 23 untersuchten Lebermetastasen von PDAC als Positiv nach. Außerdem ist ein mit dem Stadium zunehmender Anteil von pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN), als Vorläuferläsionen des PDAC, Rezeptor-positiv (5 von 7 PanIN im Stadium 3, Körner et al. 2015). In einem PDAC-Xenograft-Modell konnte bereits 1997 von Iwase et al. ein neurotensindosis-abhängiges Tumorwachstum demonstriert werden, welches durch SR48692 inhibiert werden konnte.

91 % **der invasiv duktalem Mammakarzinome** sind NTR1-positiv (Souazé et al. 2006). Es besteht eine positive Korrelation zwischen dem Maß der NTR1-Expression und der Tumorgroße, Anzahl der metastasenbefallenen Lymphknoten, Rezidivrate und Sterblichkeit (Dupouy et al. 2009). Gesunde epitheliale Zellen der Brustdrüse exprimieren den NTR1 nicht (Evers 2006).

Im Falle des **Prostatakarzinoms** lässt sich der Neurotensin/NTR-Komplex in fortgeschrittenen Stadien nachweisen, nicht aber in gesunden epithelialen Zellen des Organs und wirkt als Androgen-unabhängiger Progressor des Tumorwachstums (Sehgal et al. 1994). *In vitro* nimmt die NTR1-Expression mit der Kanzerogenität der Prostatakarzinomzellen zu (Taylor et al. 2012). NTR1-Positivität steht im Zusammenhang mit der Strahlenresistenz der Tumoren, bei Antagonisierung durch SR48692 erhöht sich die Sensibilität gegenüber ionisierender Strahlung (Valerie, Nicholas C K et al. 2011).

Neurotensin wird von einem großen Anteil **kleinzelliger Lungenkarzinome** (Small Cell Lung Cancer, SCLC) produziert und sezerniert (Moody et al. 1985; Wood et al. 1981). NTR1 wird von SCLC-Zellen exprimiert (Allen et al. 1988). *In vitro* konnte eine Steigerung der klonalen Wachstumsrate auf 189 % durch Zugabe von Neurotensin und eine Senkung derselben durch Applikation von SR48692 auf 16 % gezeigt werden (Moody et al. 2001). Im SCLC-Xenograft erzielte die Injektion von SR48692 eine Verringerung der Tumorzellproliferation

auf 1 % (Jensen und Moody 2006). Neurotensin kann demnach als autokriner Wachstumsfaktor für das SCLC angesehen werden (Moody et al. 2015). Etwa 60 % der Adenokarzinome der Lunge im Stadium I, als eine Form des **nichtkleinzelligen Lungenkarzinoms** (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC), sind NTR1-positiv, eine Eigenschaft, welche mit geringeren Überlebensraten assoziiert ist (Alifano et al. 2010b). Ca. 15 % der NSCLC weisen eine aktivierende Mutation des EGFR auf, bei deren Vorliegen Tyrosinkinaseinhibitoren therapeutisch eingesetzt werden können (Lynch et al. 2004; Paez et al. 2004). *In vitro* konnte in diesem Zusammenhang eine synergistische, proliferationshemmende Wirkung auf NSCLC durch SR48692 und den Tyrosinkinaseinhibitor Gefitinib nachgewiesen werden (Moody et al. 2014).

Des Weiteren exprimieren 90 % **der malignen Pleuramesotheliome** NTR1, die Neurotensinexpression korreliert dabei mit schlechterer Prognose (Alifano et al. 2010a).

Shimizu et al. konnten für **Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereichs** (Head and Neck Squamous Cell Carcinomas, HNSCC) zeigen, dass erhöhte Level der Expression von Neurotensin- und NTR1-mRNA einen signifikanten, negativen Einfluss auf das metastasenfrem Überleben hatten. *In vitro* bewirkte die Gabe von NTR-Agonisten zelluläre Invasion, Migration und die Induktion verschiedener mRNA, wie die für Interleukin 8 und Matrix-Metalloproteinase 1, als Faktoren der Tumorphathogenese. Eine Reduktion der NTR1-Expression durch den Einsatz von Small Interfering RNA (siRNA) minderte die Invasion und Migration der HNSCC-Zelllinie (Shimizu et al. 2008).

Neurotensin wird im fetalen Kolon exprimiert, wo es als physiologischer Wachstumsfaktor der Ontogenese dient (siehe oben), kann hiernach aber nicht mehr oder nur kaum noch nachgewiesen werden. Für die Entität des **Kolonadenokarzinoms** ermittelten Gui et al. eine zunehmende NTR1-mRNA-Expression mit steigendem Entartungsgrad entsprechend der Adenom-Karzinom-Sequenz und in Fortführung dieses Kontinuums mit zunehmender Infiltrationstiefe des manifesten Karzinoms (Gui et al. 2008).

Aufgrund der Überexpression von NTR1 auf vielen primären, humanen Tumoren stellen die Rezeptoren ein geeignetes Ziel für molekulare Bildgebung mittels SPECT und PET sowie Targeted Therapy dar.



### 1.3 Pharmakologische Liganden des Neurotensinrezeptor 1

Für den Versuch der pharmakologischen Interaktion mit dem NTR1 bestehen zwei Ansätze. Einerseits wird der physiologische Ligand, Neurotensin, in Form von peptidischen bzw. peptidomimetischen Neurotensinanaloga nachgeahmt, andererseits finden Rezeptor-antagonisten Verwendung.

#### 1.3.1 Radionuklid-markierte Neurotensinanaloga

Neurotensin bzw. NT(8-13) wird im Blutplasma schnell von endogenen Peptidasen abgebaut (Reubi 2003; Bourdel et al. 1996) und ist deshalb in unveränderter Form für einen pharmakologischen Einsatz ungeeignet. Innerhalb von NT(8-13) sind z. B. die Bindungen Arg<sup>8</sup>-Arg<sup>9</sup> und Pro<sup>10</sup>-Tyr<sup>11</sup> Ziele von proteolytischen Enzymen und Ansatzpunkte für Derivatisierungen (Bergmann et al. 2002). Bemühungen die metabolische Stabilität zu erhöhen ohne die Targetspezifität zu verringern, konzentrierten sich auf verschiedene Modifikationen wie z. B. durch die Verwendung von stabileren D- anstatt natürlicher L-Aminosäuren, pseudo-peptidischen Bindungen, Aminoalkoholen, unnatürlichen Aminosäuren oder Aminosäuren mit veränderten Seitenketten (Dash et al. 2015).

Die untersuchten Neurotensinanaloga erzielten teilweise eine hohe Tumoraufnahme, welche jedoch in vielen Fällen durch unspezifische Anreicherung in gesundem Gewebe wie z. B. in den Nieren kompromittiert wurde. Die einzelnen bisher entwickelten Neurotensinanaloga werden im Vergleich zu den in dieser Arbeit untersuchten Tracern an späterer Stelle beschrieben.

#### 1.3.2 Antagonisten des Neurotensinrezeptor 1

1997 entwickelten Gully et al. den NTR-Antagonisten SR142948A. Die NTR-Affinität dieser Substanz übersteigt die von SR48692 (oben beschrieben), sodass sie letztere aus ihrer spezifischen Rezeptorbindung verdrängt. Es inhibiert die oben dargelegten biochemischen Effekte des Neurotensin/NTR-Komplexes (Gully et al. 1997). So hemmt SR142948A z. B. *in vitro* und *in vivo* die kardiovaskulären Effekte von Neurotensin bei wesentlich geringeren Konzentration als SR48692 (Schaeffer et al. 1998).

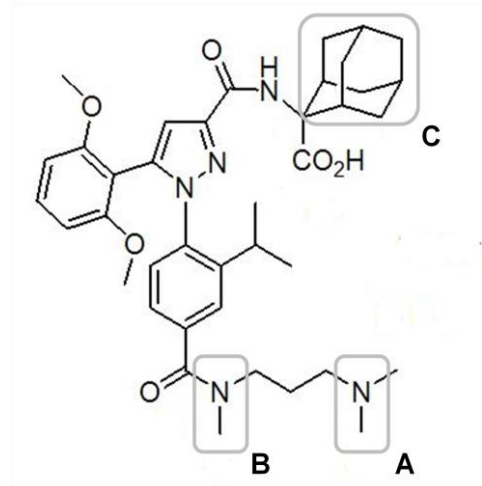
2013 entwickelten Lang et al. das SR142948A-Derivat Diarylpyrazolglucokonjugat 8 (siehe unten) für die Diagnostik mittels PET (Lang et al. 2013).

## 1.4 Die Tracer 3BP-227, 3BP-228 und 3BP-483

Analog zu den neuesten Entwicklungen im Falle des SSTR-Targeting, im Rahmen derer sich eine präklinische Überlegenheit von Rezeptor-Antagonisten gegenüber den Agonisten abzeichnet (siehe oben) entwickelte 3B Pharmaceuticals (Berlin) antagonistische Radiotracer für den NTR1 (Osterkamp et al. 2012).

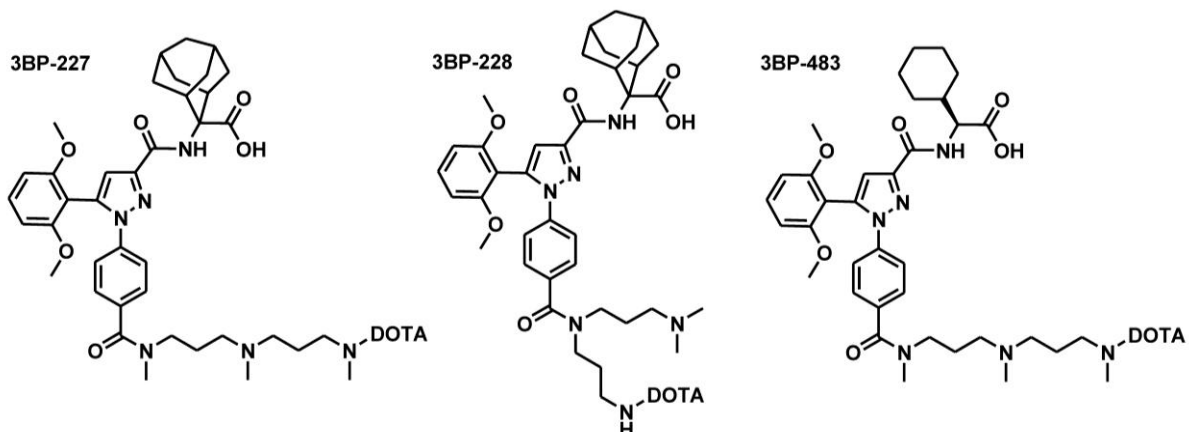
### 1.4.1 Synthese und molekulare Strukturen von 3BP-227, -228 und -483

Für die Synthese der Tracer 3BP-227, -228 und -483 modifizierten Osterkamp et al. verschiedene Strukturelemente von SR142948A (**Abb. 2**) um es mit DOTA über den Short Linker, Ethylendiamin, binden zu können. Hierfür wurde für die Herstellung von 3BP-227 eine der Methylgruppen der Dimethylaminogruppe (A in **Abb. 2**) von SR142948A und für 3BP-228 die Methylgruppe in der Benzamidposition (B in **Abb. 2**) des NTR1-Antagonisten verändert. 3BP-483 ist eine Variation von 3BP-227 mit einer Cyclohexyl- anstelle einer Adamantylgruppe (C in **Abb. 2**). Die Strukturformeln der Tracer zeigt **Abbildung 3**.



**Abbildung 2** Der NTR-Antagonist SR142948A. Mit A-C werden die Positionen des Moleküls markiert, welche zur Bindung der Ethylendiamin-DOTA-Gruppe für die Tracer 3BP-227 (**A**), -228 (**B**) und -483 (**A und C**) modifiziert wurden.

**Abbildung 3** Strukturformeln der DOTA-konjugierten Tracer 3BP-227, 3BP-228 und 3BP-483.



### 1.4.2 *In-vitro*-Eigenschaften von 3BP-227, -228 und -483

Die *in-vitro*-Eigenschaften der Verbindungen wurden von Osterkamp et al. evaluiert.

Um die Wirkung der Substanzen auf den NTR1 zu untersuchen wurde die  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisation ( $\text{Ca}^{2+}$  als Second Messenger von NTR1 – siehe oben) unter Zuhilfenahme eines  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Farbstoffs in rezeptorpositiven Zellen *in vitro* ermittelt – es handelte sich um die Standardmethode des funktionellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisations-Tests (Thomsen et al. 2005). Keiner der Tracer bewirkte hierbei eine detektierbare  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisation. Neben dieser agonistischen wurde auch die antagonistische Potenz bzw. inhibitorische Aktivität bestimmt und ausgedrückt als  $\text{IC}_{50}$  – derjenigen Konzentration, die nötig war um einen halbmaximalen inhibitorischen Effekt auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisation hervorzurufen. Die mit natürlichem Indium ( $^{\text{nat}}\text{In}$ ) markierten Verbindungen 3BP-227 und 3BP-228 zeigten eine hohe inhibitorische Aktivität mit einer  $\text{IC}_{50}$  von 5,35 bzw. 14,4 nM,  $^{\text{nat}}\text{In}$ -3BP-483 bot die geringste antagonistische Potenz mit einer  $\text{IC}_{50}$  von 75 nM. Alle drei Verbindungen sind demnach volle NTR1-Antagonisten ohne residualen Agonismus.

Die Affinität der Tracer wurde mittels kompetitivem Radioligandenbindungstest evaluiert (Vita et al. 1993). Die ermittelte  $\text{IC}_{50}$  gab dabei an, welche Konzentration der Testsubstanz einzusetzen war um radioaktiv markiertes Neurotensin ( $[\text{}^{125}\text{I}]\text{Tyr}^3\text{-Neurotensin}$ ) von NTR1-positiven Zellen halbmaximal zu verdrängen. Als Kontrolle wurde nicht markiertes Neurotensin verwendet und ergab eine  $\text{IC}_{50}$  von  $0,33 \pm 0,15$  nM, 3BP-227 von  $2,1 \pm 1,2$  nM, 3BP-228 von 3,4 nM (Einfachbestimmung) und  $^{111}\text{In}$ -3BP-227 von 0,76 nM (Einfachbestimmung). Bei den untersuchten Verbindungen ist demnach von einer hohen NTR1-Affinität auszugehen. 3BP-483 wurde nicht untersucht.

Die Stabilität der Substanzen wurde in humanem und murinem Plasma analysiert. Nach 24 Stunden Inkubation im jeweiligen Milieu wurde der verbliebene Anteil der Verbindung bestimmt und nach Metaboliten mittels Flüssigkeitschromatografie/ Massenspektrometrie gesucht. Die Stabilität von 3BP-227 war in den Plasmen beider Spezies mit > 90 % sehr hoch, die von 3BP-228 etwas niedriger mit Werten von > 80 % in murinem und > 70 % in humanem Plasma. Die Markierung von 3BP-227 mit nicht radioaktivem Indium verringerte den intakten Anteil in humanem Plasma auf > 80 %, das Ergebnis in murinem blieb unverändert gegenüber der metallfreien Verbindung. Metaboliten konnten nicht nachgewiesen werden. Insgesamt sprechen diese Ergebnisse für eine hohe Plasmastabilität (Osterkamp et al. 2012).

## 1.5. Fragestellung der Arbeit

Ziel der in dieser Arbeit abgehandelten Untersuchungen war die vergleichende Evaluation der DOTA-konjugierten, NTR1-antagonistischen,  $^{111}\text{In}$ -markierten Tracer 3BP-227, -228 und -483 im HT29-Nacktmausmodell um deren Potential für weiterführende präklinische Analysen und klinische Translation einzuschätzen. Die verwendete Zelllinie HT29 eignete sich aufgrund ihrer endogenen Überexpression des NTR1.

Hierzu wurden die Traceranreicherungen im Tumorgewebe sowie in gesunden Organen *in vivo* mittels SPECT/CT analysiert.

Darüber hinaus wurde die Biodistribution der Radiotracer *ex vivo* durch Aktivitätsmessungen der Gewebe im Gammacounter ermittelt.

Außerdem wurde die Rezeptorspezifität von  $^{111}\text{In}$ -3BP-277 in einem Nacktmausmodell mit dem xenotransplantierten Tumor der NTR1-negativen Zelllinie, HEK293, untersucht.

Vor dem Hintergrund der dosislimitierenden Aktivitätsaufnahme der Nieren bei der Radionuklid-SSTR-Therapie im Menschen sowie der häufig hohen relativen renalen Anreicherungen der Radionuklid-Neurotensinanaloga präklinischer Studien fand die Einschätzung einer potentiellen Nephrotoxizität besondere Berücksichtigung bei den Untersuchungen. Hierzu wurden etablierte und neue Biomarker der Nierenfunktion bestimmt sowie eine histologische Beurteilung renalen Gewebes vorgenommen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Isotopenmarkierung und Qualitätskontrolle

Die Isotopenmarkierungen (Radiolabeling) und deren Qualitätskontrolle wurden durch den Bereich Radiopharmazie der Klinik für Radiologie und Nuklearmedizin durchgeführt.

#### 2.1.1 Isotopenmarkierung

Für die Untersuchungen dieser Arbeit wurden die DOTA-konjugierten Verbindungen mit  $^{111}\text{In}$  markiert. Dazu wurden 3BP-227 (4,4 - 39,0  $\mu\text{g}$ ), 3BP-228 (9,0  $\mu\text{g}$ ) und 3BP-483 (4,5 - 9,2  $\mu\text{g}$ ) in Puffer gelöst (0,04 M Acetat, 0,325 M Gentsinsäure; Merck, Deutschland), bei einem pH von 5 eingestellt, mit 200 - 400 MBq  $^{111}\text{In}$  ( $^{111}\text{InCl}^{+3}$ , gelöst in 0,04 M HCl; Covidien, Deutschland) zusammengebracht und unter Einsatz eines Magnetrührers für 30 min auf 95 °C erhitzt. Gentsinsäure (Dihydroxybenzoesäure) diente hierbei als Antioxidanz und Radikalfänger, verlangsamte somit radiolytische Prozesse und erhöhte die Stabilität des Markierungsproduktes.

#### 2.1.2 Qualitätskontrolle, radiochemische Reinheit und spezifische Aktivität

Nach Abkühlung des Reaktionsgemischs auf Raumtemperatur wurde die Qualität der Markierung evaluiert. Hierfür wurde die radiochemische Reinheit (RCR) ermittelt. Das Europäische Arzneibuch definiert die „RCR für ein bestimmtes Radionuklid als das in Prozent ausgedrückte Verhältnis der Radioaktivität des Radionuklids in der angegebenen chemischen Form bezogen auf die Gesamtradioaktivität des Radionuklids im radioaktiven Arzneimittel“ (Deutscher Apotheker Verlag 2014). So können die Aktivitäten ungebundener Radionuklide oder anderer Verbindungen mit dem betreffenden Isotop die RCR beeinträchtigen.

Um die RCR zu bestimmen, müssen die radioaktiven Komponenten des Reaktionsgemischs aufgetrennt werden, wofür chromatografische Verfahren verwendet werden. Wie in der klinischen Radiopharmazie üblich, kamen hierfür die Radiodünnschichtchromatografie (radio-Thin Layer Chromatography, radio-TLC) und Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (High Performance Liquid Chromatography HPLC) zum Einsatz.

Eine weitere radiochemische Kenngröße ist die spezifische Aktivität  $A_S$ , welche sich wie folgt errechnet:

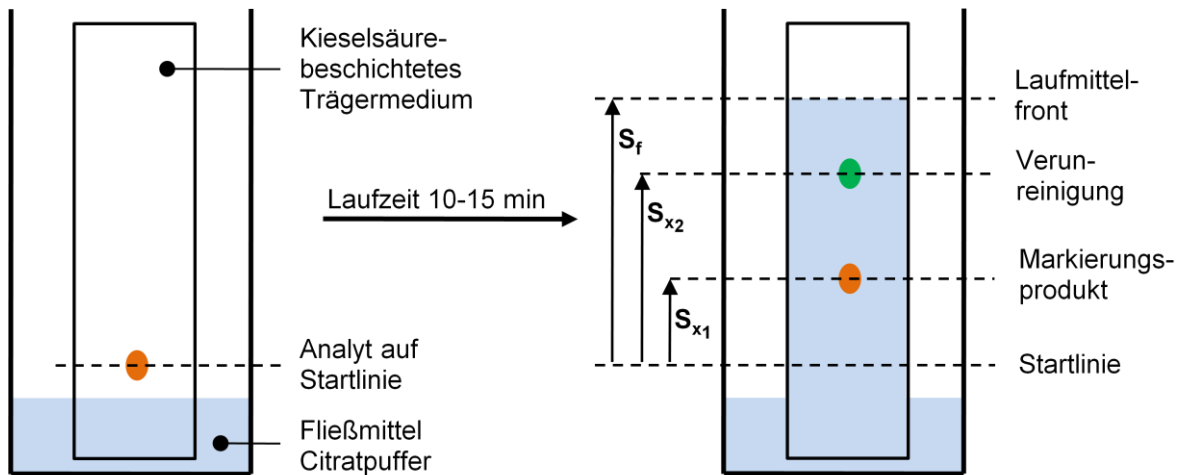
$$A_S [\text{MBq} \times \text{nmol}^{-1}] = \frac{\text{Aktivität der Verbindung} [\text{MBq}] \times \text{Molgewicht der Verbindung} [\mu\text{g} \times \text{nmol}^{-1}]}{\text{Masse der Verbindung} [\mu\text{g}]}$$

Eine geringe  $A_S$  impliziert einen höheren Anteil unmarkierter Verbindung, welche die Anreicherung der radioaktiven Substanz kompromittieren kann. Andererseits kann eine hohe  $A_S$  die Radiolyse begünstigen und zu Verunreinigungen führen (Saha 2010, S. 64).

Das Prinzip der chromatografischen Trennungen besteht in stoffspezifischen Wechselwirkungen chemischer Verbindungen, die sich in Lösung, dem Laufmittel bzw. der mobilen Phase befinden und in Kontakt mit einer Trägersubstanz, der stationären Phase, gebracht werden. Unterschiedliche Löslichkeiten in der mobilen Phase und hydrophile, sowie hydrophobe Wechselwirkungen mit der stationären Phase bewirken ein unterschiedliches Maß an Retention und damit die Auftrennung der Komponenten des Reaktionsgemischs.

### 2.1.3 Radiodünnschichtchromatografie

Für die radio-TLC wurde ein iTLC-SA-System (instant Thin Layer Chromatography, Silicid Acid - Kieselsäure; Varian, USA) verwendet. Als stationäre Phase diente ein mit Kieselsäure beschichteter, 10 x 1 cm messender, feinporiger Streifen Glasmikrofaserpapier. Als mobile Phase bzw. Laufmittel kam Citratpuffer (0,1 M, pH 5, Herstellung durch Zentralapotheke Universitätsklinikum Magdeburg, Natriumcitrat von Merck, Deutschland) zum Einsatz. Jeweils 2  $\mu$ l der Verbindungen wurden punktförmig auf das Trägermedium aufgetragen, welches daraufhin 10 - 15 min in die mit dem Laufmittel gefüllte Chromatografiekammer gestellt wurde. Die mobile Phase wanderte aufgrund von Kapillarkräften entlang des Trägermediums aufwärts und transportierte dabei den Analyten, wobei es nach oben beschriebenen Prinzip zur Separation der Komponenten kam (**Abb. 4**). Die substanzspezifischen Laufstrecken werden durch den Retentionsfaktor  $R_f$  beschrieben, der sich als Quotient der Laufstrecke der Substanz  $S_{x1,2}$  und der Laufstrecke der mobilen Phase  $S_f$  errechnet.  $R_f = 0,0$  bedeutet, dass die Substanz vollständig retiniert wird und sich nicht vom Auftragungspunkt entfernt. Demgegenüber zeigt  $R_f = 1,0$  an, dass keine Retention erfolgt und dementsprechend eine Wanderung mit der Laufmittelfront stattfindet. Die  $R_f$ -Werte von  $^{111}\text{In}$ -3BP-227 und  $^{111}\text{In}$ -3BP-228 sind je 0,0, der von  $^{111}\text{In}$ -3BP-483 0,1 (zuvor ermittelt) und der von ungebundenem  $^{111}\text{In}$  typischerweise 1,0. Die Auswertung erfolgte mit dem Dünnschichtscanner  $\gamma$ -miniGITA (Raytest, Deutschland), welcher einen Strahlungsdetektor über die Trennstrecken bewegt und so die Aktivitäten der aufgetrennten Komponenten ermittelt. Ausgabeprodukte waren Radiochromatogramme (Impulsraten aufgetragen gegen die Laufstrecke), welche durch die Hersteller-Software erstellt wurden.

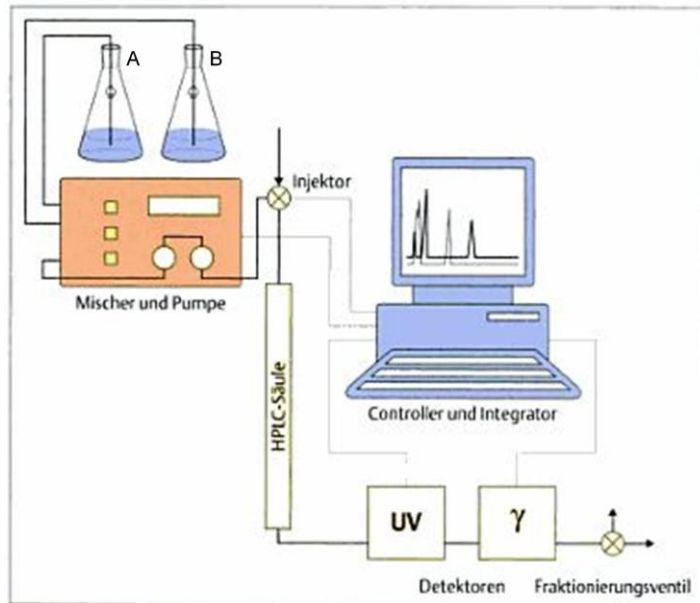


**Abbildung 4** Prinzip der Dünnschichtchromatographie eines Markierungsproduktes.  $S_{x1,2}$  Laufstrecken der aufgetrennten Komponenten des Analyten,  $S_f$  Laufstrecke der mobilen Phase. Eigene Abbildung.

Dünnschichtchromatographien verfügen im Vergleich zur HPLC über eine wesentlich geringere Trennleistung, haben aber den Vorteil der schnelleren Durchführbarkeit. Bei Implementierung einer neuen Markierung gilt die Durchführung von mehr als einem analytischen Verfahren aus Gründen der Qualitätssicherung als Standard. Aus diesem Grund wurde mindestens eine Markierung pro Substanz neben der radio-TLC zusätzlich mittels HPLC evaluiert.

