



Demetrios Preis 2018: "Comparison of preclinical characterization methods of a radioactive pharmaceutical agent"

Authors: Simon Osterkamp
Submitted: 24. September 2018
Published: 26. September 2018
Volume: 5
Issue: 7
Affiliation: Universitätsklinikum Freiburg, Hochschule Furtwangen University
Languages: German
Keywords: Demetrios Preis 2018, Bachelor of Science, Medicine, Neuroendocrine Tumors, Somatostatine, DOTATATE
DOI: 10.17160/josha.5.7.472

Abstract:

This is one of the four works that have been selected by our JOSHA-editors as a winner of our Demetrios Preis 2018! The Thesis was presented by Simon Osterkamp from Germany. Neuroendocrine Tumors (NET) are relatively rare tumors with an incidence of 35 per 100000 in the USA. They express the Somatostatin Receptor (SST-R) which specifically binds the radioactive agent DOTATATE. The objective of the research presented here was to investigate whether saturation with ^{68}Ga -DOTATATE with ^{68}Ga has an effect on the KD. Furthermore, a protocol was to be developed which would allow measuring the KD-Value by IC50- determination via "Vakuum-Stanzer".

JOSHA

josha.org

**Journal of Science,
Humanities and Arts**

JOSHA is a service that helps scholars, researchers, and students discover, use, and build upon a wide range of content

Vergleich präklinischer Charakterisierungsmethoden eines Radiopharmakons

Bachelor-Thesis

zur Erlangung des Grades

Bachelor of Science

Vorgelegt von

Simon Osterkamp

Geboren am 01.01.1994 in Chauny

Matrikelnummer: 248728

Bearbeitungszeitraum: Oktober 2017- März 2018

Universitätsklinikum Freiburg

Department für Radiologische Diagnostik und Therapie

Klinik für Nuklearmedizin

Fakultät Medical and Life Science

Hochschule Furtwangen University

1. Betreuer: Prof. Dr. Hans Peter Digner, HFU Furtwangen
2. Betreuer: Prof. Dr. Matthias Eder, Universitätsklinikum Freiburg, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg (DKFZ), Comprehensive Cancer Center Freiburg (CCCF)

Danksagung

Der Erfolg einer Abschlussarbeit hängt nicht ausschließlich vom Bachelorand ab. Vielmehr erfährt man, dass man auf umfangreiche Hilfe angewiesen ist, und es eben diese Hilfe ist, die einen großen Teil im Erfolg einer Abschlussarbeit trägt. Danken möchte ich in erster Linie meinen Eltern, die mich auf meinem gesamten Schulweg bis zum Ende dieses Studiums hin, tatkräftig und in vielerlei Hinsicht unterstützt haben. Des Weiteren gilt mein Dank Christoph Rief, der mir in meiner Zeit in der Nuklearmedizin als mein Mentor und Betreuer auch als Nicht-Vollblutchemiker viel beigebracht hat, viel Zeit in mich neben seiner eigentlichen Dissertation investiert hat, mich geleitet hat und von dem ich viel lernen durfte. Danke dafür, und Dir weiterhin viel Erfolg und ein gutes Gelingen für Dein großes Projekt! Ebenso möchte ich mich bei Matthias Eder und dem DKFZ bedanken, die mir diese Stelle und diese Arbeit überhaupt ermöglicht haben. Matthias hat in seiner frisch gebackenen Abteilung, die sich in relativ kurzer Zeit in ein tatkräftiges, motiviertes Team verwandelt hat, immer ein offenes Ohr für jegliche Fragen. Dem DKFZ ebenso für die finanzielle Unterstützung. Danken möchte ich für die tatkräftige Unterstützung im weiteren Sinne auch Carolyn Hettinger. Ohne Sie wären die Sättigungsversuche häufig bis tief in die Nacht gegangen. Für den dazugewonnenen Schlaf möchte ich mich deshalb bei dir bedanken, und wünsche dir alles Gute auf deinem Weg ins Studium. Der Klinik für Nuklearmedizin ebenso, unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. Ph. T. Meyer. Last but not least möchte ich mich bei Yvonne Kiefer und Mark Bartholomä bedanken, die bei plötzlich auftretenden Fragen meinerseits ebenfalls immer eine Antwort parat hatten.