#### 2.1.4 Hochleistungsdünnschichtchromatografie

Für die HPLC wurde ein Aeris PEPTIDE 3,6  $\mu\text{m}$  XB-C18 (Phenomenex, Deutschland) mit einer Edelstahlsäule von 100 x 4,6 mm als stationäre Phase verwendet (die Angabe 3,6  $\mu\text{m}$  in der Gerätebezeichnung steht für die Korngröße, welche ein definiertes Porenvolumen bestimmt). Als organische und wässrige mobile Phasen kamen A Acetonitril (MeCN) mit 0,1 % Trifluoethansäure (TFA) und B  $\text{H}_2\text{O}$  mit 0,1 % TFA (Merck, Deutschland) in einem Gradienten A/B von 1/100 für 20 min und einer Flussrate von 0,8 ml/min zum Einsatz. 10  $\mu\text{l}$  des Markierungsproduktes wurden über das Injektionsventil (Injektor) appliziert und im Laufmittelgemisch durch die Chromatographiesäule gepumpt. Die so aufgetrennten Komponenten wurden nach einer stoffspezifischen Retentionszeit durch einen UV- und  $\gamma$ -Detektor (UV - ultraviolett,  $\gamma$  – Gamma; Diodenarray-Detektor bzw. Natriumiodid-Detektor, GABI, Raytest, Deutschland) geleitet (**Abb. 5**). Die Retentionszeiten betragen für  $^{111}\text{In}$ -3BP-227,  $^{111}\text{In}$ -3BP-228 und  $^{111}\text{In}$ -3BP-228 je 9,5 - 9,9 min (gegeben von 3-B Pharmaceuticals bzw. zuvor ermittelt), für ungebundenes  $^{111}\text{In}$  1,1 min.



**Abbildung 5** Schematischer Versuchsaufbau der Hochleistungs-dünnschichtchromatografie inkl. Auswertungshardware.  
Aus: Bockisch 2008, S. 99.

## 2.2 Zellkultur

Die Biodistributions- und Bildgebungsstudien wurden in einem HT29-Nacktmausmodell durchgeführt. Die Zelllinie HT29 stammt aus dem Kolonadenokarzinom eines 44-jährigen Kaukasiers und wurde 1964 gewonnen. Es handelt sich um Zellen eines heterotransplantablen und gut differenzierten Tumors I. Grades (Fogh et al. 1977). HT29-Zellen exprimieren den NTR1 endogen (Vita et al. 1993). Sie wachsen adhärent als Monolayer und in großen Kolonien.

In allen zitierten Arbeiten über radiomarkierte Neurotensinanaloga und den  $^{18}\text{F}$ -gebundenen NTR1-Antagonisten kamen für *in-vivo*-Untersuchungen HT29-Nacktmausmodelle zum Einsatz.

Zur Untersuchung der *in-vivo*-Rezeptorspezifität von  $^{111}\text{In}$ -3BP-227 wurde zudem ein Xenograft-Nacktmausmodell mit NTR1-negativen HEK293-Tumoren verwendet. Die Zelllinie HEK293 (Human Embryonic Kidney 293) stammt aus humanen, embryonalen Nierenzellen und wurde durch das menschliche Adenovirus 5 transformiert um eine tumorartige Teilungsfähigkeit zu generieren (Graham et al. 1977). Die Zelllinie zeichnete sich durch eine einfache Kultivierbarkeit aus und schien somit bei gegebener NTR1-Negativität (Botto et al. 1998) gut zur Evaluation der Rezeptorspezifität geeignet.

Um eine Kontamination der kultivierten Zellen zu vermeiden, kamen diese ausschließlich mit sterilem Einmalmaterial in Kontakt. Ihre Handhabung fand ausnahmslos an der Sterilbank (MSC 1.2, Thermo Scientific, Deutschland) statt, welche regelmäßig mit 70 %-igem Ethanol gereinigt wurde. Einmalmaterialien und Chemikalien stammten, soweit nicht anders vermerkt, von Biochrom (Deutschland).



Die HT29-Zellen wurden von ECACC (Vereinigtes Königreich) bzw. Cell Lines Services Heidelberg bezogen, die HEK293-Zellen ebenso von ECACC. Die Zellsuspensionen wurden jeweils in Dimethylsulfoxid (DMSO) bei -80 °C gelagert.

Zur Inkulturnahme wurde das Kulturmedium vorbereitet (McCoy's 5A Modified Medium mit 10 % fetalem Kälberserum, 1 % 200 mM L-Glutamin und 1 % Penicillin/Streptomycin bestehend aus 10000 U/ml Penicillin und 10 mg/ml Streptomycin im Verhältnis 1:1), im Wasserbad auf 38 °C erwärmt (W200, memmert, Deutschland), in eine 175 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche (greiner bio-one, Deutschland) gegeben und bis zur weiteren Verwendung im Brutschrank (37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub>; memmert, Deutschland) aufbewahrt. Die per Hand angetauten Zellen wurden in die so vorbereitete Zellkulturflasche überführt und für 2 Stunden, wie zuvor beschrieben, inkubiert bis sich die Zellen am Grund der Flasche abgesetzt hatten. Hiernach erfolgte der erste Medienwechsel. Am Folgetag wurden die Zellen mikroskopisch auf Wachstum und Detritus kontrolliert (Lichtmikroskop, Hund, Deutschland). Das Medium wurde abgesogen, mit jeweils 10 ml auf 38 °C erwärmten Dulbecco's Phosphate-buffered Saline (DPBS) zweimalig gewaschen und wiederum mit ebenso temperiertem Kulturmedium versetzt.

Drei Tage nach Inkulturnahme wurde erneut mikroskopisch kontrolliert – bei einer Zellkonfluenz von > 80 % erfolgte die Passage. Hierzu wurden das Medium entfernt, die Zellen wie oben beschrieben mit DPBS gewaschen, zum Lösen dieser vom Flaschenmaterial mit 1,5 ml Trypsin (Trypsin/ EDTA Lösung, 0,25 %/ 0,02 %) versetzt und 3 - 5 min im Wärmeschrank inkubiert. Hiernach erfolgte die Resuspension in 15 ml Kulturmedium zur Neutralisierung des potentiell zytotoxischen Trypsins. Der Flascheninhalt wurde in ein Falconröhrchen überführt und 5 min bei 1200 rpm (Rounds per Minute, Umdrehungen pro Minute) zentrifugiert (Biofuge 28 RS, Heraeus, Deutschland). Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet mit frischem Kulturmedium versorgt. Zur Lösung der Zellen voneinander erfolgte eine dreiminütige Behandlung mittels Reagenzglasschüttler (Reax 200, Heidolph, Deutschland). Anschließend wurde die Zellsuspension auf eine dem Bedarf entsprechende Menge von wie oben beschrieben vorbereiteten Kulturflaschen verteilt.

Zur Ermittlung der Zellzahl wurden die Zellen in 1 µl der Suspension nach Lösung und Behandlung mit Reagenzglasschüttler in einer Einwegzählkammer (C-Chip, DigitalBio, Südkorea) gezählt. Die Zellzahl in fünf zufällig ausgewählten großen Quadraten wurde auf die Zellzahl  $n$  gemittelt. Die Zellkonzentration ergab sich aus der Formel:

$$\text{Zellkonzentration [ml}^{-1}\text{]} = n \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^5$$

Zur Präparation der Injektionssuspension für die Tumorzellinokulation wurde nach Zentrifugation das Pellet mit derart ermittelter Zellzahl in McCoy's Modified Medium so aufgenommen, dass sich eine Zellkonzentration von  $40 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$  ergab.

### 2.3 Nacktmaustumormodell

Sämtliche Tierversuche erfolgten nach Genehmigung durch das Landesverwaltungsamt gem. § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes des Landes Sachsen-Anhalt vom 18.05.2006 (Aktenzeichen 42502-2-1147 Uni MD). Die Haltungsbedingungen entsprachen den Anforderungen der GV-SOLAS, die UKCCCR Guidelines for the Welfare of Animals in Experimental Neoplasia (Second Edition) wurden eingehalten und den geltenden strahlenschutzrechtlichen Bestimmungen entsprochen.

Zur Evaluation der *in-vivo*-Eigenschaften der drei Tracer kam ein xenogenes Tumormodell zum Einsatz, d. h. humane Tumorzellen, in diesem Fall HT29 bzw. die transformierten menschlichen HEK293-Zellen, wurden speziesübergreifend transplantiert (englisch to xenograft). Verwendet wurden weibliche, athymische Nacktmäuse (*Nude-Fox1<sup>nu</sup>*, Harlan Laboratories, Niederlande), durch deren Immunsuppression die Anwachsrate der Tumorzellen verbessert wurde. Bis zur Tracerinjektion erfolgte eine offene Käfighaltung, danach in individuell ventilierten Käfigen (IVC) mit 12-stündigem Tag-/ Nachtrhythmus, 45 - 55 % Luftfeuchte und bei 21 - 22 °C. Die Ernährung erfolgte mit Haltungsfutter Maus/ Ratte 10 mm Pellets (Ssniff Spezialdiäten, Deutschland) und Leitungswasser ad libitum.

Im Alter von 6 - 8 Wochen erfolgte die subkutane Tumorzellinokulation mit einer 1 ml-Spritze (Omnifix-F, 1 ml, Braun, Deutschland) und einer Subkutankanüle (Sterican, 20 G, 70 mm; Braun, Deutschland) in die rechte Flanke. Jedem Tier wurden 0,05 - 0,1 ml ( $2 - 4 \times 10^6$  Zellen) der oben beschriebenen Suspension injiziert. Nach 2 - 4 Wochen waren Tumoren tast- bzw. sichtbar (**Abb. 6**).



**Abbildung 6** HT29-xenotransplantierte Nacktmaus und entnommener Tumor. Links: Weibliche Nacktmaus mit xenotransplantiertem HT29-Tumor in der rechten Flanke (Pfeil) drei Wochen nach Tumorzellinokulation. Rechts: HT29-Tumor nach Entnahme aus dem Tier links mit einer maximalen Ausdehnung von ca. 8 mm.

## 2.4 Biodistributionsstudien und *in-vivo*-Rezeptorspezifität von $^{111}\text{In}$ -3BP-227

### 2.4.1 Versuchsablauf

Die Tracerapplikation erfolgte 2 - 4 Wochen nach Tumorzellinokulation unter Isofluran-Anästhesie (1 - 2 % Isofluran in 2 : 1  $\text{O}_2$ - $\text{N}_2\text{O}$ -Gasgemisch) über eine der lateralen Schwanzvenen. Für jedes Tier wurde die zu applizierende Dosis in einer individuellen Spritze aufgezogen (Spritze Omnifix-F, 1 ml, Braun, Deutschland; Injektionskanüle Microlance 3, 23 G, 25 mm; Becton Dickinson, Spanien). Es wurden 0,2 - 12,2 MBq  $^{111}\text{In}$ -3BP-227, 5,5 - 7,6 MBq  $^{111}\text{In}$ -3BP-228 bzw. 4,9 - 18,4 MBq  $^{111}\text{In}$ -3BP-483 injiziert. Die Tiere wurden nach einer definierten Verteilungsdauer post injectionem (p. i.) von 3, 6, 12 oder 24 Stunden euthanasiert. Für jeden Zeitpunkt p. i. und Tracer wurden n = 3 - 9 Tiere untersucht (Uptakes der Tiere für die Bildgebung wurden ebenso für die *ex-vivo*-Biodistributionsstudie verwendet).

Die Euthanasie erfolgte durch zervikale Dislokation nach Isofluran-Anästhesie in einer geschlossenen Kammer. Perimortal ausgeschiedener Urin wurde in Reagenzgläsern (12 x 75 mm, Rotilabo PS, Carl Roth, Deutschland) gesammelt. Der Thorax wurde eröffnet, Blut durch kardiale Punktion gewonnen und in oben bezeichneten Reagenzgläsern, versetzt mit Gerinnungsaktivator und Trenngel aus Serum-Gel-Röhrchen (13 x 100 mm, Becton Dickinson, Spanien), aufgefangen. Zur Trennung des Serums erfolgte eine zehnmünütige Zentrifugation bei 2800 rpm (Rotofix 32A, Hettich, Deutschland). Es erfolgte die Entnahme von Tumor (**Abb. 6**), Gehirn, Herz, Lungen, Magen, Darm, Nieren, Leber, Milz, Harnblase, Fett-

gewebe, Muskulatur und Femur des Oberschenkels des rechten Hinterlaufs und deren Aufnahme in oben bezeichnete Reagenzgläser. Die Inhalte von Magen und Darm wurden nicht ausgetrieben.

Die *in-vivo*-Rezeptorspezifität wurde im HEK293-Nackmausmodell evaluiert. Hierzu kamen drei Tiere zum Einsatz, denen 12 Stunden p. i. von 2,4 - 4,6 MBq  $^{111}\text{In}$ -3BP-227 Tumoren und Organe entnommen wurden.

#### 2.4.2 Parameterbestimmung und Berechnung des Uptakes als %ID/g

Für die Bestimmung der injizierten Dosis (ID) wurde die Aktivität der tierindividuellen Spritze, die die zu applizierende Lösung enthielt, vor und nach Verabreichung im Aktivimeter (VDC-405 R11, Veenstra Instrumenten B.V., Niederlande) ermittelt, jeweils auf den Zeitpunkt der Euthanasie zerfallskorrigiert und der Rückmessungs- vom Ausgangswert subtrahiert. Stichproben zeigten keine relevanten Aktivitätsanteile in den Schwänzen der Tiere aufgrund von potentieller Subkutaninjektion und wurden aufgrund dessen nicht berücksichtigt. Ggf. aus der Punktionsstelle rückfließendes Applikationsmaterial wurde mit einem Tupfer aufgefangen, dessen Aktivität bestimmt und die ID um diese nach entsprechender Zerfallskorrektur bereinigt.

Die Gewebe- bzw. Organmassen  $M_{\text{Org}}$  wurden mittels Feinwaage bestimmt, die von Blut und Urin im Röhrchen unter Abzug der Leergewichte der Probengefäße. Die Aktivitäten der Proben wurden im Gammcounter (Bohrlochmessplatz Isomed 100, MED Nuklear-Medizintechnik Dresden, Deutschland) in den Energiebereichen  $170 \pm 30$  keV und  $252 \pm 44$  keV bestimmt. Die Ausgabe erfolgte als Zähl- bzw. Impulsrate  $I_{\text{Org}}$  in Counts per Minute (cpm).

Die Impulsrate konnte durch die Kalibrierung mit einer bekannten Aktivität des Nuklids in diese umgerechnet werden. Hierfür wurden Verdünnungskalibrierungsreihen in Doppelbestimmungen angefertigt. Ausgangspunkt war eine im Aktivimeter bestimmte Aktivität von  $^{111}\text{InCl}^{+3}$ , welche 1:2 verdünnt und deren Aktivität im Gammcounter gemessen wurde. Dieser Vorgang wurde bis zur Grenze der Messgenauigkeit des Gammcounters, bezogen auf den durch die Ausgabesoftware angegebenen statistischen Fehler der entsprechenden Messung, wiederholt. Da während der laufenden Versuche Geräteteile des Gammcounters ausgewechselt wurden, wurde die Kalibrierung zweimal durchgeführt und für die entsprechenden Messungen angewandt. Hieraus wurden zwei Kalibrierungsfunktionen bestimmt, mit denen die Messwerte des Bohrlochmessplatzes der Gewebe  $I_{\text{Org}}$  in die Gewebeaktivitäten  $A_{\text{Org}}$  in MBq umgerechnet wurden:

$$A_{\text{Org}}[\text{MBq}] = 9,94400 \times 10^{-8} [\text{MBq} \times \text{cpm}^{-1}] \times I_{\text{org}}^{0,97125} [\text{cpm}]$$

$$A_{\text{Org}}[\text{MBq}] = 7,06235 \times 10^{-8} [\text{MBq} \times \text{cpm}^{-1}] \times I_{\text{org}}^{0,98560} [\text{cpm}]$$

Es erfolgte wiederum die Zerfallskorrektur der Organaktivitäten auf den Zeitpunkt der Euthanasie.

Die Aktivitätsanreicherung im Gewebe, genannt Uptake, wurde als prozentualer Anteil der Gewebeaktivität  $A_{\text{Org}}$  an der Aktivität der injizierten Dosis ID pro Gewebemasse  $M_{\text{Org}}$  (%ID/g) ausgedrückt:

$$\text{Uptake} [\% \text{ ID/g}] = \frac{A_{\text{Org}} [\text{MBq}]}{\frac{\text{ID} [\text{MBq}]}{M_{\text{Org}} [\text{g}]}} \times 100$$

Zur Einschätzung des Verhältnisses des Tumouruptakes zur Anreicherung im gesunden Gewebe wurden Ratios ermittelt.

## 2.5 SPECT/CT-Bildgebung

Die Tracerinjektionen der Tiere für die SPECT/CT-Bildgebung fanden analog zu denen der Biodistributionsstudien statt. Es wurden 21 - 47 MBq  $^{111}\text{In}$ -3BP-227 ( $n = 6$ ), 33 - 44 MBq  $^{111}\text{In}$ -3BP-228 ( $n = 4$ ) bzw. 31 - 44 MBq  $^{111}\text{In}$ -3BP483 ( $n = 3$ ) injiziert.

Ganzkörper-SPECT/CT-Aufnahmen wurden mittels NanoSPECT/CT-Scanner (Mediso, Ungarn, **Abb. 7**) 3, 6, 12 und 24 h p. i. unter Isofluran-Anästhesie zur Immobilisation (1 - 2 % Isofluran in einem 1 : 2  $\text{O}_2$ - $\text{N}_2\text{O}$ -Gasgemisch) angefertigt. CT und SPECT wurden jeweils koregistriert. Als anatomische Referenz wurden Computertomogramme mit einer räumlich isotropen Auflösung von 192  $\mu\text{m}$  ausgeführt und mit der Herstellersoftware (InVivoScope 1.43) mit einer isotropischen Voxelgröße von 200  $\mu\text{m}$  rekonstruiert. Die helikalen SPECT-Aufnahmen erfolgten unter Verwendung von vier 9-Loch-Aperturblenden mit einem Lochblendendurchmesser von 1,4 mm, über die die  $\gamma$ -Photonen auf die jeweiligen, auf Grundlage der Szintillation operierenden, Natriumiodid-Detektoren (230 x 215 mm) projiziert wurden, von denen jeder mit 33 Photomultipliern verbunden war. Die voreingestellten Energiefenster für  $^{111}\text{In}$  (171 keV  $\pm$  5 % und 245 keV  $\pm$  5 %) wurden ausgewählt. Die Aufnahmedauer betrug je 60 min. Die Daten wurden mit der Software HiSPECT (Scivis, Deutschland) mit einer von der Zählrate abhängigen Voxelausgabegröße von 300 - 600  $\mu\text{m}$  rekonstruiert.



**Abbildung 7** NanoSPECT/CT-Scanner (Mediso, Ungarn). Links: Gerät mit Bedienungsmonitor. Rechts: Die geschlossene Untersuchungs- und Liegeeinheit mit Nacktmouse in Inhalationsnarkose wird in den Scanner eingebracht, wovon hier u. a. die vier Aperturblenden zu sehen sind.

Die Bilder für **Abbildung 13** wurden mit Osirix MD (64-bit-Version 1.3) erstellt. Für den beispielhaften semiquantitativen Vergleich der in der SPECT ermittelten Aktivitätswerte mit denen der *ex-vivo*-Biodistribution wurden VOI-Analysen (Volume of Interest) vorgenommen. Hierzu wurden die Tumoren und Nieren in Osirix MD volumetriert und die von der Software für die entsprechende VOI berechneten mittleren Impulsraten der beiden Gewebe ins Verhältnis gesetzt um Tumor/Niere-Aktivitäts-Ratios zu ermitteln.

Nach der letzten SPECT/CT-Aufnahme wurden die Tiere euthanasiert, Gewebe der Tiere entnommen und deren Aktivitäten bestimmt (entsprechend oben beschriebem Vorgehen). Diese Ergebnisse gingen in die der Biodistributionsstudien ein.

Ein Tier verstarb nach Applikation von  $^{111}\text{In}$ -3BP-227 unter Narkose während der SPECT/CT-Aufnahme 6 h p. i.

## 2.6 Evaluation Nephrotoxizität

Zur Einschätzung einer potentiellen, nephrotoxischen Wirkung der radioaktiv markierten Tracer wurden Parameter in Serum und Urin bestimmt, sowie histologische Untersuchungen von Nieren injizierter Tiere angefertigt.

### 2.6.1 Parameteranalyse

In den wie oben beschrieben peri- bzw. postmortal gewonnenen Urin- und Serumproben der Tiere der Biodistributions- und Bildgebungsstudien wurden Parameterbestimmungen durchgeführt. Als Kontrollen dienten einerseits ebenso entnommene Proben von  $n = 11$  HT29-xenotransplantierten Nacktmäusen, denen kein Radiotracer verabreicht wurde. Andererseits erfolgten bei 14 Tieren zwei Tage vor Injektion von  $^{111}\text{In}$ -3BP-228 eine retrobulbäre Blutentnahme und die Gewinnung von Urin, welche ebenfalls in die Kontrollgruppe einbezogen wurden. Die Proben wurden aliquotiert und zum Abklingen bis zum Zeitpunkt der Analyse bei  $-20\text{ °C}$  gelagert.

Aufgrund der zum Teil geringen Volumina der Einzelproben, konnten nicht aus jeder einzelnen alle Parameter bestimmt werden.

Es erfolgte die Bestimmung der Konzentrationen von Harnstoff, Kreatinin, Neutrophilen Gelatinase-assoziiertem Lipocalin (NGAL) und Cystatin C im Serum (i. S.), sowie NGAL und Cystatin C im Urin (i. U.).

Die Konzentrationen von Harnstoff und Kreatinin i. S. wurden mittels Geräten und Methoden der Routinediagnostik im Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie des Universitätsklinikums Magdeburg A. ö. R. bestimmt. In beiden Fällen handelte es sich um photometrische Verfahren. Harnstoff wurde durch den Urease/ GLDH-UV-Test (GLDH – Glutamatdehydrogenase) ermittelt und Kreatinin mittels enzymatischem Farbstest (beide Verfahren durchgeführt im Modular P800, Roche Diagnostics, Deutschland).

Die Konzentrationen von NGAL und Cystatin C i. S. und i. U. wurden als Doppelbestimmungen durch Enzyme linked Immunosorbent Assays (ELISA) durchgeführt, welche gebrauchsfertig als Kits mit 96-Well-Platten und allen notwendigen Lösungen, u. a. Kalibrierungsproben, erworben wurden. Die Vertiefungen (Wells) beider Kits waren nach dem Prinzip der Sandwich-Technik mit Anti-Maus-NGAL- bzw. Anti-Maus-Cystatin C-Antikörpern als „Fangantikörper“ beschichtet, an die die jeweiligen zu testenden Antigene banden. Nach Waschen zur Entfernung unspezifisch oder nicht gebundenen Materials wurde ein weiterer Antigen-spezifischer, Biotin-gebundener Antikörper zugegeben und erneut gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von HRP-Streptavidin (HRP – Horeseradish Peroxidase). Durch

Streptavidin wird Biotin hochaffin gebunden. HRP führt mit dem im nächsten Schritt nach Waschen hinzugegebenen 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) zu einer kolorimetrischen Reaktion, welche nach Beendigung durch eine TMB-Stopp-Lösung photometrisch bei 450 nm in einem ELISA-Reader (WinRead V 2.3) mittels Vergleich mit der Kalibrierkurve als Konzentration quantifiziert wurde.

Die Bestimmung der NGAL-Konzentrationen erfolgte mit dem Mouse NGAL ELISA Kit (Kit 042, BioPorto Diagnostics, Dänemark). Die Proben wurden entsprechend der Herstellerangaben 1 : 500 - 1 : 2000 verdünnt.

Die Cystatin C-Konzentrationen wurden mittels Mouse Cystatin C ELISA Kit (Boster Biological Technology, USA) ermittelt. Die Verdünnung des Probenmaterials erfolgte auf 1 : 5 - 1 : 100.

Durch Multiplikation der Ergebnisse des ELISA-Readers mit den Verdünnungsfaktoren ergaben sich die in den Proben vorliegenden Konzentrationen von NGAL bzw. Cystatin C.

### **2.6.2 Nierenhistologie**

Nieren von neun mit 5,14 - 21,6 MBq eines der Tracer behandelten Tieren wurden nach Organentnahme in 4 % Paraformaldehyd fixiert und bei +8 °C gelagert. Die histologische Untersuchung dieser Organe erfolgte im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, Sektion Nephropathologie.

Die Schnitte der Organe wurden entweder mit Schiff'scher Reagenz (Periodic Acid-Schiff, PAS) und Hämatoxylin-Eosin (HE) oder für eine Masson-Goldner-Trichrom- mit Elastica-Färbung präpariert.

Bei der PAS-Reaktion werden durch die enthaltene Periodsäure benachbarte 1,2-Glykolgruppen kohlenhydratreicher Makromoleküle zu Aldehydgruppen oxidiert, was zum Übergang der Schiff'schen Reagenz in einen purpurroten Farbstoff führt. Hierdurch können v. a. Veränderungen an Basalmembranen sichtbar gemacht werden. HE diente in diesem Zusammenhang als Kontrastfärbung, vorwiegend zur Darstellung von Zellkernen und Zytoplasma.

Für die Beurteilung des Bindegewebes kam zusätzlich die Masson-Goldner-Trichrom- mit Elastica-Färbung in hauseigener Modifikation zum Einsatz (Resorcin-Fuchsin, Eisenhämatoxylin nach Weigert, Ponceau de Quilidine-Lösung mit Säurefuchsin, Ponceau und Azophloxin, Phosphormolybdänsäure-Goldorange, Lichtgrün).



## 2.7 Datenanalyse

Die Biodistributionsergebnisse wurden in Analogie zur üblichen Darstellungsweise, wie sie für die NTR1-Agonisten zu finden waren (z. B. García-Garayoa et al. 2009, Alshoukr et al. 2011), mittels Tests für parametrische Daten ausgewertet, obwohl keine Normalverteilung vorlag. Damit sollte eine bessere Vergleichbarkeit mit diesen Arbeiten hergestellt werden. Uptakes und Ratios wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen berechnet. Signifikanzuntersuchungen erfolgten mittels SPSS Statistics (IBM, 64-bit-Version 22.0.0.0) durch ANOVA-Analyse (Analysis of Variance) gefolgt von Tukey's post-hoc-Tests, bzw. mittels t-Test für den Vergleich zweier Gruppen. Unterschiede von  $p < 0,05$  wurden als signifikant angesehen.

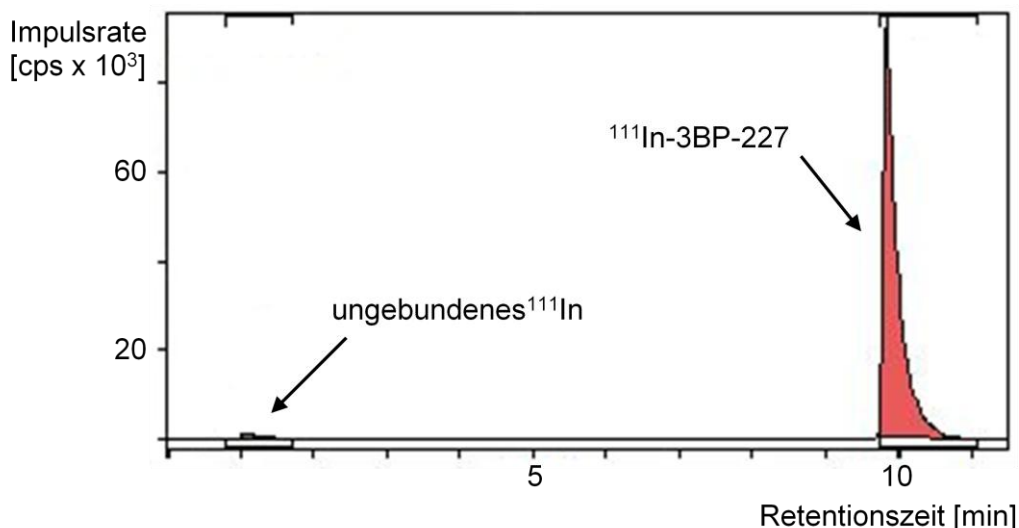
Die Messmethoden der Tumor/Nieren-Uptake-Ratios in der *ex-vivo*-Biodistribution einerseits und der Tumor/Nieren-Aktivitäts-Ratios in der SPECT andererseits wurden mittels Spearman-Korrelation verglichen. Für den selben Zweck wurde eine Analyse der Übereinstimmung mittels Bland-Altman-Methode durchgeführt (Bland und Altman 2003).

Die Ergebnisse der Nierenparameterbestimmungen wurden mittels Tests für nicht-parametrische Daten untersucht. Signifikanzanalysen wurden für nicht verbundene Stichproben mittels Mann-Whitney-U-Test und für verbundene (bei Vorliegen von Daten vor und nach Tracerinjektion innerhalb eines Tieres) mittels Wilcoxon-Test durchgeführt. Der Zusammenhang von Parameter und Nierenmassenaktivität wurde durch Spearman-Korrelation untersucht.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Isotopenmarkierung und Qualitätskontrolle

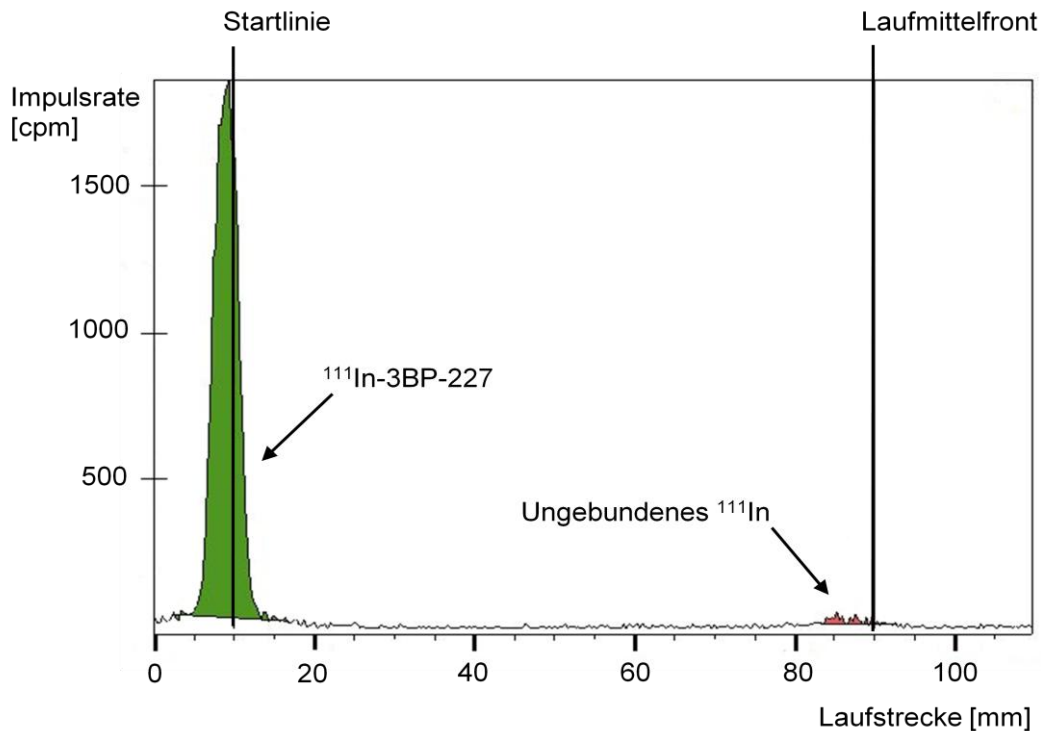
Für mindestens eine  $^{111}\text{In}$ -Markierung pro Substanz wurde zur methodischen Qualitätssicherung zusätzlich zur radio-TLC eine HPLC angefertigt. In **Abbildung 8** wird ein für die Markierung aller Substanzen repräsentatives HPLC-Radiochromatogramm dargestellt.



**Abbildung 8** Repräsentatives Radiochromatogramm einer HPLC, hier  $^{111}\text{In}$ -Markierung der Substanz 3BP-227. Es ist ein deutlicher Ausschlag bei einer Retentionszeit von 9,85 min zu erkennen, der dem Markierungsprodukt entspricht. Der kleine Peak bei 1,07 min entsteht durch ungebundenes  $^{111}\text{In}$ . Durch Integration wurde die Fläche unter der Kurve ermittelt, welche der Gesamtaktivität von  $^{111}\text{In}$  im Analyten entspricht. Durch Berechnung des Anteils der Peakflächen daran, ergibt sich für  $^{111}\text{In}$ -3BP-227 hier 98,26 % als Wert der RCR. Cps Counts per Second.

Die Qualität jedes Markierungsproduktes wurde zur RCR-Bestimmung mittels radio-TLC evaluiert. **Abbildung 9** zeigt ein für die Markierungen aller Verbindungen repräsentatives Dünnschichtradiochromatogramm.

Das Europäische Arzneibuch fordert für radiopharmazeutische Markierungsprodukte Mindest-RCR-Werte zwischen 90 und 98 % (Deutscher Apotheker Verlag 2014). Betrug die per radio-TLC ermittelte RCR der Markierungsprodukte der Tracer dieser Arbeit < 95 %, wurde es verworfen um unspezifische Aktivitätsanreicherung zu verhindern. Aufreinigungsverfahren waren deshalb nicht notwendig. **Tabelle 1** stellt die RCR-Werte und  $A_s$  der verwendeten Markierungen der drei Verbindungen dar.



**Abbildung 9** Repräsentatives Radiochromatogramm einer radio-TLC, hier  $^{111}\text{In}$ -Markierung der Substanz 3BP-227. Es zeigt einen deutlicher Peak (darunterliegende Fläche grün) auf Höhe der Startlinie, wo der Analyt aufgetragen wurde, der der Aktivität von  $^{111}\text{In}$ -3BP-227 entspricht (vollständige Retention,  $R_f = 0,0$ ). Der geringe Ausschlag auf Höhe der Laufmittelfront (Fläche darunter rot) entspricht ungebundenem  $^{111}\text{In}$  ( $R_f = 0,96$ ). Durch Berechnung, wie für Abbildung 8 beschrieben, ergibt sich hier ein Anteil der Aktivität in Form von  $^{111}\text{In}$ -3BP-227 an der Gesamtaktivität des Analyten von 99,7 %, welcher der RCR entspricht. Cpm Counts per Minute.

	$^{111}\text{In}$ -3BP-227	$^{111}\text{In}$ -3BP-228	$^{111}\text{In}$ -3BP-483
RCR [%]	$99,0 \pm 0,9$	$98,6 \pm 0,2$	$98,4 \pm 1,2$
$A_S$ [ $\text{MBq} \times \text{nmol}^{-1}$ ]	4,4 - 6,7 Nach Optimierung: 26,0 - 66,8	34,5 - 35,7	33,3 - 62,8

**Tabelle 1** Radiochemische Reinheit (RCR) und spezifische Aktivität ( $A_S$ ; Aktivität der eingesetzten Radionuklidlösung dividiert durch eingesetzte Stoffmenge der jeweiligen Verbindung) der verwendeten  $^{111}\text{In}$ -Markierungen von 3BP-227, 3BP-228 und 3BP-483. RCR ist angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung,  $A_S$  als Spannweite.

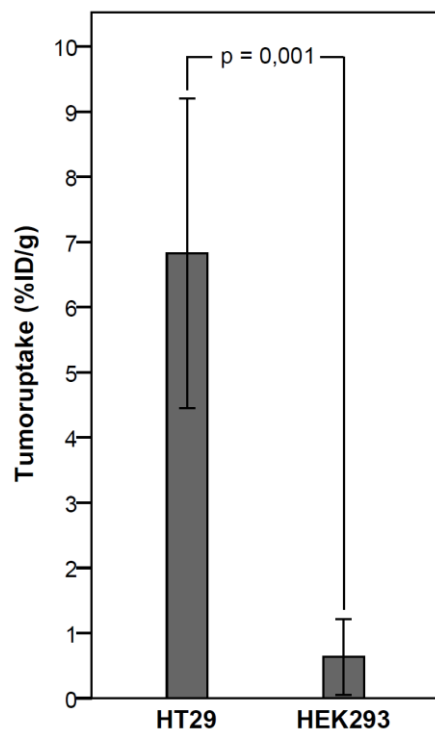
Die erzielten  $A_S$  sind als relativ hoch zu bewerten. Damit ist von einem sehr geringen Anteil unmarkierter Substanz auszugehen, welche die Anreicherung der radioaktiven Verbindungen hemmen könnte. Mit radiolytischen Prozessen ist bei derartig geringen Aktivitäten nicht zu rechnen.

### 3.2 Biodistributionsstudien und *in-vivo*-Rezeptorspezifität von $^{111}\text{In}$ -3BP-227

Die Biodistributionen von  $^{111}\text{In}$ -3BP-227 (**Tab. 2**),  $^{111}\text{In}$ -3BP-228 (**Tab. 4**) und  $^{111}\text{In}$ -3BP-483 (**Tab. 5**) in weiblichen, HT29-xenotransplantierten Nacktmäusen wurden 3, 6, 12 und 24 p. i. evaluiert.

Der Vergleich der Biodistributionsergebnisse der Tiere, welche ausschließlich hierfür eingesetzt wurden, mit denen, die für die Bildgebung verwendet wurden, ergab keine auffälligen Unterschiede. Sättigungserscheinungen bei der Aktivitätsanreicherung im Tumor bei Applikation höherer Dosen, die für die SPECT/CT-Scans verabreicht wurden, konnten nicht nachgewiesen werden. Deshalb war es möglich die *ex-vivo*-Ergebnisse dieser Tiere gleichermaßen in die der Biodistributionsstudien einzubeziehen um somit die notwendige Gesamttierzahl zu reduzieren.

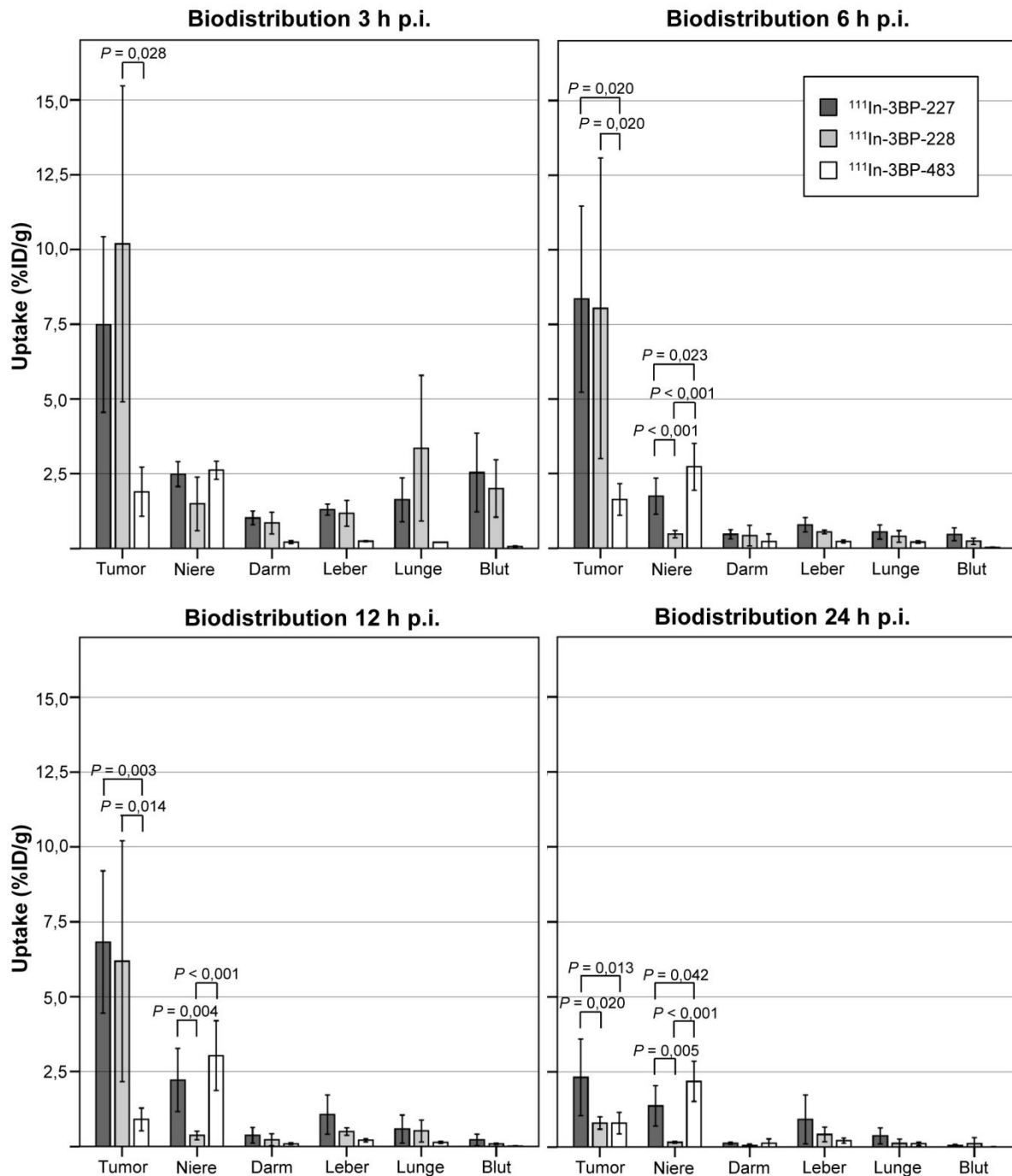
Mit jeder Verbindung konnte ein deutlicher Tumoruptake erzielt werden (**Abb. 11**). Die höchste Aktivitätsanreicherung in HT29 zeigte sich für  $^{111}\text{In}$ -3BP-227 6 Stunden nach Injektion bei  $8,35 \pm 3,12$  %ID/g, bei  $10,19 \pm 5,28$  %ID/g 3 h p. i. für  $^{111}\text{In}$  3BP-228 und bei  $1,9 \pm 0,82$  %ID/g ebenfalls 3 h p. i. für  $^{111}\text{In}$ -3BP-483. Die Profile des Tumoruptakes von  $^{111}\text{In}$ -3BP-227 und  $^{111}\text{In}$ -3BP-228 waren 3, 6 und 12 Stunden p. i. mit hoher initialer Anreicherung und langsamem Wash-out ähnlich. Nach 24 h präsentierte  $^{111}\text{In}$ -3BP-227 einen signifikant höheren Wert als  $^{111}\text{In}$ -3BP-228 ( $2,32 \pm 1,28$  %ID/g versus  $0,80 \pm 0,21$  %ID/g,  $p = 0,020$ ). Der Tumoruptake von  $^{111}\text{In}$ -3BP-483 war 3, 6 und 12 h p. i. signifikant niedriger als der von  $^{111}\text{In}$ -3BP-228 (z. B. 12 h p. i.  $p = 0,014$ ), sowie 6, 12 und 24 h p. i. signifikant niedriger als der von  $^{111}\text{In}$ -3BP-227 (z. B. 12 h p. i.  $p = 0,003$ ).



Nach der Applikation von  $^{111}\text{In}$ -3BP-227 bzw.  $^{111}\text{In}$ -3BP-228 zeigte sich die Aktivitätsanreicherung in HT29 zu allen Entnahmezeitpunkten als die höchste im Vergleich aller jeweils untersuchten Gewebe, sodass die Tumor/gesunde Gewebe-Ratios stets größer eins waren.

Die Anreicherung von  $^{111}\text{In}$ -3BP-227 in NTR1-negativen HEK293-Tumoren 12 h p. i. war 11-fach geringer als in den NTR1-positiven HT29-Tumoren ( $6,82 \pm 2,38$  vs.  $0,64 \pm 0,58$  %ID/g,  $p = 0,001$ ; **Abb. 10**).

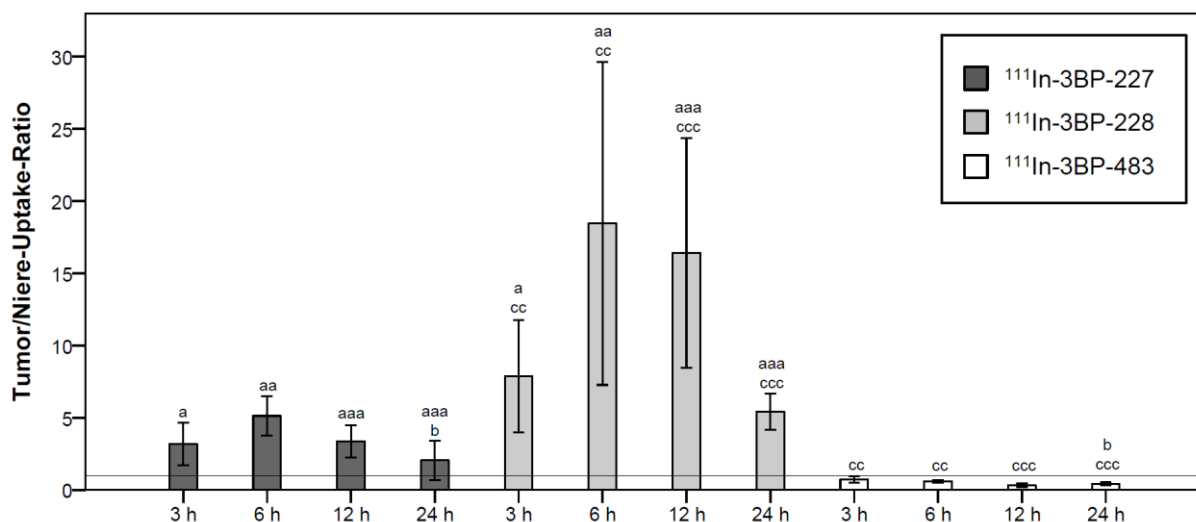
**Abbildung 10** Uptake von  $^{111}\text{In}$ -3BP-227 in NTR1-positiven HT29- ( $n = 9$ ) und NTR1-negativen HEK293-Tumoren ( $n = 3$ ) 12 h p. i. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen werden abgebildet. Der statistische Vergleich erfolgte mittels t-Test.



**Abbildung 11** Biodistribution von  $^{111}\text{In}$ -3BP-227,  $^{111}\text{In}$ -3BP-228 bzw.  $^{111}\text{In}$ -3BP-482 anhand ausgewählter Gewebe 3, 6, 12 bzw. 24 h p. i. Der Uptake wird dargestellt als prozentualer Anteil an der Aktivität der injizierten Dosis pro Gramm (%ID/g). Mittelwerte  $\pm$  1 Standardabweichung sind aufgetragen. Statistische Vergleiche der Tumor- und Nierenuptakes wurden mittels ANOVA-Analyse gefolgt von Tukey's post-hoc-Test durchgeführt.

Die zweithöchste Gewebeanreicherung von  $^{111}\text{In}$ -3BP-227 bzw. der höchste Uptake nach Gabe von  $^{111}\text{In}$ -3BP-483 fand sich in den Nieren. Im Falle von  $^{111}\text{In}$ -3BP-228 boten die Nieren wesentlich geringere relative Anreicherungen. 6, 12 und 24 h p. i. stellten sich die absoluten Werte der Nierenanreicherung von  $^{111}\text{In}$ -3BP-228 im Vergleich der drei Verbindungen als signifikant am niedrigsten dar (**Abb. 11**). Die Tumor/Niere-Uptake-Ratios von  $^{111}\text{In}$ -3BP-483 betragen in jedem Falle weniger, die von  $^{111}\text{In}$ -3BP-227 und  $^{111}\text{In}$ -3BP-228 ausschließlich mehr als eins (**Abb. 12**). Beim Vergleich dieses Parameters ergaben sich die Werte von  $^{111}\text{In}$ -3BP-228 zu jedem Zeitpunkt p. i. als signifikant höher als die der anderen beiden Verbindungen.

Die beschriebenen Werte der Nierenuptakes der Verbindungen, sowie die hohen im Urin ermittelten Aktivitäten legen nahe, dass sie zu einem erheblichen Anteil renal eliminiert wurden.



**Abbildung 12** Tumor/Niere-Uptake-Ratios 3, 6, 12 bzw. 24 h p. i. von  $^{111}\text{In}$ -3BP-227,  $^{111}\text{In}$ -3BP-228 bzw.  $^{111}\text{In}$ -3BP-482. Tumor- und Nierenuptakes wurden berechnet als prozentualer Anteil an der Aktivität der injizierten Dosis pro Gramm, ins Verhältnis gesetzt und der Mittelwert der Ratios mit rechter und linker Niere gebildet. Bezugslinie bei  $y = 1$ . Aufgetragen sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen. Statistische Vergleiche wurden mittels ANOVA-Analyse gefolgt von Tukey's post-hoc-Test durchgeführt. <sup>a</sup>  $p < 0,05$ , <sup>aa</sup>  $p < 0,01$ , <sup>aaa</sup>  $p < 0,001$   $^{111}\text{In}$ -3BP-227 vs.  $^{111}\text{In}$ -3BP-228; <sup>b</sup>  $p < 0,05$   $^{111}\text{In}$ -3BP-227 vs.  $^{111}\text{In}$ -3BP-483; <sup>cc</sup>  $p < 0,01$ , <sup>ccc</sup>  $p < 0,001$   $^{111}\text{In}$ -3BP-228 vs.  $^{111}\text{In}$ -3BP-483.

Dünn- und Dickdarm (jeweils als eine Probe entnommen und gemessen) als NTR1-exprimierende Organe sowie der Magen zeigten bei keiner der Substanzen einen relevanten relativen Uptake. Die ebenfalls rezeptorpositive Leber präsentierte 3 und 6 h p. i. den dritt- bis vierthöchsten Uptake im Vergleich aller jeweils untersuchten Organe. Die Tumor/Leber-Uptake-Ratios unterschritten den Wert von 4 bei keinem der Tracer, außer 24 h p. i. mit  $2,70 \pm 2,02$  bei  $^{111}\text{In}$ -3BP-228.

3 h nach Injektion von  $^{111}\text{In}$ -3BP-227 bzw.  $^{111}\text{In}$ -3BP-228 wurden in den Blutproben relativ hohe Aktivitäten von  $2,54 \pm 1,31$  bzw.  $2,01 \pm 0,96$  %ID/g ermittelt, was Tumor/Blut-Uptake-Ratios von  $3,75 \pm 2,47$  bzw.  $5,47 \pm 2,50$  zur Folge hatte, bevor dieser Parameter im Falle der beiden Verbindungen ab 6 h p. i. auf jeweils über 20 anstieg. Der Wash-out von  $^{111}\text{In}$ -3BP-483 aus dem Blut schien am schnellsten, bereits 3 h p. i. zeigte sich darin ein Uptake von lediglich  $0,06 \pm 0,02$  %ID/g.

Relativ hohe Uptake-Werte der Lunge wurden 3 h nach Gabe von  $^{111}\text{In}$ -3BP-227 und  $^{111}\text{In}$ -3BP-228 bestimmt ( $1,63 \pm 0,73$  bzw.  $3,35 \pm 2,44$  %ID/g). Im Falle letzterer Verbindung handelte es sich dabei um die zweithöchste Anreicherung im Vergleich aller jeweils untersuchten Gewebe zu diesem Zeitpunkt. Bei Betrachtung der Einzeldaten dieser Gruppe fielen Werte von bis zu 7,8 %ID/g auf.

Die Gehirne boten in jedem Falle den niedrigsten oder zweitniedrigsten Uptake im Vergleich aller jeweils untersuchten Gewebe.

Die Anreicherungen von Herz, Milz, Fettgewebe, Harnblase, Muskel, Knochen waren generell vergleichsweise niedrig (mit Ausnahme der Harnblase 3 h p. i. bei  $^{111}\text{In}$ -3BP-228 möglicherweise aufgrund vereinzelter Urinverunreinigungen bei geringer Fallzahl) und gaben keinen Hinweis für organspezifische Anreicherung. Die Werte der Tumor/Muskel-Uptake-Ratios betragen durchgängig über 20.