Universitätsklinikum Freiburg

Department für Radiologische Diagnostik und Therapie

Klinik für Nuklearmedizin

Fakultät Medical and Life Science

Hochschule Furtwangen University

Bearbeitungszeitraum: 15.10.2017 – 10.03.2018

Arbeitsort: Universitätsklinikum Freiburg, Klinik für Nuklearmedizin

1. Betreuer: Prof. Dr. Hans-Peter Deigner

2. Betreuer: Prof. Dr. Matthias Eder



Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis	4
2. Klinik für Nuklearmedizin in Freiburg	5
3. Abstract	7
4. Einleitung.....	8
a. Radioaktivität und Zerfall	8
b. Positronenemissionstomographie (PET)	9
c. Radiopharmazie.....	12
d. Zielsetzung.....	15
5. Geräteliste	16
6. Material/Methoden.....	17
a. Peptidsynthese DOTATATE.....	17
i. Peptidsynthese mittels Peptidsynthesizer	17
ii. Ankoppeln des Chelators am Peptid	20
iii. Cyclisierung des DOTATATE.....	20
b. Aufreinigung des Peptids durch FLASH Chromatographie und HPLC	21
i. Vorreinigung mittels FLASH-Chromatographie	21
ii. Aufreinigung DOTATATE mittels semipräparativer HPLC.....	21
c. Konzentrationsbestimmung mittels OD- Messung	22
d. Radiomarkierung	23
i. Radiomarkierung mit ⁶⁸ Ga	23
ii. Radiomarkierung mit ¹⁷⁷ Lu	25
iii. Markierung mit 69/71Ga.....	26
e. Zellkulturassays	28
i. Saturation Binding Assay.....	28
ii. IC50-Bestimmung mittels Vakuum-Puncher	32
7. Ergebnisse.....	37
8. Diskussion.....	44
9. Literaturverzeichnis.....	51
10. Bilderverzeichnis	53
11. Tabellenverzeichnis	54
12. Eidesstattliche Erklärung	55
X. Anhang.....	56

1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.: Abbildung

bzw.: beziehungsweise

PET/CT: Positronen Emissions Tomographie

ppm: parts per million

SPECT: Single Photon Emission Computed Tomography

SPECT/CT: Single Photon Emission Computed Tomography/ Computer Tomography

PSMA: Prostata Spezifisches Membran Antigen

FDG: Flourdesoxyglukose

CT: Computertomographie

SST: Somastostatin

sog.: sogenannte(n)

T: Temperatur

Tab.: Tabelle

TFA: Triflouressigsäure

TIS: Triisopropylsilan

$t_{1/2}$: Halbwertszeit

V.a.: Verdacht auf

vgl.: vergleiche

z.B.: zum Beispiel

u.a.: und andere

d.h.: das heißt

usw.: und so weiter

s.: siehe

DMF: Dimethylformamid

DIPEA: Diisopropylethylamin

HATU: O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorosphat

DOTA: 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure

NODAGA: 1,4,7-triazacyclononane,1-glutaric acid, 4,7-acetic acid

M: molar

mM: milli molar

MWCO: Molecule Weight cut off

LOR: Line of Response

MIBG: Metaiodbenzylguanidin

MRT: Magnet Resonanz Tomographie

2. Klinik für Nuklearmedizin in Freiburg

Das Universitätsklinikum Freiburg gehört mit etwa 11.100 Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern zu den größten Universitätskliniken in Deutschland. Rund 1.400 Ärztinnen und Ärzte sowie mehr als 2.900 Pflegekräfte versorgen pro Jahr rund 69.000 Patientinnen und Patienten stationär sowie rund 670.000 Besucher ambulant. Rund 68.000 stationäre Fälle sowie rund 680.000 ambulante Patienten versorgte das Klinikum allein im Jahr 2015 [1].

Die Klinik für Nuklearmedizin in Freiburg des Departments für radiologische Diagnostik und Therapie innerhalb des Universitätsklinikums umfasst mehrere Funktionsbereiche der heutigen modernen Nuklearmedizin. Zu diesen zählen die Kameradiagnostik mit einem 2-Kopf SPECT System sowie zwei weiteren SPECT/CT mit zusätzlichem CT zur Schwächungskorrektur der szintigraphischen Tomographie und damit zur verbesserten quantitativen Auswertung oder zur Durchführung eines diagnostischen CT. Die Kameradiagnostik wird hauptsächlich verwendet, um szintigraphische Untersuchungen aller Art durchführen.