Bioverteilung und Uptake-Ratios von  $^{111}\text{In-3BP-227}$  in weiblichen, HT29-  
xenotransplantierten Nacktmäusen

Uptake [%ID/g]	3 h p. i. n=6	6 h p. i. n=7	12 h p. i. n=9	24 h p. i. n=9
Tumor	7,49 ± 2,94	8,35 ± 3,12	6,82 ± 2,38	2,32 ± 1,28
Herz	1,07 ± 0,31	0,35 ± 0,19	0,42 ± 0,37	0,12 ± 0,07
Lunge	1,63 ± 0,73	0,54 ± 0,24	0,58 ± 0,47	0,37 ± 0,27
Niere*	2,49 ± 0,42	1,73 ± 0,61	2,22 ± 1,06	1,37 ± 0,67
Leber	1,30 ± 0,19	0,78 ± 0,24	1,06 ± 0,65	0,91 ± 0,82 n=8
Milz	0,60 ± 0,25	0,27 ± 0,15	0,46 ± 0,28	0,25 ± 0,17 n=8
Magen**	1,45 ± 1,92	0,28 ± 0,23	0,36 ± 0,45	0,13 ± 0,09
Darm**	1,02 ± 0,23	0,46 ± 0,15	0,37 ± 0,26	0,12 ± 0,04
Fettgewebe	0,67 ± 0,03 n=2	0,20 ± 0,06 n=3	0,13 ± 0,05 n=3	0,22 ± 0,19 n=6
Harnblase	1,01 ± 0,05 n=2	0,47 ± 0,10 n=3	0,26 ± 0,02 n=3	0,24 ± 0,22 n=6
Muskel	0,45 ± 0,18	0,21 ± 0,12	0,25 ± 0,20	0,07 ± 0,04
Knochen	0,71 ± 0,26	0,29 ± 0,10	0,33 ± 0,20	0,16 ± 0,09
Gehirn	0,09 ± 0,02	0,04 ± 0,02	0,09 ± 0,16	0,03 ± 0,01
Blut	2,54 ± 1,31	0,46 ± 0,22	0,22 ± 0,19	0,05 ± 0,03
Urin	11,33 ± 12,37 n=3	8,12 ± 6,85 n=6	2,71 ± 2,75 n=8	0,91 ± 0,94 n=8
Tumor/ Blut	3,75 ± 2,47	20,91 ± 9,45	58,75 ± 43,85	58,95 ± 56,55
Tumor/ Leber	5,97 ± 2,82	11,05 ± 3,64	7,89 ± 3,72	4,58 ± 4,81 n=8
Tumor/ Muskel	20,06 ± 13,27	47,82 ± 21,35	41,33 ± 26,34	39,48 ± 30,25
Tumor/ Niere*	3,18 ± 1,48	5,13 ± 1,36	3,36 ± 1,12	2,05 ± 1,35

**Tabelle 2** Der Uptake wird ausgedrückt als prozentualer Anteil an der Aktivität der injizierten Dosis pro Gramm. Es werden Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben. Weicht n eines Gewebes von der oben aufgeführten Gruppengröße ab, ist es zusätzlich aufgelistet. \*Mittelwerte beider Nieren bzw. Nieren-Ratios. \*\*Organe mit Inhalt.



Bioverteilung und Uptake-Ratios von  $^{111}\text{In}$ -3BP-227 in weiblichen, HEK293-xenotransplantierten Nacktmäusen

Uptake [%ID/g]	12 h p. i. n=3
Tumor	0,64 ± 0,58
Herz	0,18 ± 0,03
Lunge	0,25 ± 0,08
Niere*	1,47 ± 0,38
Leber	0,67 ± 0,12
Milz	0,34 ± 0,11
Magen**	0,11 ± 0,03
Darm**	0,17 ± 0,03
Fettgewebe	0,21 ± 0,05
Harnblase	0,49 ± 0,09
Muskel	0,12 ± 0,04
Knochen	0,19 ± 0,02
Gehirn	0,03 ± 0,003
Blut	0,05 ± 0,02
Urin	0,63 ± 0,46
Tumor/ Blut	16,81 ± 15,07
Tumor/ Leber	1,10 ± 1,19
Tumor/ Muskel	6,61 ± 7,10
Tumor/ Niere*	0,50 ± 0,56

**Tabelle 3** Der Uptake wird ausgedrückt als prozentualer Anteil an der Aktivität der injizierten Dosis pro Gramm. Es werden Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben. \*Mittelwerte beider Nieren bzw. Nieren-Ratios. \*\*Organe mit Inhalt.

Bioverteilung und Uptake-Ratios von  $^{111}\text{In-3BP-228}$  in weiblichen, HT29-  
xenotransplantierten Nacktmäusen

Uptake [%ID/g]	3 h p. i. n=6	6 h p. i. n=9	12 h p. i. n=6	24 h p. i. n=5
Tumor	10,19 ± 5,28	8,04 ± 5,04	6,19 ± 4,02	0,80 ± 0,21
Herz	1,13 ± 0,96	0,20 ± 0,07	0,10 ± 0,03	0,01 ± 0,01
Lunge	3,35 ± 2,44	0,39 ± 0,20	0,52 ± 0,36	0,12 ± 0,14
Niere*	1,49 ± 0,90	0,47 ± 0,12	0,37 ± 0,14	0,16 ± 0,03
Leber	1,18 ± 0,43	0,54 ± 0,06	0,49 ± 0,13	0,42 ± 0,24
Milz	1,04 ± 0,48	0,33 ± 0,18	0,24 ± 0,13	0,06 ± 0,05
Magen**	0,56 ± 0,30	0,67 ± 1,35	0,13 ± 0,11	0,02 ± 0,01
Darm**	0,85 ± 0,36	0,42 ± 0,35	0,22 ± 0,20	0,06 ± 0,04
Fettgewebe	2,00 ± 1,38 n=3	0,21 ± 0,21 n=6	0,17 ± 0,04 n=3	nicht untersucht
Harnblase	4,43 ± 2,66 n=3	0,70 ± 0,80 n=6	0,50 ± 0,16 n=3	nicht untersucht
Muskel	0,34 ± 0,24	0,10 ± 0,06	0,04 ± 0,02	0,02 ± 0,01
Knochen	0,60 ± 0,37	0,16 ± 0,05	0,12 ± 0,05	0,04 ± 0,01
Gehirn	0,08 ± 0,04	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01
Blut	2,01 ± 0,96	0,23 ± 0,11	0,09 ± 0,02	0,11 ± 0,20
Urin	5,64 ± 8,81 n=4	5,59 ± 4,45 n=7	1,43 ± 0,86	0,25 ± 0,18 n=3
Tumor/ Blut	5,47 ± 2,50	46,57 ± 38,05	67,43 ± 35,91	44,38 ± 41,95
Tumor/ Leber	8,70 ± 3,20	14,68 ± 9,16	14,66 ± 13,62	2,70 ± 2,02
Tumor/ Muskel	34,31 ± 12,07	103,2 ± 92,9	147,8 ± 85,2	47,41 ± 26,48
Tumor/ Niere*	7,75 ± 3,78	16,55 ± 9,48	15,88 ± 7,39	5,16 ± 1,10

**Tabelle 4** Der Uptake wird ausgedrückt als prozentualer Anteil an der Aktivität der injizierten Dosis pro Gramm. Es werden Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben. Weicht n eines Gewebes von der oben aufgeführten Gruppengröße ab, ist es zusätzlich aufgelistet. \*Mittelwerte beider Nieren bzw. Nieren-Ratios. \*\*Organe mit Inhalt.

Bioverteilung und Uptake-Ratios von  $^{111}\text{In-3BP-483}$   
in weiblichen, HT29-xenotransplantierten Nacktmäusen

Uptake [%ID/g]	3 h p. i. n=3	6 h p. i. n=5	12 h p. i. n=5	24 h p. i. n=6
Tumor	1,90 ± 0,82	1,63 ± 0,54	0,90 ± 0,38	0,79 ± 0,36
Herz	0,07 ± 0,02	0,06 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01
Lunge	0,20 ± 0,01	0,21 ± 0,04	0,13 ± 0,04	0,11 ± 0,06
Niere*	2,62 ± 0,30	2,73 ± 0,78	3,03 ± 1,16	2,18 ± 0,67
Leber	0,24 ± 0,02	0,22 ± 0,05	0,21 ± 0,06	0,21 ± 0,09
Milz	0,11 ± 0,04	0,12 ± 0,04	0,09 ± 0,03	0,09 ± 0,02
Magen**	0,05 ± 0,02	0,10 ± 0,10	0,07 ± 0,07	0,07 ± 0,08
Darm**	0,21 ± 0,05	0,25 ± 0,23	0,09 ± 0,03	0,12 ± 0,15
Fettgewebe	0,05 ± 0,01 n=2	0,13 ± 0,08	0,08 ± 0,02	0,08 ± 0,02
Harnblase	0,19 ± 0,03	0,18 ± 0,06 n=4	0,20 ± 0,17	0,23 ± 0,15
Muskel	0,08 ± 0,04	0,05 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01
Knochen	0,18 ± 0,18	0,10 ± 0,01	0,08 ± 0,03	0,07 ± 0,03
Gehirn	0,01 ± 0,001	0,01 ± 0,002	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,003
Blut	0,06 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,002
Urin	9,19 ± 5,04	1,35 ± 0,85 n=4	1,66 ± 1,83 n=4	0,43 ± 0,22
Tumor/ Blut	29,82 ± 8,18	81,35 ± 27,20	81,94 ± 41,53	149,5 ± 98,7
Tumor/ Leber	7,66 ± 2,77	7,17 ± 1,31	4,57 ± 2,30	4,03 ± 2,81
Tumor/ Muskel	23,49 ± 2,44	35,76 ± 12,17	30,62 ± 21,21	31,76 ± 20,91
Tumor/ Niere*	0,71 ± 0,26	0,60 ± 0,08	0,31 ± 0,14	0,35 ± 0,18

**Tabelle 5** Der Uptake wird ausgedrückt als prozentualer Anteil an der Aktivität der injizierten Dosis pro Gramm. Es werden Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben. Weicht n eines Gewebes von der oben aufgeführten Gruppengröße ab, ist es zusätzlich aufgelistet. \*Mittelwerte beider Nieren bzw. Nieren-Ratios. \*\*Organe mit Inhalt.

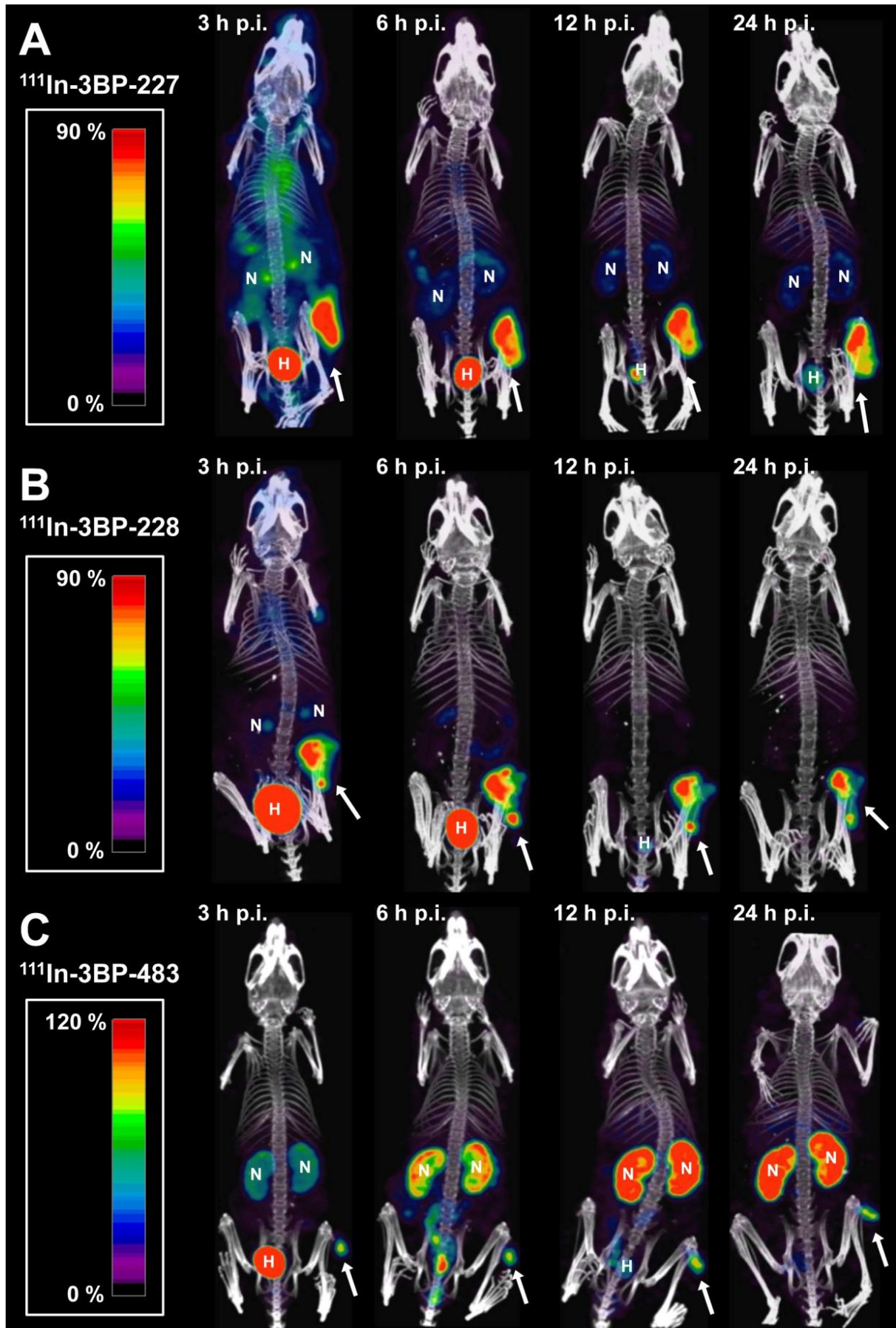
### 3.3 SPECT/CT-Bildgebung

Jeder der drei Tracer ermöglichte eine deutliche Tumorvisualisierung in der SPECT/CT-Bildgebung durch einen hohen Tumor/Hintergrund-Kontrast. Die in **Abbildung 13** dargestellten Aufnahmen bestätigten die Ergebnisse der Biodistributionsstudien.

Bei Fensterung der SPECT-Aufnahmen auf die maximale Impulsrate innerhalb des Tumors des jeweiligen Scans ließ sich die Aktivitätsverteilung in Relation zur Anreicherung in HT29 beurteilen. Nach Applikation von  $^{111}\text{In}$ -3BP-227 bzw.  $^{111}\text{In}$ -3BP-228 wurden die höchsten volumennormierten Impulsraten der Aufnahmen in den Tumoren der jeweiligen Scans ermittelt (teilweise übertroffen vom Signal des Harnblasenlumens). Die Untersuchungen zu  $^{111}\text{In}$ -3BP-227 zeigten 3 h p. i. im Vergleich mit den Aufnahmen der anderen beiden Substanzen deutliche Hintergrundaktivität im Bereich des Rumpfs und des Kopfs. Da das thorakale Maximum dieser über dem Herzen zu erkennen war, handelte es sich am ehesten um im Blutpool transportierte Aktivität und entsprach damit dem vergleichsweise hohen Uptake im Blut dieses Tracers zu diesem Zeitpunkt, welcher in den Biodistributionsstudien ermittelt wurde. Bei tumorrelativer Skalierung zeigten sich, abgesehen vom Harnblasenlumen, nach Applikation von  $^{111}\text{In}$ -3BP-228 keine wesentlichen weiteren SPECT-Signale. Nach Gabe von  $^{111}\text{In}$ -3BP-227 waren im Vergleich damit zu jedem Zeitpunkt p. i. Anreicherungen in den Bereichen der Nieren zu erkennen. Diese Beobachtungen bestätigten die signifikanten Unterschiede der Nierenuptakes und Tumor/Niere-Uptake-Ratios der Biodistributionsstudien.

Nach Injektion von  $^{111}\text{In}$ -3BP-483 zeigten sich bei beschriebener SPECT-Skalierung Anreicherungen im Bereich des Tumors, der Harnblase und der Nieren. 3 h p. i. übertrifft die maximale Aktivität des Tumors die der Nieren in diesem Bildbeispiel, zu späteren Zeitpunkten verhielt es sich andersherum, sodass die Anreicherungen der Nieren als die jeweils höchste in der entsprechenden Aufnahme zu bestimmen waren. Die mittlere Aktivität des Tumors war auch in der Bildgebung zu jedem Aufnahmezeitpunkt niedriger als die der Nieren.

Generell zeigten sich sehr deutliche Anreicherungen in den Bereichen der Harnblasen v. a. während früher Aufnahmen p. i. Diese entsprachen den hohen Aktivitäten der untersuchten Urinproben und legen unter Berücksichtigung der ebenfalls zum Teil starken Nierensignale nahe, dass ein wesentlicher Anteil der injizierten Aktivität renal eliminiert wurde.



**Abbildung 13** SPECT/CT-Scans nach Applikation von  $^{111}\text{In}$ -3BP-227, -228, und -483. Koregistrierte Ganzkörper-SPECT/CT-Scans dreier weiblicher, HT29-xenotransplantierter Nacktmäuse 3, 6, 12 bzw. 24 h p. i. von **A** 22 MBq  $^{111}\text{In}$ -3BP-227 (SPECT-Aufnahmen wurden auf 0 - 90 % der maximalen Zählrate in HT29 im entsprechenden Scan skaliert), **B** 30 MBq  $^{111}\text{In}$ -3BP-228 (Skalierung entsprechend A auf 0 - 90%) bzw. **C** 31 MBq  $^{111}\text{In}$ -3BP-483 (SPECT-Skalierung entsprechend A auf 0 - 120 %; Veränderung der Skalierung im Vergleich zu den anderen beiden Substanzen um Nierenuptake differenzierter darzustellen). **N** Niere, **H** Harnblase, **Pfeil** Tumor.

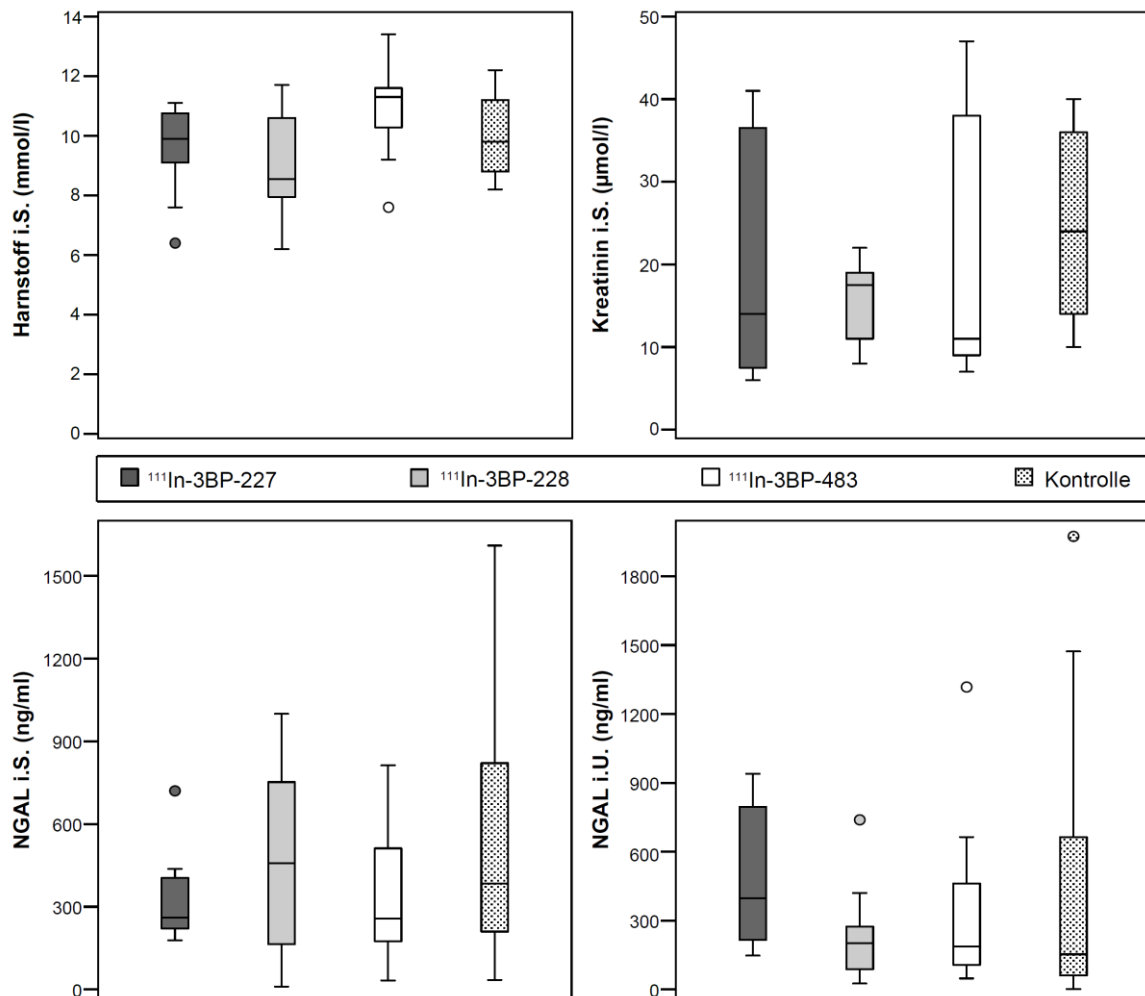
Die aus der VOI-Analyse ermittelten Tumor/Niere-Aktivitäts-Ratios dieser Aufnahmen betragen für **A**  $^{111}\text{In}$ -3BP-227 3 h p. i. 2,01, 6 h p. i. 2,57, 12 h p. i. 2,94, 24 h p. i. 2,67 (zum Vergleich *ex-vivo*-Wert: 2,18), für **B**  $^{111}\text{In}$ -3BP-228 3 h p. i. 3,25, 6 h p. i. 6,93, 12 h p. i. 8,17, 24 h p. i. 6,60 (*ex-vivo*: 5,06) und für **C**  $^{111}\text{In}$ -3BP-483 3 h p. i. 0,86, 6 h p. i. 0,58, 12 h p. i. 0,43, 24 h p. i. 0,49 (*ex-vivo*: 0,51).

Die mittels VOI-Analyse errechneten Werte der Tumor/Niere-Aktivitäts-Ratios wurden mit den korrespondierenden Daten der *ex-vivo*-Biodistribution zum Zeitpunkt 24 h p. i. verglichen. Es ergab sich eine sehr starke Korrelation (Korrelationskoeffizient  $R = 0,97$ ,  $p < 0,001$ ). Bei der Übereinstimmungsanalyse nach Bland-Altman zeigte sich, dass die Bestimmung der Tumor/Nieren-Aktivitäts-Ratios anhand der SPECT-Aufnahmen in 95 % der Fälle Werte lieferte, die bis zu 1,58 kleiner bzw. 1,28 größer waren als die mittels Gammacounter bestimmten Uptake-Ratios.

### 3.4 Evaluation Nephrotoxizität

#### 3.4.1 Parameteranalyse

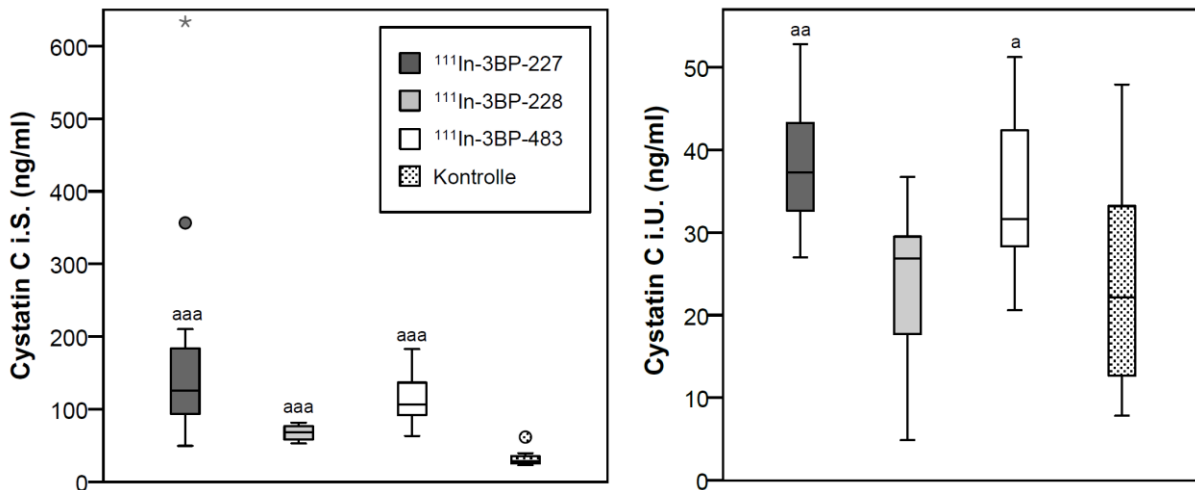
Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der radiotracerinjizierten Gruppen gegenüber den Kontrollen bezüglich der konventionellen Retentionsparameter, Kreatinin und Harnstoff, sowie von NGAL i. S. und i. U. (**Abb. 14**). Auch bei Auftrennung der Daten nach Entnahmezeitpunkten zeigte sich keine signifikante Erhöhung dieser Parameter im Vergleich zur Kontrolle.



**Abbildung 14** Konzentrationen von Harnstoff i.S.: (oben links), Kreatinin i.S.: (oben rechts) sowie NGAL i.S. (unten links) und i. U. (unten rechts) von weiblichen, HT29-xenotranplantierten Nacktmäusen nach Applikation von  $^{111}\text{In}$ -3BP-227,  $^{111}\text{In}$ -3BP-228,  $^{111}\text{In}$ -3BP-483 bzw. Kontrolltieren ohne Substanzinjektion. Mann-Whitney-U-Tests zum Vergleich der einzelnen Tracergruppen gegenüber der Kontrollgruppe ergaben keine signifikanten Unterschiede.

Fallzahlen:

Harnstoff i.S.:  $^{111}\text{In}$ -3BP-227 n=11,  $^{111}\text{In}$ -3BP-228 n=12,  $^{111}\text{In}$ -3BP-483 n=13, Kontrolle n=14;  
 Kreatinin i. S.:  $^{111}\text{In}$ -3BP-227 n=11,  $^{111}\text{In}$ -3BP-228 n=12,  $^{111}\text{In}$ -3BP-483 n=13, Kontrolle n=14;  
 NGAL i. S.:  $^{111}\text{In}$ -3BP-227 n=10,  $^{111}\text{In}$ -3BP-228 n=17,  $^{111}\text{In}$ -3BP-483 n=15, Kontrolle n=21;  
 NGAL i. U.:  $^{111}\text{In}$ -3BP-227 n=12,  $^{111}\text{In}$ -3BP-228 n=17,  $^{111}\text{In}$ -3BP-483 n=15, Kontrolle n=20.

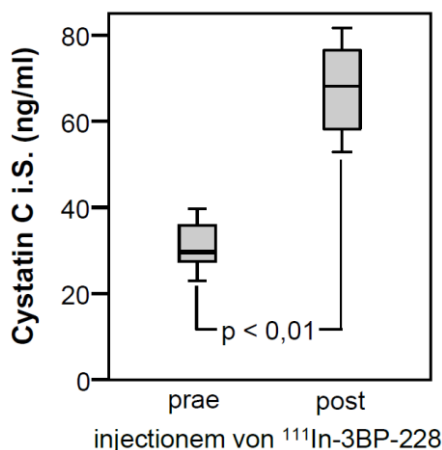


**Abbildung 15** Cystatin C-Konzentrationen i. S. (links) und i. U. (rechts) von weiblichen, HT29-xenotransplantierten Nacktmäusen nach Applikation von  $^{111}\text{In}$ -3BP-227,  $^{111}\text{In}$ -3BP-228,  $^{111}\text{In}$ -3BP-483 bzw. Kontrolltieren ohne Substanzinjektion. Signifikanzanalyse mittels Mann-Whitney-U-Tests zum Vergleich der einzelnen Tracergruppen gegenüber der Kontrollgruppe:  $^a p < 0,05$ ,  $^{aa} p < 0,01$ ,  $^{aaa} p < 0,001$  vs. Kontrolle.

Fallzahlen: Cystatin C i. S.:  $^{111}\text{In}$ -3BP-227 n=11,  $^{111}\text{In}$ -3BP-228 n=12,  $^{111}\text{In}$ -3BP-483 n=13, Kontrolle n=17; Cystatin C i. U.:  $^{111}\text{In}$ -3BP-227 n=9,  $^{111}\text{In}$ -3BP-228 n=10,  $^{111}\text{In}$ -3BP-483 n=12, Kontrolle n=20.

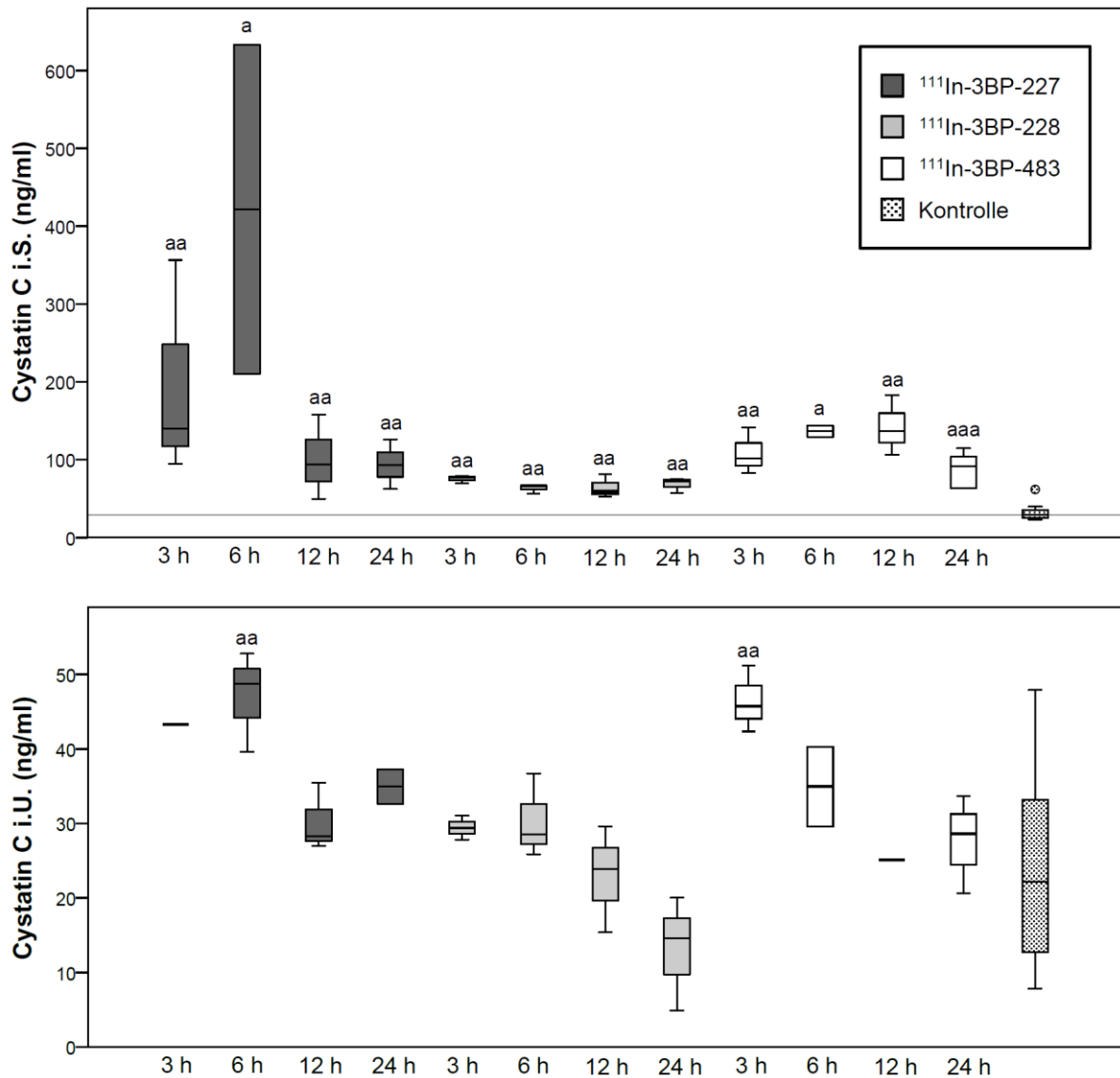
Die Serumkonzentration von Cystatin C zeigten sich in allen tracerinjizierten Gruppen gegenüber der Kontrolle als hochsignifikant erhöht (im Median nach Gabe von  $^{111}\text{In}$ -3BP-227 4,4-fach;  $^{111}\text{In}$ -3BP-228 2,4-fach;  $^{111}\text{In}$ -3BP-483 3,7-fach; **Abb. 15**). Auch bei Betrachtung der nach Entnahmezeiten differenzierten Gruppen ergab sich in jedem Fall eine signifikante Erhöhung des Parameters (**Abb. 17**). Für  $^{111}\text{In}$ -3BP-227 konnte bei der Korrelationsanalyse ein starker Zusammenhang ( $R = 0,72$ ,  $p < 0,05$ ) zwischen Cystatin C-Konzentration i. S. und Nierenmassenaktivität (MBq/g) zum Zeitpunkt der Euthanasie nachgewiesen werden.

Die Bestimmung von Cystatin C i. U. ergab nach Injektion von  $^{111}\text{In}$ -3BP-227 und  $^{111}\text{In}$ -3BP-483 signifikant höhere Werte (im Median 1,7-fach bzw. 1,4-fach; **Abb. 15**), bei der Analyse in Subgruppierungen (**Abb. 17**) zeigte sich diese Differenz lediglich zu je einem Zeitpunkt p. i.



**Abbildung 16** Serum-Cystatin C-Konzentrationen von weiblichen, HT29-xenotransplantierten Nacktmäusen vor und nach Injektion von  $^{111}\text{In}$ -3BP-228. Signifikanzanalyse für verbundenen Stichproben mittels Wilcoxon-Test. Fallzahlen: je n=12.





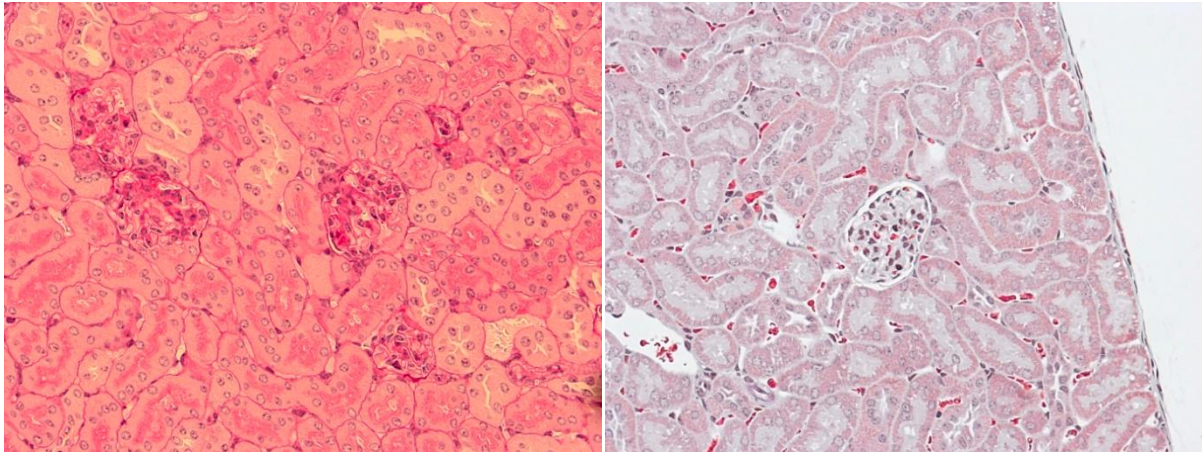
**Abbildung 17** Cystatin C-Konzentrationen i. S. (oben) und i. U. (unten) von weiblichen, HT29-xenotranplantierten Nacktmäusen nach Applikation von  $^{111}\text{In}$ -3BP-227,  $^{111}\text{In}$ -3BP-228,  $^{111}\text{In}$ -3BP-483 subgruppiert nach Entnahmekzeitpunkten bzw. Kontrolltieren ohne Substanzinjektion. In der oberen Grafik Bezugslinie bei  $y = 28,9$  (Median der Kontrollgruppe). Signifikanzanalyse mittels Mann-Whitney-U-Tests zum Vergleich der einzelnen tracerinjizierten Gruppen gegenüber der Kontrollgruppe: <sup>a</sup> $p < 0,05$ , <sup>aa</sup> $p < 0,01$ , <sup>aaa</sup> $p < 0,001$  vs. Kontrolle.

Fallzahlen: Cystatin C i. S.:  $^{111}\text{In}$ -3BP-227 3 h  $n=3$ , 6 h  $n=2$ , 12 h  $n=3$ , 24 h  $n=3$ ;  $^{111}\text{In}$ -3BP-228 3 h  $n=3$ , 6 h  $n=3$ , 12 h  $n=3$ , 24 h  $n=3$ ;  $^{111}\text{In}$ -3BP-483 3 h  $n=3$ , 6 h  $n=2$ , 12 h  $n=3$ , 24 h  $n=5$ ; Kontrolle  $n=17$ ; Cystatin C i. U.:  $^{111}\text{In}$ -3BP-227 3 h  $n=1$ , 6 h  $n=3$ , 12 h  $n=3$ , 24 h  $n=2$ ;  $^{111}\text{In}$ -3BP-228 3 h  $n=3$ , 6 h  $n=3$ , 12 h  $n=3$ , 24 h  $n=3$ ;  $^{111}\text{In}$ -3BP-483 3 h  $n=3$ , 6 h  $n=2$ , 12 h  $n=1$ , 24 h  $n=4$ ; Kontrolle  $n=20$ .

Bei 12 Tieren lagen Werte vor und nach Injektion von  $^{111}\text{In}$ -3BP-228 vor, sodass innerhalb dieser Gruppe intraindividuelle Vergleiche möglich waren. Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung von Cystatin C i. S. nach Applikation (33,4 ng/ml bzw. 3,4-fach; **Abb. 16**). Harnstoff, Kreatinin, Cystatin C i. U., NGAL i. S. und i. U. unterschieden sich nicht signifikant.

### 3.4.2 Nierenhistologie

In den untersuchten Schnitten zeigten sich mit Ausnahme einer Probe keine pathologischen Veränderungen, wie Tubulusschäden, thrombotische Mikroangiopathie, interstitielle oder Glomerulonephritis. In einer Probe waren unspezifische mesangiale Veränderungen zu erkennen, welche als Fixierungsartefakt gewertet wurden. In **Abbildung 18** sind repräsentative histologische Ergebnisse, Normalbefunden entsprechend, dargestellt.



**Abbildung 18** Nierenschnitte nach Injektion von  $^{111}\text{In}$ -3BP-228. Nierenschnitte in PAS-HE- (links) und Masson-Goldner-Trichrom- mit Elastica-Färbung (rechts), jeweils in 20-facher Vergrößerung. Das Gewebe wurde einer weiblichen, HT29-xenotransplantierten Nacktmaus 24 h nach Injektion von 15,7 MBq  $^{111}\text{In}$ -3BP-228 entnommen. Es sind keine pathologischen Veränderungen zu erkennen.

## 4. Diskussion

### 4.1. $^{111}\text{In}$ -3BP-227, -228, -483 – Tracer und Target

Das Vorkommen des NTR1 in mannigfachen Tumorentitäten sowie seine fehlende bzw. sehr geringe Expression in gesundem Gewebe begründen die wissenschaftliche Auseinandersetzung mit dem Rezeptor als pharmakologische Zielstruktur. Insbesondere seine Expression im PDAC, einer Erkrankung mit einer 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate von gerade einmal 6 % (Siegel et al. 2013), welche ihre mangelhafte derzeitige Behandelbarkeit deutlich veranschaulicht, sowie die zunehmende Expression mit steigendem Entartungsgrad verschiedener Krebserkrankungen unterstreichen das Potential dieses Targets.

SR142948A zeigt sowohl zum NTR1 als auch zum NTR2 hohe Affinität und bindet letzteren sogar bevorzugt im Vergleich zum NTR1 (Gully et al. 1997; Betancur et al. 1998). Ein entsprechendes Bindungsverhalten der 3BP-Tracer ist demnach anzunehmen, jedoch bislang nicht untersucht worden. Der NTR2 wird von einer Reihe von Karzinomen, wie dem der Prostata, der Mamma und des Pankreas exprimiert (Maschauer et al. 2015). Im Falle des Prostatakarzinoms konnte gezeigt werden, dass verschiedene Tumorphänotypen unterschiedliche Expressionsmuster von NTR1 und NTR2 aufweisen (Swift et al. 2010). Eine Evaluation der Interaktion der 3BP-Tracer mit dem NTR2 könnte so die potentiellen Indikationen erweitern.

Als Grundlage der Wirkungsweise der Radionuklid-SSTR-Therapie wird die Internalisierung des Liganden-Rezeptor-Komplexes in die Tumorzellen angenommen, da hierdurch eine andauernde Akkumulation in den Zielzellen und eine selektive Schädigung der Zielstruktur ermöglicht werde (Jong et al. 1998). Inwieweit auch nicht internalisierte Radiotracer mit hohem Uptake im Zielgewebe im Vergleich dazu wirkungsvoll sind bzw. ob tatsächlich erst durch die Internalisierung eine therapeutische Wirkung möglich wird, wurde nicht gezeigt. Weder Untersuchungen zur Internalisierung von  $^{111}\text{In}$ -3BP-227, -228 und -483, noch zu deren nicht markierten Counterparts oder von SR142948A liegen vor. Die erzielten hohen Tumoranreicherungen von  $^{111}\text{In}$ -3BP-227 und -228 rechtfertigen die präklinische Testung des therapeutischen Potentials der zu diesem Zwecke Beta-Emitter-markierten Verbindungen. Zuvor wäre das Biodistributionsverhalten der  $^{177}\text{Lu}$ - bzw.  $^{90}\text{Y}$ -gebundenen Verbindungen im Vergleich zu evaluieren, da das Radioisotop Einfluss auf die Kinetik eines Radiopharmakons hat. Zusätzliche Internalisierungsversuche und der Vergleich der Ergebnisse dieser mit denen der weiterführenderen Untersuchungen bezüglich des Einflusses auf das Tumorwachstum im lebenden Organismus würden das Bild vervollständigen. Neurotensin vermittelt über NTR1 onkogenetische Effekte. SR142948A sowie 3BP-227, -228 und -483 wirken antagonistisch an diesem Rezeptor, etwa hemmen sie die Mobilisation von  $\text{Ca}^{2+}$ , als Second Messenger

von NTR1, sodass auch eine Inhibition von Effekten wie die Förderung der Proliferation, Zellmigration, sowie -invasion etc. denkbar wäre. Etwaige tumoristische Effekte der vorliegenden radionuklidgebundenen Radiotracer wären von denen der ungebundenen Tracer abzugrenzen.

Von großer Bedeutung für den Einsatz eines Pharmakons ist auch seine Blut-Hirnschranken-Gängigkeit. Eine Strahlenexposition des ZNS sollte weitestgehend vermieden werden. Gully et al. zeigten für ihre Entwicklung SR142948A den Übertritt ins ZNS bei peripherer Applikation (Gully et al. 1997). Die Biodistributionsergebnisse dieser Arbeit legen ein gegensätzliches Verhalten der 3BP-Tracer nahe – die Gehirne boten in jedem Falle den geringsten bzw. zweitniedrigsten Uptake im Vergleich aller jeweils untersuchten Gewebe. Eine ähnliche Entdeckung machten Lang et al., welche autoradiografisch eine zentralnervöse Anreicherung von SR142948A nachwiesen, nicht jedoch von seinem  $^{18}\text{F}$ -markierten Derivat Diarylpyrazolglucokonjugat 8 (Lang et al. 2013).

#### **4.2 Biodistributionsstudien – Vergleich der 3BP-Tracer und Vorläuferverbindungen**

Die folgenden Arbeiten werden vorrangig anhand der Bioverteilungen der abgehandelten Substanzen in Nagetiermodellen dargestellt, da es sich hierbei um eine der weitestführenden Untersuchungen präklinischer Tracerevaluation handelt und damit Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen dieser Promotionsschrift hergestellt werden kann. Es werden ausschließlich Substanzen besprochen, zu denen bereits Biodistributionsergebnisse vorliegen.

Der überwiegende Teil der Arbeitsgruppen beschäftigt sich mit stabilisierten Neurotensinanaloga, welche mittels unterschiedlicher radiochemischer Strategien an  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ) gebunden werden.

Zwei Publikationen beschreiben NT (7-13)- bzw. NT (8-13)-Analoga, bei denen zur  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Bindung der Chelator HYNIC (Hydrazinonicotinic Acid) verwendet wird. In der Biodistributionsstudie von Teodoro et al. zeigte sich eine hohe und anhaltende Aktivitätsanreicherung in Leber und Niere, ein Tumor wurde nicht *in vivo* untersucht (Teodoro et al. 2011). Bei einer neuen Studie, die diesem Ansatz folgt, zeigten sich zu allen Zeitpunkten nach Injektion in mindestens sechs Organen eine höhere Aktivität als im Tumor (Erfani et al. 2014).

Der von Nock et al. entwickelte Tracer  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Demotensin 4, bei dem die Isotopenbindung über ein azyklisches Tetramin vermittelt wurde, zeigte sich ein besseres Verteilungsprofil, welches jedoch durch einen hohen Nierenuptake kompromittiert wird (Tumor/Niere-Uptake-Ratio < 0,5 4 h p. i., < 1 24 h p. i., Nock et al. 2006).

Ein weiterer Ansatz ist die Bindung mittels Tricarbonyl-Technik, womit Zhang et al. in einem SCLC-Xenograft allerdings keine adäquate Tumoranreicherung erzielen konnten, so über-

stieg der Nierenuptake den des Tumors 4 h p. i. um mehr als das 50-fache (Zhang et al. 2006).

Bruehlmeier et al. entwickelten 2002  $^{99m}\text{Tc}$ -NT-XI, dessen Biodistributionsdaten ebenfalls durch höhere Nieren- als Tumoraufnahme ein ungünstiges Profil bot. In einer klinischen Pilotstudie zeigte sich eine deutliche szintigrafische Anreicherung im NTR1-positiven PDAC eines Patienten (Buchegger et al. 2003). Weitere Modifikationen führten zur Entwicklung von  $^{99m}\text{Tc}$ -NT-XIX, welches im Tiermodell ab fünf Stunden nach Applikation die höchste Anreicherung im Tumor, HT29, zeigt (**Tab. 6**). In einer Therapiestudie im Mausmodell konnte bei der hierfür mit  $^{188}\text{Rhenium}$  ( $^{188}\text{Re}$ ) markierten Substanz ein therapeutischer Effekt in den ersten sechs Tagen nach Applikation, jedoch keine langfristige Verringerung des Tumorwachstums gezeigt werden (García-Garayoa et al. 2009).

Die Bindung mehrerer Neurotensinanaloga in verzweigten Strukturen um einen nuklidkomplexierenden Chelator stellt eine weitere Herangehensweise dar. Eine mit  $^{64}\text{Cuprum}$  (Kupfer) markierte Verbindung diesen Typs führte zu substantieller renaler und retikuloendothelialer Akkumulation (Röhrich et al. 2011).

Auch der Versuch der simultanen Bindung von NTR1 und einem Tumorantigen, in diesem Falle das carcinoembryonale Antigen (CEA), brachte keine wesentliche Optimierung des Verteilungsprofils (Hillairet De Boisferon, Marc et al. 2002).

Weitere Arbeitsgruppen beschäftigen sich mit der  $^{18}\text{F}$ -Markierung von Neurotensinanaloga für die PET. Der Tracer von Bergmann et al. zeigte dabei geringe NTR1-Affinität und mangelhafte Stabilität (Bergmann et al. 2002).

Wu et al. hingegen synthetisierten mit  $^{18}\text{F}$ -DEG-VS-NT einen Tracer mit hoher relativer Tumoraufnahme zwei Stunden nach Applikation (Wu et al. 2014). 0,5 h p. i. überstieg der Nierenuptake den des Tumors noch um mehr als das 4-fache, 2 h p. i. kehrte sich dieses Verhältnis mit einer Tumor/Niere-Uptake-Ratio von ca. 2 um. Es konnte eine klare Tumorvisualisation in der PET erzielt werden. Die absoluten Werte der Anreicherung in HT29 waren jedoch mit 0,85 - 1,30 %ID/g vergleichsweise gering. Eine potentielle therapeutische Verwendbarkeit des Tracers unter Nutzung der gewählten Markierungsstrategie wurde nicht beschrieben.

Ein Versuch der DTPA-Konjugation führte ebenso zu relativ höheren Nierenanreicherungen (Visser et al. 2003).

Auch DOTA-Konjugate wie  $^{111}\text{In}$ -DOTA-NT-20.3 (**Tab. 6**, Alshoukr et al. 2011) oder die neueren Verbindungen  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-NT-Cys5.5 als PET-Tracer (Deng et al. 2015) oder  $^{177}\text{Lu}$ -N1, welcher durch Modifikationen der Länge des Spacers entstand (Jia et al. 2015), zeigten ein ähnliches Verhalten. Ein weiterer aktueller Ansatz von Mascarin et al. führte über eine Sub-

stitution der Amid- durch eine Triazolgruppe zu DOTA-NT(8-13)-Analoge. Hiervon zeigten  $^{177}\text{Lu}$ -NT VI und  $^{177}\text{Lu}$ -NT IX 1 h p. i. die höchste Anreicherung in HT29 im Vergleich aller untersuchten Gewebe ( $^{177}\text{Lu}$ -NT VI  $2,0 \pm 0,3$  in HT29 und  $1,8 \pm 0,3$  %ID/g in den Nieren;  $^{177}\text{Lu}$ -NT IX  $2,2 \pm 0,6$  % in HT29 und  $1,6 \pm 0,4$  %ID/g in den Nieren; Mascarin et al. 2015)  $^{177}\text{Lu}$ -NT VI bietet ab 4 h p. i. ein geringfügig günstigeres Verteilungsprofil und wird in **Tabelle 6** dargestellt. Der therapeutische Einsatz von DOTA-konjugiertem  $^{177}\text{Lu}$ -NT-127 führte bei Einmalgabe zur signifikanten Verringerung des Tumowachstums im HT29-Xenograft, Bioverteilungsdaten hierzu fehlen jedoch (Maschauer et al. 2014).

2013 entwickelten Lang et al. das NTR1-antagonistische SR142948A-Derivat Diarylpyrazolglucokongugat 8 für die Diagnostik mittels PET (Lang et al. 2013). Es zeigte *in vitro* eine hohe NTR1-Affinität und -Selektivität. Mit dem  $^{18}\text{F}$ -markierten Tracer wurde eine Biodistributionsstudie im HT29-Xenograft-Nacktmausmodell 10, 30 und 60 min nach Injektion durchgeführt. Zum letzten Zeitpunkt zeigt der Tumor die stärkste Anreicherung im Vergleich aller untersuchter Organe, allerdings mit einem vergleichsweise niedrigen absoluten Wert von  $0,74 \pm 0,14$  %ID/g. Zweithöchster Uptake zu diesem Zeitpunkt fand sich in der Leber mit ca.  $0,5$  %ID/g, die Nieren zeigten kaum Aktivitätsaufnahme bei einer Tumor/Nieren-Uptake-Ratio von ca.  $7,5 \pm 0,6$ . Für die genutzte Markierung mittels eines Ansatzes der „Klickchemie“, welche auf der Bindung eines Alkyls basiert (Kolb et al. 2001), wurde keine Nutzbarkeit für eine therapeutische Applikation beschrieben.

In **Tabelle 6** werden die besten bisher publizierten Biodistributionsdaten von radionuklidmarkierten Neurotensinanaloga denen der drei 3BP-Tracer zum Vergleich gegenübergestellt.

Wie auch die aufgeführten peptidischen bzw. peptidomimetischen, NTR1-gerichteten Tracer  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -NT-XIX ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -(NHis)Ac-Arg-(N-CH<sub>3</sub>)-Arg-Pro-Dmt-Tle-Leu),  $^{111}\text{In}$ -DOTA-NT-20.3 ( $^{111}\text{In}$ -Ac-Lys(DOTA)-Pro-Me-Arg-Arg-Pro-Tyr-Tle-Leu-OH) und  $^{177}\text{Lu}$ -NT VI ( $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-PEG4-Arg-ψ[Tz]-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu) wurden die  $^{111}\text{In}$ -markierten Verbindungen 3BP-227, -228 und -483 bezüglich ihrer Biodistributionen in HT29-xenotransplantierten Nacktmäusen evaluiert.

Alle Verbindungen erzielten eine deutliche Tumoranreicherung.  $^{111}\text{In}$ -3BP-227 und -228 zeigten zu den Untersuchungszeitpunkten 3 - 4 und 5 - 6 h p. i. den höchsten absoluten HT29-Uptake im Vergleich der sechs Substanzen. 24 h p. i. erreichten  $^{111}\text{In}$ -3BP-227 und  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -NT-XIX die größten Tumoranreicherung mit  $2,3 \pm 1,3$  bzw.  $2,5 \pm 0,2$  %ID/g, alle anderen Verbindungen wiesen deutlich geringere Werte auf.