Ein weiterer Bereich ist die Positronen Emissions Tomographie (PET), bei der hauptsächlich für onkologische Fragestellungen mit 2 PET/CT Systemen der Firma Philipps unterschiedliche Untersuchungen durchgeführt werden können. Ein System hat neben dem PET ein 64-Zeilen CT eingebaut (Gemini TF) und ein weiteres mit 16-Zeilen CT (Gemini TF Big Bore) hat einen größeren Gantrydurchmesser für spezielle Untersuchungen zur Strahlentherapieplanung. Die PET/CT dient hauptsächlich als Diagnoseverfahren für das Staging, die Therapieplanung und der Nachsorge onkologischer Patienten. Ferner findet die PET Anwendung bei verschiedenen neurologischen insbesondere neurodegenerativen Fragestellungen.

Weiterhin besitzt die Klinik für Nuklearmedizin eine Schilddrüsenambulanz zur Abklärung von gutartigen oder bösartigen Veränderungen der Schilddrüse. Diese können durch Ultraschall und weiterer Laboruntersuchungen, sowie Schilddrüsenzintigraphien diagnostiziert werden. Die Schilddrüsenzintigraphie wird mit einer Kleinfeld-Gammakamera durchgeführt. Auf der Station von Hevesy, benannt nach dem ungarischen Chemiker und Nobelpreisträger George de Hevesy, werden Patienten mit benignen Schilddrüsenerkrankungen aber auch mit bösartigen Schilddrüsenkarzinomen mit einer Radioiodtherapie behandelt [1]. Diese Station ist durch besondere Baumaßnahmen im Sinne des Strahlenschutzes speziell ausgebaut. So sind z.B. die Wände und Türen der Patientenzimmer zusätzlich mit Blei abgeschirmt und die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter sind gesondert geschult im Umgang mit radioaktiven Stoffen. Auch das auf der Station anfallende Abwasser muss explizit gesammelt werden und in Abklingbecken mehrere Wochen bis zum Erreichen der gesetzlich vorgeschriebenen Grenzwerte abklingen, bis es in den regulären Abwasserkreislauf übergeleitet werden kann.

Im präklinischen Bereich stehen der Klinik mehrere chemische als auch biologische Laboreinheiten mit hochwertigen Analytikgeräten zur Verfügung, sowie Zellkultur und Labore für in vivo Vorhaben. Ebenfalls sind dort ein Kleintier-PET System sowie ein Kleintier CT vorhanden, um die biologische, diagnostische Wirksamkeit neu entwickelter Tracer in der Bildgebung zu testen.

Die Klinik stellt Ihre diagnostischen Tracer wie das [⁶⁸Ga]DOTATATE, [¹⁷⁷Lu]DOTATATE oder [⁶⁸Ga]PSMA, [¹⁷⁷Lu]PSMA entweder im hauseigenen GMP Labor selbst her, oder sie wird durch die ebenfalls im Haus angesiedelte Tochtergesellschaft EUROPET beliefert. Für den am häufigsten verwendeten Tracer [¹⁸F]FDG ist zur Produktion ein Zyklotron notwendig, welches durch die EUROPET GmbH betrieben wird.

3. Abstract

Einleitung

Neuroendokrine Tumore (NET) sind mit einer Inzidenz von 35 Fälle pro 100.000 Einwohner in den USA relativ seltene Neoplasien [22]. Diese exprimieren den sog. Somatostatin Rezeptor (SST-R) an dem spezifisch das Radiopharmakon DOTATATE bindet. Nachdem herausgefunden wurde, dass auch andere Organe wie z.B. Bronchialzellen oder Brustzellen diesen Rezeptor exprimieren, erhöhte sich das Interesse an deren Behandlung. Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, ob eine Absättigung des radiomarkierten ^{68}Ga -DOTATATE mittels $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$ eine Auswirkung auf den K_D -Wert hat. Zusätzlich sollte ein Protokoll geschaffen werden, um mittels IC_{50} -Bestimmung via Vakuum-Stanzer ebenfalls den K_D -Wert bestimmen zu können.

Material/Methoden

Zur K_D -Wert Bestimmung wurden insgesamt 7 Sättigungsexperimente in 6-Well Plates durchgeführt. Jeweils 3 Versuche wurden einmal mit nachträglicher „Kaltmarkierung“ durchgeführt, während 3 weitere Versuche ohne zusätzliche Absättigung des DOTATATE mit $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ -Lösung stattfanden. Humane embryonale Nierenzellen des Subtyps 2 (Hek 293T) dienen dabei als Target. Zur Bestimmung des IC_{50} wurden 96-Well Filter Plates verwendet und mittels Vakuum-Stanzer gestanzt. Es wurden verschiedene Ansätze durchgeführt.