Autor/ Entwickler	García-Garayoa et al. 2009;	Alshoukr et al. 2011	Mascarin et al. 2015	3B-Pharmaceuticals		
Tracer	<sup>99m</sup> Tc-NT-XIX	<sup>111</sup> In-DOTA-NT-20.3	<sup>177</sup> Lu-NT VI	<sup>111</sup> In-3BP-227	<sup>111</sup> In-3BP-228	<sup>111</sup> In-3BP-483
Beschreibung Tracer	Neurotensin-Analogon (3 Sequenzmodifikationen), <sup>99m</sup> Tc- bzw. <sup>188</sup> Re-Markierung mittels Tricarbonyl-Technik	Neurotensin-Analogon (2 Sequenzmodifikationen), <sup>111</sup> In-Markierung mittels DOTA-Derivatisierung	Triazol-basiertes NT(8-13)-Analogon, <sup>177</sup> Lu-Markierung mittels DOTA-Derivatisierung	SR142948A-Derivatisierungen, <sup>111</sup> In-Markierung mittels DOTA		
Ergebnisse Biodistribution		<b>3 h (n=11):</b>	<b>4 h (n=4-5)</b>	<b>3 h (n=6):</b>	<b>3 h (n=6):</b>	<b>3 h (n=3):</b>
	NA	<b>Ni</b> 4,9 ± 0,4	<b>Ni</b> 1,9 ± 0,2	<b>Tu</b> 7,5 ± 2,9	<b>Tu</b> 10,2 ± 5,3	<b>Ni</b> 2,6 ± 0,3
	NA	<b>Tu</b> 2,5 ± 0,2	<b>Tu</b> 1,5 ± 0,5	<b>Bl</b> 2,5 ± 1,3	<b>Ha</b> 4,4 ± 2,7	<b>Tu</b> 1,9 ± 0,8
	NA	<b>Di</b> 1,1 ± 0,3	<b>Dü</b> 1,1 ± 0,2	<b>Ni</b> 2,5 ± 0,4	<b>Lu</b> 3,4 ± 2,4	<b>Le</b> 0,2 ± 0,1
	NA	<b>Dü</b> 0,5 ± 0,1	<b>Di</b> 0,5 ± 0,1	<b>Lu</b> 1,6 ± 0,7	<b>Bl</b> 2,0 ± 1,0	<b>Da</b> 0,2 ± 0,1
<b>Tu/Bl</b>	NA	170 ± 30	NA	3,8 ± 2,5	5,5 ± 2,5	29,8 ± 8,2
<b>Tu/Ni</b>	NA	0,5 ± 0,1	0,8 ± 0,4	3,2 ± 1,5	7,8 ± 3,8	0,7 ± 0,3
<b>Tu/Le</b>	NA	21 ± 2	NA	6,0 ± 2,8	8,7 ± 3,2	7,7 ± 2,8
<b>Tu/Mu</b>	NA	130 ± 20	NA	20,1 ± 13,3	34,3 ± 12,1	23,5 ± 2,4
	<b>5 h:</b>	<b>6 h (n=7):</b>		<b>6 h (n=7):</b>	<b>6 h (n=9):</b>	<b>6 h (n=5):</b>
	<b>Tu</b> 5,2 ± 0,5	<b>Ni</b> 5,2 ± 0,5	NA	<b>Tu</b> 8,4 ± 3,1	<b>Tu</b> 8,0 ± 5,0	<b>Ni</b> 2,7 ± 0,8
	<b>Da</b> 3,4 ± 0,7	<b>Tu</b> 1,9 ± 0,2	NA	<b>Ni</b> 1,7 ± 0,6	<b>Ha</b> 0,7 ± 0,8	<b>Tu</b> 1,6 ± 0,5
	<b>Ni</b> ~2,9 ± 0,2	<b>Di</b> 1,5 ± 0,5	NA	<b>Le</b> 0,8 ± 0,2	<b>Ma</b> 0,7 ± 1,4	<b>Da</b> 0,3 ± 0,2
	<b>Le</b> ~1,2 ± 0,1	<b>Dü</b> 0,3 ± 0,1	NA	<b>Lu</b> 0,5 ± 0,2	<b>Le</b> 0,5 ± 0,1	<b>Le</b> 0,2 ± 0,1
<b>Tu/Bl</b>	~28,1 ± 2,5	420 ± 90	NA	20,9 ± 9,5	46,6 ± 38,1	81,4 ± 27,2
<b>Tu/Ni</b>	~1,9 ± 0,1	0,3 ± 0,1	NA	5,1 ± 1,4	16,6 ± 9,5	0,6 ± 0,1
<b>Tu/Le</b>	~4,5 ± 0,7	17 ± 3	NA	11,1 ± 3,6	14,7 ± 9,2	7,2 ± 1,3
<b>Tu/Mu</b>	NA	80 ± 20	NA	47,8 ± 21,4	103,2 ± 92,9	35,8 ± 12,2
	<b>24 h:</b>	<b>24 h (n=4):</b>	<b>24 h (n=4-5)</b>	<b>24 h (n=9):</b>	<b>24 h (n=5):</b>	<b>24 h (n=6):</b>
	<b>Tu</b> 2,5 ± 0,2	<b>Ni</b> 2,5 ± 0,1	<b>Ni</b> 1,1 ± 0,2	<b>Tu</b> 2,3 ± 1,3	<b>Tu</b> 0,8 ± 0,2	<b>Ni</b> 2,2 ± 0,7
	<b>Da</b> ~1,2 ± 0,2	<b>Tu</b> 1,3 ± 0,2	<b>Tu</b> 1,0 ± 0,3	<b>Ni</b> 1,4 ± 0,7	<b>Le</b> 0,4 ± 0,2	<b>Tu</b> 0,8 ± 0,4
	<b>Ni</b> ~0,9 ± 0,1	<b>Dü</b> 0,3 ± 0,1	<b>Dü</b> 0,7 ± 0,1	<b>Le</b> 0,9 ± 0,8	<b>Ni</b> 0,2 ± 0,1	<b>Le</b> 0,2 ± 0,1
	<b>Le</b> ~0,2 ± 0,1	<b>Di</b> 0,2 ± 0,1	<b>Di</b> 0,3 ± 0,1	<b>Lu</b> 0,4 ± 0,3	<b>Lu</b> 0,1 ± 0,1	<b>Da</b> 0,1 ± 0,2
<b>Tu/Bl</b>	~118 ± 14	500 ± 100	NA	59,0 ± 56,6	44,4 ± 42,0	149,5 ± 98,7
<b>Tu/Ni</b>	~2,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1	NA	2,1 ± 1,4	5,2 ± 1,1	0,4 ± 0,2
<b>Tu/Le</b>	~8,3 ± 0,6	15 ± 1	NA	4,6 ± 4,8	2,7 ± 2,0	4,0 ± 2,8
<b>Tu/Mu</b>	NA	110 ± 20	NA	39,5 ± 30,0	47,4 ± 26,5	31,8 ± 20,9

**Tabelle 6** Gegenüberstellung der Biodistributionsdaten ausgewählter NTR1-Agonisten und der von <sup>111</sup>In-3BP-227, -228 sowie -483. Für etwa korrespondierende Untersuchungszeitpunkte p. i. sind jeweils die vier Gewebe mit dem höchsten Uptake (%ID/g) im Vergleich aller entnommenen Gewebe aufgelistet. Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichungen angegeben. Die Auflistung von oben nach unten entspricht der Höhe des relativen Uptakes

vom höchsten zum viertniedrigsten. Die in den verschiedenen Arbeiten untersuchten bzw. angegebenen Gewebe entsprechen nicht in jedem Falle denen der Untersuchungen dieser Arbeit. **Bl** Blut, **Da** Darm, **Di** Dickdarm, **Dü** Dünndarm, **Ha** Harnblase, **He** Herz, **Kn** Knochen, **Le** Leber, **Lu** Lunge, **Ma** Magen, **Mi** Milz, **Mu** Muskel, **Ni** Niere, **Tu** Tumor, **Tu/Bl** Tumor/Blut-Uptake-Ratio, **Tu/Ni** Tumor/Niere-Uptake-Ratio, **Tu/Le** Tumor/Leber-Uptake-Ratio, **Tu/Mu** Tumor/Muskel-Uptake-Ratio, ~ circa (Wert aus Grafik entnommen).

3 bzw 4 h p. i. sind  $^{111}\text{In}$ -3BP-227 und -228 die einzigen beiden unter den aufgeführten Verbindungen, deren höchste Anreicherung im Tumor zu finden war und deren Tumor/gesundes Gewebe-Uptake-Ratios entsprechend über eins betragen. Zum Zeitpunkt 5 - 6 h p. i. zeigte dieses Verhalten auch  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -NT-XIX, allerdings im Vergleich zu den nächsten drei meistanreichernden Geweben, Darm, Niere und Leber, in wesentlich geringerem Verhältnis. Die Tumor/Niere-Uptake-Ratio stellte sich im Falle von  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -NT-XIX 24 h p. i. etwas günstiger dar als die von  $^{111}\text{In}$ -3BP-227. Den zweithöchsten Uptakewert nach der hohen relativen Tumoranreicherung von  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -NT-XIX 6 und 24 h p. i. bot der Darm; 1,5 h p. i. mit  $6,0 \pm 2,3$  %ID/g sogar den höchsten Uptake (Daten nicht gezeigt). Die intestinale Aktivitätsakkumulation schien bei den 3BP-Tracern eine eher untergeordnete Rolle zu spielen.

$^{111}\text{In}$ -3BP-483 zeigte insgesamt das ungünstigste Verteilungsmuster im Vergleich der drei 3BP-Verbindungen. Der Uptake von dieser Verbindung war zu allen Entnahmezeiten signifikant geringer als mindestens eine der anderen beiden 3BP-Tracer. Die Tumor/Niere-Uptake-Ratios von  $^{111}\text{In}$ -3BP-483 waren in jedem Falle kleiner eins und nahmen mit zunehmender Zeit p. i. ab, was einen schnelleren Wash-out aus dem Tumor als aus den Nieren anzeigte. Auch im Vergleich mit den drei in **Tabelle 6** aufgeführten Neurotensinanaloga schien das Biodistributionsprofil von  $^{111}\text{In}$ -3BP-483 i. S. von absolutem Tumoruptake und Tumor/Niere-Uptake-Ratio nicht vorteilhaft.

Die Biodistributionen von  $^{111}\text{In}$ -3BP-227 und -228 waren ähnlich.  $^{111}\text{In}$ -3BP-228 bot günstigere mittlere Tumor/Nieren-Uptake-Ratios von 5,2 - 16,6 als  $^{111}\text{In}$ -3BP-227 mit Werten zwischen 2,1 und 5,1. Insgesamt zeigte sich das Verhältnis der Tumoranreicherung zu der des Hintergrunds 3, 6 und 12 h p. i. als sehr günstig. Die zum Teil hohen Lungenanreicherungen 3 h p. i. kompromittierten das Verteilungsergebnis von  $^{111}\text{In}$ -3BP-228 etwas. Der signifikant höhere Tumoruptake von  $^{111}\text{In}$ -3BP-227 24 h p. i. ( $p = 0,020$  vs.  $^{111}\text{In}$ -3BP-228) implizierte eine länger anhaltende Anreicherung im Zielgewebe dieser Substanz. Interessanterweise spiegelten die Biodistributionsergebnisse der 3BP-Tracer mit hohem Tumoruptake von  $^{111}\text{In}$ -3BP-227 und -228 und geringerer Anreicherung von  $^{111}\text{In}$ -3BP-483 die *in-vitro*-Daten der Verbindungen wider. So zeigten erstere Verbindungen im Vergleich zu letzterer in den von Osterkamp et al. durchgeführten funktionellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisations-Tests eine deutlich höhere inhibitorische Aktivität.



Die Verbindungen 3BP-227 und -228 ergaben im Vergleich zu NTR1-Agonisten vorteilhafte Verteilungseigenschaften. Beide Substanzen scheinen somit geeignet für weiterführende präklinische Evaluationen, insbesondere ihrer therapeutischen Potenz im Bezug auf das Wachstum NTR1-positiver Tumoren.

### 4.3 SPECT/CT-Bildgebungsstudien

Bildoptisch entsprachen sich die Verteilungsmuster der *ex-vivo*-Biodistribution und der SPECT/CT-Scans, was für das hohe Potential der Tracer für eine diagnostische Applikation spricht. Eine Tumorkalisation war in diesem experimentellen Setting in jedem Falle eindeutig möglich.

In den SPECT-Scans nach Applikation von  $^{111}\text{In}$ -3BP-228 zeigte sich bereits zu frühen Aufnahmezeitpunkten die mit Abstand höchste relative Anreicherung des jeweiligen Scans im Tumor (abgesehen vom Harnblasenlumen). Die Verbindung scheint somit ohne Einschränkung des Untersuchungszeitpunkts (nach den Untersuchungsergebnissen dieser Arbeit zwischen 3 und 24 h p. i.) für eine eindeutige Tumordetektion ohne Kompromittierung durch relevante relative Anreicherung gesunder Gewebe auch in anderen Lokalisationen geeignet. Einzelfälle auffälliger Lungenanreicherung zeigten sich jedoch auch szintigrafisch, was bei weiterer Evaluation dieser Verbindung besondere Beachtung finden sollte.

In den SPECT-Aufnahmen 3 h p. i. von  $^{111}\text{In}$ -3BP-227 war eine relativ hohe Hintergrundaktivität auffällig, die nach den *ex-vivo*-Biodistributionsdaten zu diesem Zeitpunkt zu urteilen, durch entsprechende Aktivitätsanteile im Blutpool zu erklären war. Zu späteren Zeitpunkten konnte diese Beobachtung nicht mehr gemacht werden. Die Nieren zeigten einen relevanten relativen Uptake. Diese Verteilungseigenschaften müssen als potentielle Einflussfaktoren auf die Sensitivität einer diagnostischen Anwendung der Verbindung berücksichtigt werden, so bei der Wahl des Untersuchungszeitpunktes nach Applikation und bei einer möglichen, in diesem Sinne bildgeberisch ungünstigen anatomischen Lagebeziehung der Zielstruktur zu den Nieren.

Für eine diagnostische Applikation von  $^{111}\text{In}$ -3BP-228 gilt letztere Einschränkung entsprechend.

### 4.4. Beziehung Biodistributions- und SPECT/CT-Bildgebungsstudien

Die zu den Biodistributionsstudien zusätzlich durchgeführte Bildgebung erweiterte das methodische Spektrum der *in-vivo*-Evaluation der Verbindungen. Zum einen gelang somit der Beweis ihrer Nutzbarkeit als Diagnostika. Zum anderen erlaubte die dreidimensionale szintigrafische Darstellung Aussagen, welche über die der Biodistributionsversuche hinausgehen.

So ließen sich mithilfe dieser z. B. Anreicherungsunterschiede innerhalb eines Gewebes erkennen, was durch die *ex-vivo*-Biodistribution kaum möglich gewesen wäre. So könnten beispielsweise differente Verteilungsmuster innerhalb des Tumorgewebes ein Hinweis auf das Vorliegen nekrotischer Anteile liefern.

Die Technik erlaubt eine Bestimmung absoluter nuklidspezifischer Aktivitätswerte innerhalb der gesamten SPECT-Aufnahme oder aus Teilbereichen dieser, z. B. für einzelne Organe. Somit ist eine Erhebung von Verteilungsdaten anhand der Bilddaten möglich und lässt an die Alternative einer der *ex-vivo*-Biodistribution entsprechenden Verteilungsanalyse ausschließlich oder überwiegend anhand der Bilddaten denken. Vorteilhaft hieran wäre insbesondere die Möglichkeit der Tierzahlreduktion, da in diesem Falle ein einzelnes Tier Biodistributionswerte zu mehreren Zeitpunkten p. i. liefern könnte. Für die Bildgebungen im Rahmen dieser Arbeit wurden als anatomische Vergleichsaufnahmen CT angefertigt. Dieses Verfahren erlaubt die Abgrenzung benachbarter Weichteilgewebe ohne zusätzliche Kontrastmittelgabe nur unzureichend. Insofern war eine Datenerhebung im Umfang der *ex-vivo*-Biodistribution nicht möglich. Die Volumetrierung von Tumoren und Nieren in den Aufnahmen dieser Arbeit war jedoch aufgrund der deutlichen SPECT-Signale ausreichend sicher möglich. Beim Vergleich der daraus errechneten Tumor/Niere-Aktivitäts-Ratios mit den *ex-vivo*-Werten ergab sich zwar eine sehr starke Korrelation beider, die Bland-Altman-Analyse zeigte allerdings für diesen Parameter unzureichend große Übereinstimmungsgrenzen. Zu den hier vorgestellten Untersuchungen vergleichbare Studien beschränken ihre Aussagen aufgrund ihrer Bildgebungsversuche auf Beschreibungen der Aufnahmen oder führen semiquantitative Analysen im Sinne der Errechnung von Ratios durch um ihre *ex-vivo*-Biodistributionsergebnisse zu untermalen. Es gibt bislang kaum Beispiele in der Literatur für die Durchführung einer Biodistributionsstudie von Radiopharmaka anhand nuklearmedizinischer Bildgebungsverfahren. Die Einbeziehung alternativer Bildgebungsmodalitäten wie die der MRT oder der PET könnten das methodische Spektrum erweitern. Unter den Voraussetzungen der Verfeinerung der Datenanalyse und der Berücksichtigung potentieller Einflussfaktoren auf die Ergebnisse durch Anwendung der Verfahren ist das Potential der Durchführung von Biodistributionsstudien vorrangig anhand von Bilddaten kritisch zu evaluieren.

## 4.5 Evaluation Nephrotoxizität

Vor dem Hintergrund der möglichen Nierenschädigung bei Verwendung von v. a.  $^{90}\text{Y}$ -markierten Präparaten in der SSTR-Radionuklid-Therapie (Moll et al. 2001) und der hohen Nierenanreicherung von Neurotensinanaloga als Vorläuferverbindungen zu den in dieser Arbeit untersuchten Tracern wurde besonderes Augenmerk auf die Evaluation einer potentiellen Nephrotoxizität als Substanznebenwirkung gelegt. Beispiele für funktionelle oder morphologische Nierenschädigungen nach Verwendung von  $^{111}\text{In}$ -markierten Produkten sind nicht veröffentlicht, in einer Phase I-Studie zum therapeutischen Einsatz von [ $^{111}\text{In-DTPA}^0$ ]-Octreotid an 50 Patienten wurde nicht von renaler Toxizität berichtet (Valkema et al. 2002). Einen Erklärungsansatz hierfür liefern die unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften der Nuklide.  $^{90}\text{Y}$  emittiert  $\beta^-$ -Partikel mit einer maximalen Gewebedurchdringung von 12 mm, wohingegen die bei Zerfall von  $^{111}\text{In}$  entstehenden Auger-Elektronen lediglich eine Gewebereichweite von 10  $\mu\text{m}$  aufweisen. Innerhalb der Tubuluszellen emittierte Auger-Elektronen erreichen demnach nicht die strahlensensiblen Glomeruli (Forrer et al. 2007). Von einer erfassbaren Schädigung nach Applikation diagnostischer Dosen der 3BP-Tracer war also nicht auszugehen, sollte jedoch auch mit dem Gedanken an den möglichst effizienten Tiereinsatz als zusätzliche Dimension der Untersuchungen mit berücksichtigt werden.

Zu diesem Zwecke wurden zum einen die konventionellen Retentionsparameter Kreatinin und Harnstoff, sowie neuere Biomarker der Nierenschädigung NGAL und Cystatin C bestimmt. Zum Ausschluss morphologischer Veränderungen wurden außerdem histologische Untersuchungen durchgeführt.

Kreatinin gilt als Suchtest zur Überprüfung der Nierenfunktion und hat einen großen Stellenwert in der klinischen Routinediagnostik. So wird es beispielsweise als Kontrollparameter beim Einsatz nephrotoxischer Medikamente wie Aminoglykosiden oder Zytostatika regelmäßig bestimmt. Die Serumkreatininkonzentration steigt allerdings erst ab einer Einschränkung der glomerulären Filtrationsrate von 50 %, marginale Funktionseinschränkungen sind daher nicht an einem Konzentrationsanstieg dieses Parameters zu erkennen. Bei akutem Nierenversagen ergeben sich erhöhte Werte erst mit einer Verzögerung von mehreren Stunden, wohingegen der Serumharnstoff etwas schneller ansteigt. Der Harnstoffspiegel hängt neben der glomerulären Nierenfunktion auch von Proteinzufuhr und -katabolismus ab, weshalb er nur bedingt als Kontrollgröße der Nierenfunktion geeignet ist, jedoch auch in der Routinediagnostik erfasst wird. Mit einer Erhöhung dieses Parameters ist ebenso erst bei einer Verringerung der glomerulären Filtrationsrate von mindestens 50 % zu rechnen.

Im Falle der Analyse der beiden Parameter Kreatinin und Harnstoff ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und Falltieren, demnach ist erwartungsgemäß nicht von einer entsprechenden glomerulären Funktionseinschränkung auszugehen.

Das niedermolekulare Protein NGAL ist bereits 2 - 6 Stunden nach toxischer, ischämischer oder septischer Schädigung der Nieren in erhöhter Konzentration im Urin und im Serum nachweisbar. Seine Konzentration korreliert dabei mit der Dauer und Schwere der akuten Niereninsuffizienz (Thomas 2012, S. 617, 677). Beim Vergleich dieses Parameters im Urin sowie im Serum ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrollen und den Fallgruppen, sodass nicht von einer entsprechenden Schädigung auszugehen ist.

Cystatin C stellt sich als empfindlicherer Marker der akuten Niereninsuffizienz und von chronischen Nierenerkrankungen im Vergleich zu Kreatinin dar. So wird es zur frühzeitigen Diagnose einer vermuteten mäßigen Einschränkung der Nierenfunktion v. a. bei Kindern und älteren Menschen, bei denen die Aussagekraft von Kreatinin durch schwerwiegenderen Einfluss von Störgrößen kompromittiert wird, bei Verdacht auf akute Niereninsuffizienz und zur Kontrolle der Nierenfunktion unter Zytostatikatherapie bestimmt. Serum-Cystatin C ist ein geeigneterer Marker der Nierenfunktion als Kreatinin, da es besser mit der gemessenen glomerulären Filtrationsrate korreliert (Laterza et al. 2002) und es eine geringere interindividuelle Variation aufweist (Keevil et al. 1998). Das fast vollständig glomerulär filtrierte Cystatin C wird von proximalen Tubuluszellen metabolisiert, eine tubuläre Sekretion des Moleküls erfolgt bei intakten Tubulusepithel nicht, sodass erhöhte Konzentrationen im Urin für eine Störung der Tubulusfunktion sprechen.

Eine signifikante Erhöhung der Serumkonzentration von Cystatin C nach Applikation einer der <sup>111</sup>In-markierten Verbindungen konnte in jedem Falle – auch bei Differenzierung der Gruppen nach Entnahmezeitpunkten – nachgewiesen werden. Anhand des intraindividuellen Vergleichs der Werte vor und nach Injektion von <sup>111</sup>In-3BP-228, welcher bei 12 Tieren möglich war, zeigte sich eine im Median 3,4-fache, signifikante Erhöhung von Cystatin C i. S. nach Tracerapplikation. Das Setting der Untersuchungen war nicht darauf ausgelegt, den Einfluss des experimentellen Procederes mit Injektion und ggf. Narkosen zur Bildgebung als von der Substanzwirkung unabhängige mögliche Einflussfaktoren auf die Cystatin C-Konzentration zu evaluieren bzw. auszuschließen. Ebenso wurde die diesbezügliche Wirkung der unmarkierten Verbindungen nicht untersucht. Entsprechende scheininjizierte bzw. -behandelte oder Vehicle-Gruppen wurden aus Gründen der Tierzahlreduktion nicht in die Konzeption einbezogen. Hinweise darauf, dass die radioaktiven Substanzen wenigstens mitbeteiligt sind an der Verursachung des Cystatin C-Anstiegs liegen allerdings vor. So besteht eine starke Korrelation zwischen injizierter Dosis und der in den Nieren bei Euthanasie ermittelten Aktivität pro Masse im Falle der <sup>111</sup>In-3BP-227-Gruppe. Auch die Beobachtung,

dass der geringste Parameteranstieg nach Gabe der Substanz mit den signifikant niedrigsten Nierenuptake-Werten zu sehen war, unterstützt die Vermutung einer Radiotracer-abhängigen Cystatin C-Erhöhung.

Eine Konzentrationssteigerung von Cystatin C im Urin wurde lediglich jeweils zu einem Zeitpunkt p. i. nach Applikation von  $^{111}\text{In}$ -3BP-227 und  $^{111}\text{In}$ -3BP-483 – bei einer geringen Gruppengröße von je  $n = 3$  – nachgewiesen. Dieser Befund ist als uneindeutig zu werten. Bemerkenswert ist allerdings auch bei dieser Konstellation, dass sich nach Gabe der Substanz mit dem geringsten Nierenuptake,  $^{111}\text{In}$ -3BP-228, weder bei Berechnung der Gesamtgruppe noch bei Subdifferenzierung nach Zeitpunkten p. i. ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle ergab.

Eine der Erhöhung der Cystatin C-Serumkonzentration entsprechende morphologische Veränderung konnte mithilfe der hier angewendeten histologischen Untersuchungsverfahren nicht nachgewiesen werden. Zur weiteren Evaluation einer möglicherweise korrespondierenden strukturellen Veränderung wären die Elektronenmikroskopie oder immunhistochemische Färbungen mögliche weitere Analyseverfahren.

Die Erhöhung der Serumkonzentration von Cystatin C ist am ehesten als Zeichen einer akuten Belastung zu verstehen, die im experimentellen Setting dieser Arbeit - obschon Hinweise dafür sprechen - nicht eindeutig auf die Substanzapplikation zurückzuführen ist. Auch die medikamentöse Behandlung mit Kortikosteroiden bewirkt dosisabhängig eine Erhöhung von Cystatin C (Risch et al. 2001), sodass auch eine durch endogene Kortikosteroidsekretion im Rahmen der Stresssituation der Tiere durch das experimentelle Procedere eine mögliche Ursache für die Parametererhöhung darstellen kann und durch entsprechende Anpassung der Methode untersucht werden muss.

Nichtsdestotrotz legen die beschriebenen Befunde eine Nierenbeteiligung auf niedrigem Niveau nahe, welche durch geeignete Verfahren auch bei der weiterführenden Evaluation der Verbindungen Berücksichtigung finden sollte.