Ergebnisse

Die Sättigungsexperimente deuten mit einem p-Wert von 0,1 keinerlei statistische Signifikanz für eine nachträgliche Kaltmarkierung an ($31,77 \pm 4,4$ ohne Kaltmarkierung, $46,25 \pm 11,09$ mit Kaltmarkierung)

Insgesamt 8 IC_{50} -Experimente wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen und Art des Radioliganden durchgeführt. Es konnte eine optimale Detektion bei einer Konzentration von 2 nM des Radioliganden festgestellt werden.

Schlussfolgerungen

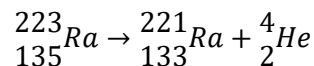
Eine Verbesserung des K_D -Werts durch zusätzliche Absättigung des radiomarkierten DOTATATE konnte nicht festgestellt werden. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass die Radiomarkierung mittels Kassettsynthese durch Konzentrationsveränderungen den K_D -Wert deutlich verändert. Homologe IC_{50} -Experimente führen nur zu guten und verlässlichen Ergebnissen, wenn $[\text{c}]$ des Heißliganden weniger als die Hälfte des Wertes vom IC_{50} ist. Ansonsten ist eine Bestimmung des K_D -Wertes nicht mehr direkt möglich. Dies war bei Versuch N°3 der Fall [15].

4. Einleitung

a. Radioaktivität und Zerfall

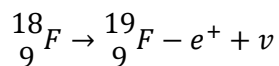
Die Radioaktivität ist ein statistischer Zerfallsprozess. Es ist die Eigenschaft instabiler Kerne, ionisierende Strahlung bei deren Zerfall auszusenden. Der Kern wandelt sich bei Aussendung von Teilchen entweder in einen anderen Kern um, oder ändert seinen Zustand indem dieser Energie abgibt. Im Allgemeinen werden 3 Zerfallsarten unterschieden:

- Ein Alphastrahler sendet aus seinem instabilen Kern Alphateilchen aus. Diese bestehen aus 2 Protonen und 2 Neutronen und entsprechen daher Heliumkernen [2].

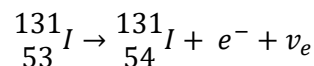


Alpha- Zerfall am Beispiel der *Xofigo*TM-Therapie zur Behandlung von Knochenmetastasen.

- Bei Betastrahlern unterscheidet man 2 verschiedene Arten. Die β^+ und β^- Strahler. Bei β^+ Strahlern emittiert das Mutternuklid Positronen, während bei β^- das Mutternuklid Elektronen emittiert. Dieses entsteht im Atomkern bei der Umwandlung eines Neutrons [2].

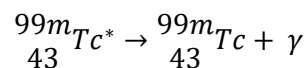


β^+ -Zerfall am Bsp. des [¹⁸F]FDG



β^- -Zerfall am Bsp. des ¹³¹Iod

- Gammastrahler emittieren bei ihrem Zerfall sehr energiereiche Photonen (elektromagnetische Wellen). Diese Zerfallsart tritt meist aus einem vorangegangenen Alpha oder Betazerfall hervor [2].



Gamma- Zerfall am Bsp. von ^{99m}Tc

Abb. 1 verdeutlicht in einem hypothetischen Kern alle gängigen Zerfallsprozesse.