## 5. Zusammenfassung

Für eine Reihe von z. T. hochmalignen und mit infauster Prognose verbundenen Tumorentitäten konnte eine erhöhte Expression des NTR1 nachgewiesen werden, nicht jedoch in gesundem Gewebe, indem er nicht oder nur in sehr geringer Dichte vorkommt. Diese Eigenschaft lässt den NTR1 als geeignete Zielstruktur für molekulare Bildgebung und Radionuklid-Therapie erscheinen. Ziel der Untersuchungen dieser Arbeit war die *in-vivo*-Evaluation der drei neu entwickelte NTR1-antagonistischen Tracer 3BP-227, 3BP-228 und 3BP-483 (3B Pharmaceuticals, Berlin), welche aufgrund ihrer Konjugation mit DOTA und der damit verbundenen Möglichkeit der Komplexierung verschiedener Radionuklide, gleichermaßen für einen diagnostischen und therapeutischen Einsatz, als sog. Theranostika, konzipiert wurden. Für Biodistributionsstudien sowie die Bildgebung mittels SPECT/CT wurden die Verbindungen mit  $^{111}\text{In}$  markiert. Als Tiermodell dienten weibliche, athymische Nacktmäuse, denen NTR1-positive HT29-Zellen subkutan injiziert wurden. Zur Evaluation der Rezeptorspezifität von  $^{111}\text{In}$ -3BP-227 wurde diese Verbindung zusätzlich in einem NTR1-negativen HEK293-Tumornacktmausmodell untersucht. Für die Biodistributionsstudien wurden den Tieren 0,2 - 18,4 MBq  $^{111}\text{In}$ -3BP-227, -228 oder -483 intravenös injiziert, die Tiere wurden 3, 6, 12 bzw. 24 Stunden p. i. euthanasiert, die Organe entnommen, deren Aktivität gemessen und als prozentualer Anteil der Gewebeaktivität an der Aktivität der injizierten Dosis pro Gewebemasse (%ID/g) berechnet. SPECT/CT-Aufnahmen wurden 3, 6, 12 und 24 Stunden p. i. von 21 - 47 MBq einer der Verbindungen angefertigt. Es wurde ein Screening auf potentielle Nephrotoxizität als Substanznebenwirkung vorgenommen.

Die Biodistribution erbrachte eine hohe und anhaltende Tumoranreicherung mit einem Maximum von  $8,35 \pm 3,12$  %ID/g für  $^{111}\text{In}$ -3BP-227 6 h p. i. und für  $^{111}\text{In}$ -3BP-228  $10,19 \pm 5,28$  %ID/g 3 h p. i. Die Anreicherungen in gesundem Gewebe inklusive kritischen Organen wie Nieren, Leber oder Darm überstiegen die des Tumors zu keinem Zeitpunkt nach Verabreichung dieser beiden Verbindungen. Die Bioverteilung von  $^{111}\text{In}$ -3BP-483 zeigte ein ungünstigeres Muster mit geringeren Anreicherungen im Tumor sowie diese übersteigenden Werten der Nieren. Für  $^{111}\text{In}$ -3BP-227 konnte außerdem eine hohe *in-vivo*-Rezeptorspezifität bei vergleichender Evaluation im NTR1-negativen HEK293-Xenograft-Nacktmausmodell bewiesen werden. Die Ganzkörper-SPECT/CT-Aufnahmen ermöglichten eine deutliche Tumorsvisualisierung mit geringer Hintergrundaktivität. Histologische sowie laborchemische Untersuchungen als Nephrotoxizitätsscreening waren bis auf eine Erhöhung von Cystatin C im Serum unauffällig.

## 6. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1</b>	Strukturformel von 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure DOTA.....	6
<b>Abbildung 2</b>	Der NTR-Antagonist SR142948A.....	13
<b>Abbildung 3</b>	Strukturformeln der DOTA-konjugierten Tracer 3BP-227, 3BP-228 und 3BP-483.....	13
<b>Abbildung 4</b>	Prinzip der Dünnschichtchromatographie eines Markierungsproduktes.....	18
<b>Abbildung 5</b>	Schematischer Versuchsaufbau der Hochleistungsdünnschichtchromatografie inkl. Auswertungshardware.....	19
<b>Abbildung 6</b>	HT29-xenotransplantierte Nacktmaus und entnommener Tumor.....	22
<b>Abbildung 7</b>	NanoSPECT/CT-Scanner.....	25
<b>Abbildung 8</b>	Repräsentatives Radiochromatogramm einer HPLC, hier <sup>111</sup> In-Markierung der Substanz 3BP-227.....	29
<b>Abbildung 9</b>	Repräsentatives Radiochromatogramm einer radio-TLC, hier <sup>111</sup> In-Markierung der Substanz 3BP-227.....	30
<b>Abbildung 10</b>	Uptake von <sup>111</sup> In-3BP-227 in NT1-positiven HT29- und NTR1-negativen HEK293-Tumoren 12 h p. i. ....	31
<b>Abbildung 11</b>	Biodistribution von <sup>111</sup> In-3BP-227, <sup>111</sup> In-3BP-228 bzw. <sup>111</sup> In-3BP-482 anhand ausgewählter Gewebe 3, 6, 12 bzw. 24 h p. i. ....	32
<b>Abbildung 12</b>	Tumor/Niere-Uptake-Ratios 3, 6, 12 bzw. 24 h p. i. von <sup>111</sup> In-3BP-227, <sup>111</sup> In-3BP-228 bzw. <sup>111</sup> In-3BP-482.....	33
<b>Abbildung 13</b>	SPECT/CT-Scans nach Applikation von <sup>111</sup> In-3BP-227, -228, und -483.....	40
<b>Abbildung 14</b>	Konzentrationen von Harnstoff i. S., Kreatinin i. S., NGAL i. S: und NGAL i. U. nach Applikation von <sup>111</sup> In-3BP-227, -228, -483 und Kontrollen.....	42
<b>Abbildung 15</b>	Konzentrationen von Cystatin C i.S: und i. U. nach Applikation von <sup>111</sup> In-3BP-227, -228,-483 und Kontrollen.....	43
<b>Abbildung 16</b>	Serum-Cystatin C-Konzentrationen vor und nach Injektion von <sup>111</sup> In-3BP-228.....	43
<b>Abbildung 17</b>	Konzentrationen von Cystatin C i.S: und i. U. nach Applikation von <sup>111</sup> In-3BP-227, -228 und-483 subgruppiert nach Entnahmezeitpunkten sowie Kontrollen.....	44
<b>Abbildung 18</b>	Nierenschnitte nach Injektion von <sup>111</sup> In-3BP-228.....	45

## 7. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1</b>	Radiochemische Reinheit und spezifische Aktivität der $^{111}\text{In}$ -Markierungen von 3BP-227, 3BP-228 und 3BP-483.....	30
<b>Tabelle 2</b>	Bioverteilung und Uptake-Ratios von $^{111}\text{In}$ -3BP-227 in weiblichen, HT29-xenotransplantierten Nacktmäusen.....	35
<b>Tabelle 3</b>	Bioverteilung und Uptake-Ratios von $^{111}\text{In}$ -3BP-227 in weiblichen, HEK293-xenotransplantierten Nacktmäusen.....	36
<b>Tabelle 4</b>	Bioverteilung und Uptake-Ratios von $^{111}\text{In}$ -3BP-228 in weiblichen, HT29-xenotransplantierten Nacktmäusen.....	37
<b>Tabelle 5</b>	Bioverteilung und Uptake-Ratios von $^{111}\text{In}$ -3BP-483 in weiblichen, HT29-xenotransplantierten Nacktmäusen.....	38
<b>Tabelle 6</b>	Gegenüberstellung der Biodistributionsdaten ausgewählter NTR1-Agonisten und der von $^{111}\text{In}$ -3BP-227, -228 sowie -483.....	50



## 8. Literaturverzeichnis

1. Alexander, Stephen P H; Benson, Helen E.; Faccenda, Elena; Pawson, Adam J.; Sharman, Joanna L.; Spedding, Michael et al. (2013): The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2013/14: G protein-coupled receptors. In: *British journal of pharmacology* 170 (8), S. 1459–1581.
2. Alifano, Marco; Loi, Mauro; Camilleri-Broët, Sophie; Dupouy, Sandra; Régnard, Jean François; Forgez, Patricia (2010a): Neurotensin expression and outcome of malignant pleural mesothelioma. In: *Biochimie* 92 (2), S. 164–170.
3. Alifano, Marco; Souazé, Frédérique; Dupouy, Sandra; Camilleri-Broët, Sophie; Younes, Mohamad; Ahmed-Zaïd, Sadi-Menad et al. (2010b): Neurotensin receptor 1 determines the outcome of non-small cell lung cancer. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 16 (17), S. 4401–4410.
4. Allen, A. E.; Carney, D. N.; Moody, T. W. (1988): Neurotensin binds with high affinity to small cell lung cancer cells. In: *Peptides* 9 Suppl 1, S. 57–61.
5. Alshoukr, Faisal; Prignon, Aurélie; Brans, Luc; Jallane, Abdelhak; Mendes, Sandra; Talbot, Jean-Noël et al. (2011): Novel DOTA-neurotensin analogues for <sup>111</sup>In scintigraphy and <sup>68</sup>Ga PET imaging of neurotensin receptor-positive tumors. In: *Bioconjugate chemistry* 22 (7), S. 1374–1385.
6. Ambrosini, Valentina; Campana, Davide; Nanni, Cristina; Cambioli, Silvia; Tomassetti, Paola; Rubello, Domenico; Fanti, Stefano (2012): Is <sup>68</sup>Ga-DOTA-NOC PET/CT indicated in patients with clinical, biochemical or radiological suspicion of neuroendocrine tumour? In: *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 39 (8), S. 1278–1283.
7. Andersson, S.; Rosell, S.; Hjelmquist, U.; Chang, D.; Folkers, K. (1977): Inhibition of gastric and intestinal motor activity in dogs by (Gln<sup>4</sup>) neurotensin. In: *Acta physiologica Scandinavica* 100 (2), S. 231–235.
8. Baldelli, Roberto; Barnabei, A.; Rizza, L.; Isidori, A. M.; Rota, F.; Di Giacinto, P. et al. (2014): Somatostatin analogs therapy in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors: current aspects and new perspectives. In: *Frontiers in endocrinology* 5, S. 7.
9. Bass, R. T.; Buckwalter, B. L.; Patel, B. P.; Pausch, M. H.; Price, L. A.; Strnad, J.; Hadcock, J. R. (1996): Identification and characterization of novel somatostatin antagonists. In: *Molecular pharmacology* 50 (4), S. 709–715.
10. Bergmann, Ralf; Scheunemann, Matthias; Heichert, Christoph; Mäding, Peter; Wittrisch, Holm; Kretzschmar, Marion et al. (2002): Biodistribution and catabolism of (18)F-labeled neurotensin(8-13) analogs. In: *Nuclear Medicine and Biology* 29 (1), S. 61–72.
11. Betancur, C.; Canton, M.; Burgos, A.; Labeeuw, B.; Gully, D.; Rostène, W.; Pélaprat, D. (1998): Characterization of binding sites of a new neurotensin receptor antagonist, [<sup>3</sup>H]SR 142948A, in the rat brain. In: *European journal of pharmacology* 343 (1), S. 67–77.
12. Bland, J. M.; Altman, D. G. (2003): Applying the right statistics: analyses of measurement studies. In: *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 22 (1), S. 85–93.
13. Bockisch, Andreas (2008): Nuklearmedizin. 143 Tabellen. 4., neu erstellte und erw. Aufl. Hg. v. Torsten Kuwert. Stuttgart, New York, NY: Thieme.
14. Bodei, L.; Mueller-Brand, J.; Baum, R. P.; Pavel, M. E.; Hörsch, D.; O'Dorisio, M. S. et al. (2013): The joint IAEA, EANM, and SNMMI practical guidance on peptide receptor radionuclide therapy (PRRT) in neuroendocrine tumours. In: *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 40 (5), S. 800–816.

15. Bodei, Lisa; Cremonesi, Marta; Grana, Chiara M.; Fazio, Nicola; Iodice, Simona; Baio, Silvia M. et al. (2011): Peptide receptor radionuclide therapy with  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE: the IEO phase I-II study. In: *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 38 (12), S. 2125–2135.
16. Bodei, Lisa; Kidd, Mark; Paganelli, Giovanni; Grana, Chiara M.; Drozdov, Ignat; Cremonesi, Marta et al. (2015): Long-term tolerability of PRRT in 807 patients with neuroendocrine tumours: the value and limitations of clinical factors. In: *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 42 (1), S. 5–19.
17. Botto, J. M.; Chabry, J.; Sarret, P.; Vincent, J. P.; Mazella, J. (1998): Stable expression of the mouse levocabastine-sensitive neurotensin receptor in HEK 293 cell line: binding properties, photoaffinity labeling, and internalization mechanism. In: *Biochemical and biophysical research communications* 243 (2), S. 585–590.
18. Bourdel, E.; Doulut, S.; Jarretou, G.; Labbe-Jullie, C.; Fehrentz, J. A.; Doumbia, O. et al. (1996): New hydroxamate inhibitors of neurotensin-degrading enzymes. Synthesis and enzyme active-site recognition. In: *International journal of peptide and protein research* 48 (2), S. 148–155.
19. Brabander, Tessa; Teunissen, Jaap J M; Van Eijck, Casper H J; Franssen, Gaston J H; Feelders, Richard A.; de Herder, Wouter W; Kwekkeboom, Dik J. (2016): Peptide receptor radionuclide therapy of neuroendocrine tumours. In: *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* 30 (1), S. 103–114.
20. Bruehlmeier, Matthias; Garayoa, Elisa García; Blanc, Alain; Holzer, Barbara; Gergely, Suzanne; Tourwé, Dirk et al. (2002): Stabilization of neurotensin analogues: effect on peptide catabolism, biodistribution and tumor binding. In: *Nuclear Medicine and Biology* 29 (3), S. 321–327.
21. Buchegger, Franz; Bonvin, Florent; Kosinski, Marek; Schaffland, Andreas O.; Prior, John; Reubi, Jean C. et al. (2003): Radiolabeled neurotensin analog,  $^{99\text{mTc}}$ -NT-XI, evaluated in ductal pancreatic adenocarcinoma patients. In: *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 44 (10), S. 1649–1654.
22. Bushnell, David L.; O'Dorisio, Thomas M.; O'Dorisio, M. Sue; Menda, Yusuf; Hicks, Rodney J.; van Cutsem, Eric et al. (2010):  $^{90\text{Y}}$ -edotreotide for metastatic carcinoid refractory to octreotide. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 28 (10), S. 1652–1659.
23. Caplin, Martyn E.; Pavel, Marianne; Ćwikła, Jarosław B.; Phan, Alexandria T.; Raderer, Markus; Sedláčková, Eva et al. (2014): Lanreotide in metastatic enteropancreatic neuroendocrine tumors. In: *The New England journal of medicine* 371 (3), S. 224–233.
24. Carraway, R.; Leeman, S. E. (1973): The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalami. In: *The Journal of biological chemistry* 248 (19), S. 6854–6861.
25. Carraway, R.; Leeman, S. E. (1976): Characterization of radioimmunoassayable neurotensin in the rat. Its differential distribution in the central nervous system, small intestine, and stomach. In: *The Journal of biological chemistry* 251 (22), S. 7045–7052.
26. Cescato, Renzo; Waser, Beatrice; Fani, Melpomeni; Reubi, Jean Claude (2011): Evaluation of  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-sst2 antagonist versus  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-sst2 agonist binding in human cancers in vitro. In: *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 52 (12), S. 1886–1890.
27. Chabry, J.; Labbé-Jullié, C.; Gully, D.; Kitabgi, P.; Vincent, J. P.; Mazella, J. (1994): Stable expression of the cloned rat brain neurotensin receptor into fibroblasts: binding properties, photoaffinity labeling, transduction mechanisms, and internalization. In: *Journal of neurochemistry* 63 (1), S. 19–27.

28. Cwikla, J. B.; Sankowski, A.; Seklecka, N.; Buscombe, J. R.; Nasierowska-Guttmejer, A.; Jeziorski, K. G. et al. (2010): Efficacy of radionuclide treatment DOTATATE Y-90 in patients with progressive metastatic gastroenteropancreatic neuroendocrine carcinomas (GEP-NETs): a phase II study. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 21 (4), S. 787–794.
29. Cybulla, M.; Weiner, S. M.; Otte, A. (2001): End-stage renal disease after treatment with 90Y-DOTATOC. In: *European journal of nuclear medicine* 28 (10), S. 1552–1554.
30. Dash, Ashutosh; Chakraborty, Sudipta; Pillai, Maroor Raghavan Ambikalmajan; Knapp, Furn F Russ (2015): Peptide receptor radionuclide therapy: an overview. In: *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals* 30 (2), S. 47–71.
31. de Herder, W W; Hofland, L. J.; van der Lely, A J; Lamberts, S W J (2003): Somatostatin receptors in gastroentero-pancreatic neuroendocrine tumours. In: *Endocrine-related cancer* 10 (4), S. 451–458.
32. Deng, Huaifu; Wang, Hui; Wang, Mengzhe; Li, Zibo; Wu, Zhanhong (2015): Synthesis and Evaluation of 64Cu-DOTA-NT-Cy5.5 as a Dual-Modality PET/Fluorescence Probe to Image Neurotensin Receptor-Positive Tumor. In: *Molecular pharmaceuticals* 12 (8), S. 3054–3061.
33. Deutscher Apotheker Verlag (Hg.) (2014): Europäisches Arzneibuch 8.0 (Grundwerk 2014).
34. Draviam, E. J.; Greeley, G. H.; Lluís, F.; Uchida, T.; Trowbridge, J.; Thompson, J. C. (1987): Characterization of fat-induced neurotensin-like immunoreactivity in plasma using column liquid chromatography and radioimmunoassay. In: *Journal of chromatography* 414 (1), S. 180–186.
35. Dupouy, Sandra; Viardot-Foucault, Véronique; Alifano, Marco; Souazé, Frédérique; Plu-Bureau, Geneviève; Chaouat, Marc et al. (2009): The neurotensin receptor-1 pathway contributes to human ductal breast cancer progression. In: *PloS one* 4 (1), S. e4223.
36. Erfani, Mostafa; Zarrabi Ahrabi, Nakisa; Shafiei, Mohammad; Shirmardi, Seyed Pezhman (2014): A (99m) Tc-tricine-HYNIC-labeled peptide targeting the neurotensin receptor for single-photon imaging in malignant tumors. In: *Journal of labelled compounds & radiopharmaceuticals* 57 (3), S. 125–131.
37. Evers, B. M.; Bold, R. J.; Ehrenfried, J. A.; Li, J.; Townsend, C. M.; Klimpel, G. R. (1994): Characterization of functional neurotensin receptors on human lymphocytes. In: *Surgery* 116 (2), S. 134-9; discussion 139-40.
38. Evers, B. M.; Izukura, M.; Chung, D. H.; Parekh, D.; Yoshinaga, K.; Greeley, G. H. et al. (1992a): Neurotensin stimulates growth of colonic mucosa in young and aged rats. In: *Gastroenterology* 103 (1), S. 86–91.
39. Evers, B. M.; Izukura, M.; Townsend, C. M.; Uchida, T.; Thompson, J. C. (1992b): Neurotensin prevents intestinal mucosal hypoplasia in rats fed an elemental diet. In: *Digestive diseases and sciences* 37 (3), S. 426–431.
40. Evers, B. Mark (2006): Neurotensin and growth of normal and neoplastic tissues. In: *Peptides* 27 (10), S. 2424–2433.
41. Ezziddin, Samer; Khalaf, Feras; Vanezi, Maria; Haslerud, Torjan; Mayer, Karin; Al Zreiqat, Abdullah et al. (2014): Outcome of peptide receptor radionuclide therapy with 177Lu-octreotate in advanced grade 1/2 pancreatic neuroendocrine tumours. In: *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 41 (5), S. 925–933.
42. Feurle, G. E.; Müller, B.; Rix, E. (1987): Neurotensin induces hyperplasia of the pancreas and growth of the gastric antrum in rats. In: *Gut* 28 Suppl, S. 19–23.

43. Fogh, J.; Fogh, J. M.; Orfeo, T. (1977): One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. In: *Journal of the National Cancer Institute* 59 (1), S. 221–226.
44. Forrer, Flavio; Valkema, Roelf; Kwekkeboom, Dik J.; Jong, Marion de; Krenning, Eric P. (2007): Neuroendocrine tumors. Peptide receptor radionuclide therapy. In: *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* 21 (1), S. 111–129.
45. Forrer, Flavio; Waldherr, Christian; Maecke, Helmut R.; Mueller-Brand, Jan (2006): Targeted radionuclide therapy with <sup>90</sup>Y-DOTATOC in patients with neuroendocrine tumors. In: *Anticancer research* 26 (1B), S. 703–707.
46. García-Garayoa, Elisa; Bläuenstein, Peter; Blanc, Alain; Maes, Veronique; Tourwé, Dirk; Schubiger, P. August (2009): A stable neurotensin-based radiopharmaceutical for targeted imaging and therapy of neurotensin receptor-positive tumours. In: *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 36 (1), S. 37–47.
47. Graham, F. L.; Smiley, J.; Russell, W. C.; Nairn, R. (1977): Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. In: *The Journal of general virology* 36 (1), S. 59–74.
48. Guha, Sushovan; Lunn, J. Adrian; Santiskulvong, Chintda; Rozengurt, Enrique (2003): Neurotensin stimulates protein kinase C-dependent mitogenic signaling in human pancreatic carcinoma cell line PANC-1. In: *Cancer research* 63 (10), S. 2379–2387.
49. Gui, Xianyong; Guzman, Grace; Dobner, Paul R.; Kadkol, ShriHari S. (2008): Increased neurotensin receptor-1 expression during progression of colonic adenocarcinoma. In: *Peptides* 29 (9), S. 1609–1615.
50. Gully, D.; Canton, M.; Boigegrain, R.; Jeanjean, F.; Molimard, J. C.; Poncelet, M. et al. (1993): Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective nonpeptide antagonist of the neurotensin receptor. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (1), S. 65–69.
51. Gully, D.; Labeeuw, B.; Boigegrain, R.; Oury-Donat, F.; Bachy, A.; Poncelet, M. et al. (1997): Biochemical and pharmacological activities of SR 142948A, a new potent neurotensin receptor antagonist. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 280 (2), S. 802–812.
52. Haase, C.; Bergmann, R.; Oswald, J.; Zips, D.; Pietzsch, J. (2006): Neurotensin receptors in adeno- and squamous cell carcinoma. In: *Anticancer research* 26 (5A), S. 3527–3533.
53. Harikumar, Kuzhuvilil B.; Kunnumakkara, Ajaikumar B.; Ochi, Nobuo; Tong, Zhimin; Deorukhkar, Amit; Sung, Bokyung et al. (2010): A novel small-molecule inhibitor of protein kinase D blocks pancreatic cancer growth in vitro and in vivo. In: *Molecular cancer therapeutics* 9 (5), S. 1136–1146.
54. Hassan, Sazzad; Dobner, Paul R.; Carraway, Robert E. (2004): Involvement of MAP-kinase, PI3-kinase and EGF-receptor in the stimulatory effect of Neurotensin on DNA synthesis in PC3 cells. In: *Regulatory peptides* 120 (1-3), S. 155–166.
55. Haug, Alexander R.; Cindea-Drimus, Ramona; Auernhammer, Christoph J.; Reincke, Martin; Wängler, Björn; Uebleis, Christopher et al. (2012): The role of <sup>68</sup>Ga-DOTATATE PET/CT in suspected neuroendocrine tumors. In: *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 53 (11), S. 1686–1692.
56. Hillairet De Boisferon, Marc; Raguin, Olivier; Thiercelin, Cynthia; Dussailant, Monique; Rostène, William; Barbet, Jacques et al. (2002): Improved tumor selectivity of radio-labeled peptides by receptor and antigen dual targeting in the neurotensin receptor model. In: *Bioconjugate chemistry* 13 (3), S. 654–662.

57. Imhof, Anna; Brunner, Philippe; Marincek, Nicolas; Briel, Matthias; Schindler, Christian; Rasch, Helmut et al. (2011): Response, survival, and long-term toxicity after therapy with the radiolabeled somatostatin analogue [90Y-DOTA]-TOC in metastasized neuroendocrine cancers. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29 (17), S. 2416–2423.
58. Iwase, K.; Evers, B. M.; Hellmich, M. R.; Kim, H. J.; Higashide, S.; Gully, D. et al. (1997): Inhibition of neurotensin-induced pancreatic carcinoma growth by a nonpeptide neurotensin receptor antagonist, SR48692. In: *Cancer* 79 (9), S. 1787–1793.
59. Jensen, R.; Moody, T. (2006): Bombesin-Related Peptides and Neurotensin Effects on Cancer Growth/Proliferation and Cellular Signaling in Cancer. In: *Handbook of Biologically Active Peptides*: Elsevier, S. 429–434.
60. Jia, Yinnong; Shi, Wen; Zhou, Zhengyuan; Wagh, Nilesh K.; Fan, Wei; Brusnahan, Susan K.; Garrison, Jered C. (2015): Evaluation of DOTA-chelated neurotensin analogs with spacer-enhanced biological performance for neurotensin-receptor-1-positive tumor targeting. In: *Nuclear Medicine and Biology* 42 (11), S. 816–823.
61. Johnson, Leonard R. (2012): *Physiology of the Gastrointestinal Tract, Two Volume Set*. Unter Mitarbeit von Fayez K. Ghishan, Jonathan D. Kaunitz, Juanita L. Merchant, Hamid M. Said und Jackie D. Wood. 2 Bände. Burlington: Elsevier Science.
62. Jong, M. de; Bernard, B. F.; Bruin, E. de; van Gameren, A.; Bakker, W. H.; Visser, T. J. et al. (1998): Internalization of radiolabelled [DTPA0]octreotide and [DOTA0,Tyr3]octreotide: peptides for somatostatin receptor-targeted scintigraphy and radionuclide therapy. In: *Nuclear medicine communications* 19 (3), S. 283–288.
63. Keevil, B. G.; Kilpatrick, E. S.; Nichols, S. P.; Maylor, P. W. (1998): Biological variation of cystatin C: implications for the assessment of glomerular filtration rate. In: *Clinical chemistry* 44 (7), S. 1535–1539.
64. Kisfalvi, Krisztina; Hurd, Cliff; Guha, Sushovan; Rozengurt, Enrique (2010): Induced overexpression of protein kinase D1 stimulates mitogenic signaling in human pancreatic carcinoma PANC-1 cells. In: *Journal of cellular physiology* 223 (2), S. 309–316.
65. Kitabgi, Patrick (2002): Targeting neurotensin receptors with agonists and antagonists for therapeutic purposes. In: *Current opinion in drug discovery & development* 5 (5), S. 764–776.
66. Kolb, Hartmuth C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. Barry (2001): Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 40 (11), S. 2004–2021.
67. Konijnenberg, Mark W.; Bijster, Magda; Krenning, Eric P.; Jong, Marion de (2004): A stylized computational model of the rat for organ dosimetry in support of preclinical evaluations of peptide receptor radionuclide therapy with (90)Y, (111)In, or (177)Lu. In: *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 45 (7), S. 1260–1269.
68. Körner, Meike; Waser, Beatrice; Strobel, Oliver; Büchler, Markus; Reubi, Jean Claude (2015): Neurotensin receptors in pancreatic ductal carcinomas. In: *EJNMMI research* 5, S. 17.
69. Kunikowska, Jolanta; Królicki, Leszek; Hubalewska-Dydejczyk, Alicja; Mikołajczak, Renata; Sowa-Staszczak, Anna; Pawlak, Dariusz (2011): Clinical results of radionuclide therapy of neuroendocrine tumours with 90Y-DOTATATE and tandem 90Y/177Lu-DOTATATE: which is a better therapy option? In: *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 38 (10), S. 1788–1797.

70. Kwekkeboom, D.; Krenning, E. P.; Jong, M. de (2000): Peptide receptor imaging and therapy. In: *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 41 (10), S. 1704–1713.
71. Kwekkeboom, Dik J.; de Herder, Wouter W.; Kam, Boen L.; van Eijck, Casper H.; van Essen, Martijn; Kooij, Peter P. et al. (2008): Treatment with the radiolabeled somatostatin analog [177 Lu-DOTA 0,Tyr3]octreotate: toxicity, efficacy, and survival. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 26 (13), S. 2124–2130.
72. Lang, Christopher; Maschauer, Simone; Hübner, Harald; Gmeiner, Peter; Prante, Olaf (2013): Synthesis and evaluation of a (18)F-labeled diarylpyrazole glycoconjugate for the imaging of NTS1-positive tumors. In: *Journal of medicinal chemistry* 56 (22), S. 9361–9365.
73. Laterza, Omar F.; Price, Christopher P.; Scott, Mitchell G. (2002): Cystatin C: an improved estimator of glomerular filtration rate? In: *Clinical chemistry* 48 (5), S. 699–707.
74. Lemaire, I. (1988): Neurotensin enhances IL-1 production by activated alveolar macrophages. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 140 (9), S. 2983–2988.
75. Liu, Shuang (2008): Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides. In: *Advanced drug delivery reviews* 60 (12), S. 1347–1370.
76. Lynch, Thomas J.; Bell, Daphne W.; Sordella, Raffaella; Gurubhagavatula, Sarada; Okimoto, Ross A.; Brannigan, Brian W. et al. (2004): Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. In: *The New England journal of medicine* 350 (21), S. 2129–2139.
77. Mascarin, Alba; Valverde, Ibai E.; Vomstein, Sandra; Mindt, Thomas L. (2015): 1,2,3-Triazole Stabilized Neurotensin-Based Radiopeptidomimetics for Improved Tumor Targeting. In: *Bioconjugate chemistry* 26 (10), S. 2143–2152.
78. Maschauer, Simone; Greff, Cornelia; Einsiedel, Jürgen; Ott, Julian; Tripal, Philipp; Hübner, Harald et al. (2015): Improved radiosynthesis and preliminary in vivo evaluation of a (18)F-labeled glycopeptide-peptoid hybrid for PET imaging of neurotensin receptor 2. In: *Bioorganic & medicinal chemistry* 23 (14), S. 4026–4033.
79. Maschauer, Simone; Ruckdeschel, Tina; Tripal, Philipp; Haubner, Roland; Einsiedel, Jürgen; Hübner, Harald et al. (2014): In vivo monitoring of the antiangiogenic effect of neurotensin receptor-mediated radiotherapy by small-animal positron emission tomography: a pilot study. In: *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)* 7 (4), S. 464–481.
80. Mazella, Jean; Vincent, Jean-Pierre (2006): Functional roles of the NTS2 and NTS3 receptors. In: *Peptides* 27 (10), S. 2469–2475. DOI: 10.1016/j.peptides.2006.04.026.
81. Moll, S.; Nিকেleit, V.; Mueller-Brand, J.; Brunner, F. P.; Maecke, H. R.; Mihatsch, M. J. (2001): A new cause of renal thrombotic microangiopathy: yttrium 90-DOTATOC internal radiotherapy. In: *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 37 (4), S. 847–851.
82. Moody, T. W.; Carney, D. N.; Korman, L. Y.; Gazdar, A. F.; Minna, J. D. (1985): Neurotensin is produced by and secreted from classic small cell lung cancer cells. In: *Life sciences* 36 (18), S. 1727–1732.
83. Moody, T. W.; Chiles, J.; Casibang, M.; Moody, E.; Chan, D.; Davis, T. P. (2001): SR48692 is a neurotensin receptor antagonist which inhibits the growth of small cell lung cancer cells. In: *Peptides* 22 (1), S. 109–115.
84. Moody, Terry W.; Chan, Daniel C.; Mantey, Samuel A.; Moreno, Paola; Jensen, Robert T. (2014): SR48692 inhibits non-small cell lung cancer proliferation in an EGF receptor-dependent manner. In: *Life sciences* 100 (1), S. 25–34.

85. Moody, Terry W.; Moreno, Paola; Jensen, Robert T. (2015): Neuropeptides as lung cancer growth factors. In: *Peptides*.
86. Müller, Kristin M.; Tveteraas, Ingun H.; Aasrum, Monica; Ødegård, John; Dawood, Mona; Dajani, Olav et al. (2011): Role of protein kinase C and epidermal growth factor receptor signalling in growth stimulation by neurotensin in colon carcinoma cells. In: *BMC cancer* 11, S. 421.
87. Najimi, Mustapha; Maloteaux, Jean Marie; Hermans, Emmanuel (2002): Cytoskeleton-related trafficking of the EAAC1 glutamate transporter after activation of the G(q/11)-coupled neurotensin receptor NTS1. In: *FEBS letters* 523 (1-3), S. 224–228.
88. Nock, Berthold A.; Nikolopoulou, Anastasia; Reubi, Jean-Claude; Maes, Veronique; Conrath, Peter; Tourwé, Dirk; Maina, Theodosia (2006): Toward stable N4-modified neurotensins for NTS1-receptor-targeted tumor imaging with 99mTc. In: *Journal of medicinal chemistry* 49 (15), S. 4767–4776.
89. Oberg, K.; Kvols, L.; Caplin, M.; Delle Fave, G.; Herder, W. de; Rindi, G. et al. (2004): Consensus report on the use of somatostatin analogs for the management of neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 15 (6), S. 966–973.
90. Osterkamp F, Smerling C, Reineke U, Haase C, Ungewiss J, inventors; 3BP Pharmaceuticals GmbH, assignee. Neurotensin receptor ligands. European patent application EP20120008208. December 7, 2012.
91. Paez, J. Guillermo; Jänne, Pasi A.; Lee, Jeffrey C.; Tracy, Sean; Greulich, Heidi; Gabriel, Stacey et al. (2004): EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. In: *Science (New York, N.Y.)* 304 (5676), S. 1497–1500.
92. Petersen, C. M.; Nielsen, M. S.; Nykjaer, A.; Jacobsen, L.; Tommerup, N.; Rasmussen, H. H. et al. (1997): Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity chromatography. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (6), S. 3599–3605.
93. Polak, J. M.; Sullivan, S. N.; Bloom, S. R.; Buchan, A. M.; Facer, P.; Brown, M. R.; Pearse, A. G. (1977): Specific localisation of neurotensin to the N cell in human intestine by radioimmunoassay and immunocytochemistry. In: *Nature* 270 (5633), S. 183–184.
94. Przedborski, S.; Levivier, M.; Cadet, J. L. (1991): Neurotensin receptors in human meningiomas. In: *Annals of neurology* 30 (5), S. 650–654.
95. Reubi, J. C.; Kappeler, A.; Waser, B.; Laissue, J.; Hipkin, R. W.; Schonbrunn, A. (1998a): Immunohistochemical localization of somatostatin receptors sst2A in human tumors. In: *The American journal of pathology* 153 (1), S. 233–245.
96. Reubi, J. C.; Waser, B.; Friess, H.; Büchler, M.; Laissue, J. (1998b): Neurotensin receptors: a new marker for human ductal pancreatic adenocarcinoma. In: *Gut* 42 (4), S. 546–550.
97. Reubi, J. C.; Waser, B.; Schaer, J. C.; Laissue, J. A. (1999): Neurotensin receptors in human neoplasms: high incidence in Ewing's sarcomas. In: *International journal of cancer. Journal international du cancer* 82 (2), S. 213–218.
98. Reubi, J. C.; Waser, B.; Schaer, J. C.; Laissue, J. A. (2001): Somatostatin receptor sst1-sst5 expression in normal and neoplastic human tissues using receptor autoradiography with subtype-selective ligands. In: *European journal of nuclear medicine* 28 (7), S. 836–846.
99. Reubi, Jean Claude (2003): Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. In: *Endocrine reviews* 24 (4), S. 389–427.
100. Rinke, Anja; Müller, Hans-Helge; Schade-Brittinger, Carmen; Klose, Klaus-Jochen; Barth, Peter; Wied, Matthias et al. (2009): Placebo-controlled, double-blind, prospective,

- randomized study on the effect of octreotide LAR in the control of tumor growth in patients with metastatic neuroendocrine midgut tumors: a report from the PROMID Study Group. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (28), S. 4656–4663.
101. Risch, L.; Herklotz, R.; Blumberg, A.; Huber, A. R. (2001): Effects of glucocorticoid immunosuppression on serum cystatin C concentrations in renal transplant patients. In: *Clinical chemistry* 47 (11), S. 2055–2059.
102. Röhrich, Anika; Bergmann, Ralf; Kretzschmann, Anne; Noll, Steffi; Steinbach, Jörg; Pietzsch, Jens; Stephan, Holger (2011): A novel tetrabranched neurotensin(8-13) cyclam derivative: synthesis, <sup>64</sup>Cu-labeling and biological evaluation. In: *Journal of inorganic biochemistry* 105 (6), S. 821–832.
103. Rolleman, Edgar J.; Valkema, Roelf; Jong, Marion de; Kooij, Peter P M; Krenning, Eric P. (2003): Safe and effective inhibition of renal uptake of radiolabelled octreotide by a combination of lysine and arginine. In: *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 30 (1), S. 9–15.
104. Rosell, S.; Rökæus, A. (1979): The effect of ingestion of amino acids, glucose and fat on circulating neurotensin-like immunoreactivity (NTLI) in man. In: *Acta physiologica Scandinavica* 107 (3), S. 263–267.
105. Sabet, Amir; Dautzenberg, Kristina; Haslerud, Torjan; Aouf, Anas; Sabet, Amin; Simon, Birgit et al. (2015): Specific efficacy of peptide receptor radionuclide therapy with (<sup>177</sup>Lu)-octreotate in advanced neuroendocrine tumours of the small intestine. In: *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 42 (8), S. 1238–1246.
106. Sabet, Amir; Ezziddin, Khaled; Pape, Ulrich-Frank; Ahmadzadehfar, Hojjat; Mayer, Karin; Pöppel, Thorsten et al. (2013): Long-term hematotoxicity after peptide receptor radionuclide therapy with <sup>177</sup>Lu-octreotate. In: *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 54 (11), S. 1857–1861.
107. Saha, Gopal B. (2010): Fundamentals of nuclear pharmacy. 6th ed. New York, London: Springer.
108. Sakamoto, T.; Newman, J.; Fujimura, M.; Greeley, G. H.; Townsend, C. M.; Thompson, J. C. (1984): Role of neurotensin in pancreatic secretion. In: *Surgery* 96 (2), S. 146–153.
109. Schaeffer, P.; Laplace, M. C.; Bernat, A.; Prabonnaud, V.; Gully, D.; Lespy, L.; Herbert, J. M. (1998): SR142948A is a potent antagonist of the cardiovascular effects of neurotensin. In: *Journal of cardiovascular pharmacology* 31 (4), S. 545–550.
110. Schraml, C.; Schwenzer, N. F.; Sperling, O.; Aschoff, P.; Lichy, M. P.; Müller, M. et al. (2013): Staging of neuroendocrine tumours: comparison of [<sup>68</sup>Ga]DOTATOC multiphase PET/CT and whole-body MRI. In: *Cancer imaging : the official publication of the International Cancer Imaging Society* 13, S. 63–72.
111. Sehgal, I.; Powers, S.; Huntley, B.; Powis, G.; Pittelkow, M.; Maihle, N. J. (1994): Neurotensin is an autocrine trophic factor stimulated by androgen withdrawal in human prostate cancer. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (11), S. 4673–4677.
112. Servotte, S.; Camby, I.; Debeir, O.; Deroanne, C.; Lambert, C. A.; Lapière, C. M. et al. (2006): The in vitro influences of neurotensin on the motility characteristics of human U373 glioblastoma cells. In: *Neuropathology and applied neurobiology* 32 (6), S. 575–584.
113. Shimizu, Satoya; Tsukada, Jun; Sugimoto, Takashi; Kikkawa, Naoko; Sasaki, Keita; Chazono, Hideaki et al. (2008): Identification of a novel therapeutic target for head and neck squamous cell carcinomas: a role for the neurotensin-neurotensin receptor 1 onco-



- genic signaling pathway. In: *International journal of cancer. Journal international du cancer* 123 (8), S. 1816–1823.
114. Siegel, Rebecca; Naishadham, Deepa; Jemal, Ahmedin (2013): Cancer statistics, 2013. In: *CA: a cancer journal for clinicians* 63 (1), S. 11–30.
115. Snider, R. M.; Forray, C.; Pfenning, M.; Richelson, E. (1986): Neurotensin stimulates inositol phospholipid metabolism and calcium mobilization in murine neuroblastoma clone N1E-115. In: *Journal of neurochemistry* 47 (4), S. 1214–1218.
116. Somaï, Sonia; Gompel, Anne; Rostène, William; Forgez, Patricia (2002): Neurotensin counteracts apoptosis in breast cancer cells. In: *Biochemical and biophysical research communications* 295 (2), S. 482–488.
117. Souazé, Frédérique; Dupouy, Sandra; Viardot-Foucault, Véronique; Bruyneel, Erik; Attoub, Samir; Gespach, Christian et al. (2006): Expression of neurotensin and NT1 receptor in human breast cancer: a potential role in tumor progression. In: *Cancer research* 66 (12), S. 6243–6249.
118. Statistisches Bundesamt (02.02.2015): Krebs war 2013 die zweithäufigste Todesursache. Wiesbaden. Thomas Graf.
119. Sundin, Anders (2012): Radiological and nuclear medicine imaging of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. In: *Best practice & research. Clinical gastroenterology* 26 (6), S. 803–818.
- 120 Swift, Stephanie L.; Burns, Julie E.; Maitland, Norman J. (2010): Altered expression of neurotensin receptors is associated with the differentiation state of prostate cancer. In: *Cancer research* 70 (1), S. 347–356.
121. Tanaka, K.; Masu, M.; Nakanishi, S. (1990): Structure and functional expression of the cloned rat neurotensin receptor. In: *Neuron* 4 (6), S. 847–854.
122. Taylor, Robert M.; Severns, Virginia; Brown, David C.; Bisoffi, Marco; Sillerud, Laurel O. (2012): Prostate cancer targeting motifs: expression of  $\alpha\beta_3$ , neurotensin receptor 1, prostate specific membrane antigen, and prostate stem cell antigen in human prostate cancer cell lines and xenografts. In: *The Prostate* 72 (5), S. 523–532.
123. Teodoro, Rodrigo; Faintuch, Bluma Linkowski; Núñez, Eutimio Gustavo Fernández; Queiróz, Rodrigo Guimarães (2011): Neurotensin(8-13) analogue: radiolabeling and biological evaluation using different chelators. In: *Nuclear Medicine and Biology* 38 (1), S. 113–120.
124. Thomas, Lothar (2012): Labor und Diagnose. Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik. 8., Aufl. Frankfurt am Main: TH-Books Verlagsgesellschaft.
125. Thomsen, William; Frazer, John; Unett, David (2005): Functional assays for screening GPCR targets. In: *Current opinion in biotechnology* 16 (6), S. 655–665.
126. Thor, K.; Rosell, S. (1986): Neurotensin increases colonic motility. In: *Gastroenterology* 90 (1), S. 27–31.
127. Turner, J. T.; James-Kracke, M. R.; Camden, J. M. (1990): Regulation of the neurotensin receptor and intracellular calcium mobilization in HT29 cells. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 253 (3), S. 1049–1056.
128. Ushiro, S.; Mizoguchi, K.; Yoshida, S.; Jimi, S.; Fujiwara, T.; Yoshida, M. et al. (1997): Stimulation of cell-surface urokinase-type plasminogen activator activity and cell migration in vascular endothelial cells by a novel hexapeptide analogue of neurotensin. In: *FEBS letters* 418 (3), S. 341–345.
129. Valerie, Nicholas C K; Casarez, Eli V.; Dasilva, John O.; Dunlap-Brown, Marya E.; Parsons, Sarah J.; Amorino, George P.; Dziegielewska, Jaroslaw (2011): Inhibition of

- neurotensin receptor 1 selectively sensitizes prostate cancer to ionizing radiation. In: *Cancer research* 71 (21), S. 6817–6826.
130. Valkema, Roelf; Jong, Marion de; Bakker, Willem H.; Breeman, Wout A P; Kooij, Peter P M; Lugtenburg, Pieternella J. et al. (2002): Phase I study of peptide receptor radionuclide therapy with [In-DTPA]octreotide: the Rotterdam experience. In: *Seminars in nuclear medicine* 32 (2), S. 110–122.
131. Valkema, Roelf; Pauwels, Stanislas; Kvols, Larry K.; Barone, Raffaella; Jamar, Francois; Bakker, Willem H. et al. (2006): Survival and response after peptide receptor radionuclide therapy with [90Y-DOTA0,Tyr3]octreotide in patients with advanced gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. In: *Seminars in nuclear medicine* 36 (2), S. 147–156.
132. Vincent, J. P.; Mazella, J.; Kitabgi, P. (1999): Neurotensin and neurotensin receptors. In: *Trends in pharmacological sciences* 20 (7), S. 302–309.
133. Visser, M. de; Janssen, P J J M; Srinivasan, A.; Reubi, J. C.; Waser, B.; Erion, J. L. et al. (2003): Stabilised 111In-labelled DTPA- and DOTA-conjugated neurotensin analogues for imaging and therapy of exocrine pancreatic cancer. In: *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 30 (8), S. 1134–1139.
134. Vita, N.; Laurent, P.; Lefort, S.; Chalon, P.; Dumont, X.; Kaghad, M. et al. (1993): Cloning and expression of a complementary DNA encoding a high affinity human neurotensin receptor. In: *FEBS letters* 317 (1-2), S. 139–142.
135. Waldherr, Christian; Pless, Miklos; Maecke, Helmut R.; Schumacher, Tilmann; Crazzolara, Armin; Nitzsche, Egbert U. et al. (2002): Tumor response and clinical benefit in neuroendocrine tumors after 7.4 GBq (90)Y-DOTATOC. In: *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 43 (5), S. 610–616.
136. Wang, H. L.; Wu, T. (1996): G alpha q/11 mediates neurotensin excitation of substantia nigra dopaminergic neurons. In: *Brain research. Molecular brain research* 36 (1), S. 29–36.
137. White, Jim F.; Noinaj, Nicholas; Shibata, Yoko; Love, James; Kloss, Brian; Xu, Feng et al. (2012): Structure of the agonist-bound neurotensin receptor. In: *Nature* 490 (7421), S. 508–513.
138. Wild, Damian; Bomanji, Jamshed B.; Benkert, Pascal; Maecke, Helmut; Eil, Peter J.; Reubi, Jean Claude; Caplin, Martyn E. (2013): Comparison of 68Ga-DOTANOC and 68Ga-DOTATATE PET/CT within patients with gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. In: *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 54 (3), S. 364–372.
139. Wild, Damian; Fani, Melpomeni; Behe, Martin; Brink, Ingo; Rivier, Jean E F; Reubi, Jean Claude et al. (2011): First clinical evidence that imaging with somatostatin receptor antagonists is feasible. In: *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 52 (9), S. 1412–1417.
140. Wood, J. G.; Hoang, H. D.; Bussjaeger, L. J.; Solomon, T. E. (1988a): Effect of neurotensin on pancreatic and gastric secretion and growth in rats. In: *Pancreas* 3 (3), S. 332–339.
141. Wood, J. G.; Hoang, H. D.; Bussjaeger, L. J.; Solomon, T. E. (1988b): Neurotensin stimulates growth of small intestine in rats. In: *The American journal of physiology* 255 (6 Pt 1), S. G813-7.
142. Wood, S. M.; Wood, J. R.; Ghatei, M. A.; Lee, Y. C.; O'Shaughnessy, D.; Bloom, S. R. (1981): Bombesin, somatostatin and neurotensin-like immunoreactivity in bronchial carcinoma. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 53 (6), S. 1310–1312.

143. Wu, Zhanhong; Li, Lin; Liu, Shuanglong; Yakushijin, Fumiko; Yakushijin, Kenichi; Horne, David et al. (2014): Facile Preparation of a Thiol-Reactive  $^{18}\text{F}$ -Labeling Agent and Synthesis of  $^{18}\text{F}$ -DEG-VS-NT for PET Imaging of a Neurotensin Receptor-Positive Tumor. In: *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 55 (7), S. 1178–1184.
144. Wu, Zherui; Martinez-Fong, Daniel; Trédaniel, Jean; Forgez, Patricia (2012): Neurotensin and its high affinity receptor 1 as a potential pharmacological target in cancer therapy. In: *Frontiers in endocrinology* 3, S. 184.
145. Zhang, Kaijun; An, Rui; Gao, Zairong; Zhang, Yongxue; Aruva, Mohan R. (2006): Radionuclide imaging of small-cell lung cancer (SCLC) using  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled neurotensin peptide 8-13. In: *Nuclear Medicine and Biology* 33 (4), S. 505–512.
146. Zhao, Dezheng; Kuhnt-Moore, Sabina; Zeng, Huiyan; Wu, Jack S.; Moyer, Mary P.; Pothoulakis, Charalabos (2003): Neurotensin stimulates IL-8 expression in human colonic epithelial cells through Rho GTPase-mediated NF-kappa B pathways. In: *American journal of physiology. Cell physiology* 284 (6), S. C1397-404.

## 9. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. Dr. med. Holger Amthauer, für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit zur Promotion. Ohne seinen Einsatz, die keinesfalls selbstverständliche stetige Erreichbarkeit, seine großartige Geduld, seine freundliche Offenheit und allem voran seine Expertise wäre dieses Arbeit nicht umzusetzen gewesen.

Ich danke der Stiftung der Deutschen Wirtschaft (sdw) gGmbH und dem Studienförderwerk Klaus Murmann für die ideelle und finanzielle Unterstützung meines Promotionsvorhabens.

Ebenso möchte ich mich bei Dr. med. Jürgen Goldschmidt, Franziska Stöber, M.Sc., und Ines Heinemann aus dem Leibniz-Institut für Neurobiologie Magdeburg für ihre unkomplizierte und professionelle Unterstützung, wie auch bei Marvin Stiebler, M.Sc., Martin Rohracker, Dr. rer. biol. hum. Annette Pethe, Beate Schulz, Dr. med. Ivayla Apostolova und Dr. rer. nat. Oliver Großer aus der Abteilung für Nuklearmedizin der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg für ihren freundlichen Beitrag zu dieser Arbeit bedanken.

Mein besondere Dank gilt dem Unternehmen 3B-Pharmaceuticals, Berlin, welches die untersuchten Verbindungen entwickelt hat, allen voran Frau Dr. Sci. Christiane Smerling und Frau Dr. Sci. Aileen Höhne für ihre konstruktive Kritik.

Für ihre unumständliche und freundliche Unterstützung unseres Projekts möchte ich außerdem dem Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie danken, insbesondere Frau Rumiya Makarova, Frau Dr. rer. nat. Juliane Hoffmann und Frau Dr. rer. nat. Ilona Päge.

Der nephrohistologische Teil dieser Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne die kompetente theoretische und praktische Unterstützung durch Oberärztin Maria des las Mercedes Noriega und Prof. Dr. med. Thorsten Wiech der Sektion Nephropathologie des Instituts für Pathologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.

Nicht zuletzt gilt meiner kleinen Familie – meiner Partnerin, Dr. med. Mirjam Ziemer und unserem kleinen Sohn Franz – meinen Eltern und Schwiegereltern, meiner Schwester und meinen Freunden, Franz Pätzold, Tina Männchen, Bernhard Uhlig, Lisa Karge, Svenja Heinemann, Julian Steinke, Sabine Sämisch und vielen weiteren großer Dank für ihre motivierenden, hilfreichen, wie entlastenden Worte und Taten.

## 10. Erklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Vergleichende Evaluation neuartiger Neurotensinrezeptor-1-Antagonisten im Nacktmausmodell“

in der Klinik für Radiologie und Nuklearmedizin der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg mit Unterstützung durch

Herrn Prof. Dr. med. Holger Amthauer, Herrn Dr. med. Jürgen Goldschmidt und Herrn Dr. rer. nat. Oliver Großer

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, 18.04.2016

## 11. Bildungsweg

- Seit 09/2015 Tätigkeit als Arzt in Weiterbildung in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der HELIOS Klinik Leisnig
- 06/2015 - 09/2015 Anstellung als wissenschaftliche Hilfskraft im Bereich Nuklearmedizin, Klinik für Radiologie und Nuklearmedizin, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
- 11/2014 - 05/2015 Promotionsstudium an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg mit Förderung durch die Stiftung der Deutschen Wirtschaft gGmbH aus Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung
- 11/2014 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Approbation als Arzt
- 10/2007 - 11/2014 Studium der Humanmedizin an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
- 09/2006 - 05/2007 Zivildienst auf der Neurologischen Intensivtherapiestation am Universitätsklinikum Dresden
- 1998 - 2006 Abitur am und Besuch des Gymnasium Dreikönigschule Dresden
- 1994 - 1998 Besuch der 50. Grundschule Dresden
- Geboren am 06.11.1987 in Dresden

## Publikation

- Schulz J., Rohracker M., Stiebler M., Goldschmidt J., Grosser O.S., Osterkamp F., Pethe A., Reineke U., Smerling C., Amthauer H. Comparative Evaluation of the Biodistribution Profiles of a Series of Nonpeptidic Neurotensin Receptor-1 Antagonists Reveals a Promising Candidate for Theranostic Applications. J Nucl Med jnumed.115.170530. published ahead of print March 3, 2016