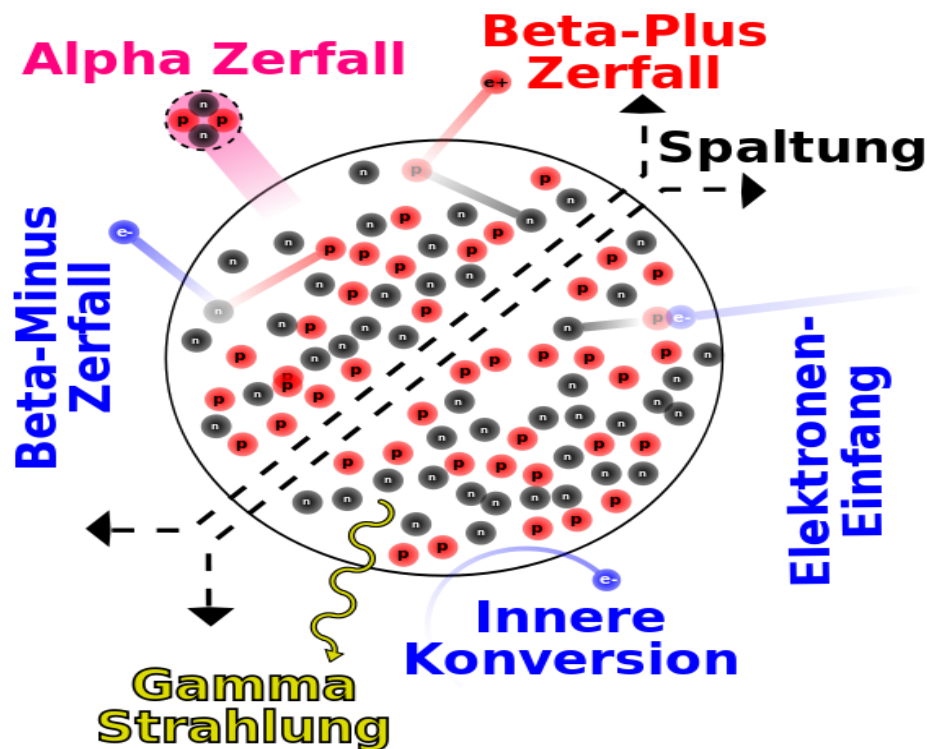


Abb.1: Hypothetisches Schaubild eines Kerns der alle Zerfallsprozesse vereint. Auszug aus: Wikibooks.de

b. Positronenemissionstomographie (PET)

Mithilfe einer PET Untersuchung können erhöhte Stoffwechselforgänge im Körper dargestellt werden. Dieses geschieht in einer gängigen Untersuchung mittels FDG. Der Hintergrund dabei, liegt im erhöhten Energieumsatz von Tumorzellen, allem voran durch den Hauptenergielieferanten Glukose [3]. FDG ist der am häufigsten verwendete Tracer in der PET und ist ein Glukose-Analogen, welches an einer Molekülstelle anstatt einer Hydroxylgruppe das Radionuklid ^{18}F besitzt. Die Herstellung von ^{18}F erfolgt in einem Zyklotron, in dem das schwere Sauerstoffisotop ^{18}O mit Protonen beschossen wird. Anschließend wird das Radioisotop weiterverarbeitet. FDG wird vom Körper durch den wichtigsten Glucosetransporter GLUT-1 in die Zellen aufgenommen, wird allerdings dann nicht mehr weiter verstoffwechselt. Auf diese Weise akkumuliert der radioaktive Stoff in der Zelle und es können so Regionen ausfindig gemacht werden, die auf Neoplasien hinweisen. Mittels vorgeschaltetem CT können die PET-Bilder mit der Morphologie eines CT-Scans fusioniert werden, um eine genaue Lage des Tumors zu bestimmen [27].

Das PET/CT besteht aus einer CT Einheit und dem eigentlichen Detektorring der PET zur Detektion der nach einem Positronenzerfall und anschließender Positron-Elektron-Vernichtung emittierten Annihilationsphotonen. In der Regel wird dem Patienten eine Stunde vor der Untersuchung der radioaktive Tracer gespritzt. Diese Zeit wird als Uptake-Zeit bezeichnet, in der der Tracer sich im Körper verteilt und verstoffwechselt wird. Nach Ablauf dieser Zeit beginnt die eigentliche Untersuchung. Im Folgenden wird ein Protokoll beschrieben, welches sich auf eine übliche PET- Untersuchung beschränkt:

- 1) Topographisches Röntgenbild (CT-Topogramm), welches als Übersicht zur Planung der weiteren Untersuchung dient.
- 2) CT: nativ oder mit Kontrastmittel. Das CT wird für die Schwächungskorrektur des PET zwingend benötigt und dient später auch als strukturelle Information für die Befundung. Planung der PET-Aufnahme mit den Informationen aus dem CT. In der Regel erfolgt eine Untersuchung von der Schädelbasis bis zur Mitte des Femurs. Bei Bedarf kann auch eine Ganzkörperuntersuchung stattfinden.
- 3) PET-Aufnahme: Aufnahme der stoffwechselaktiven Informationen. Detektion der Vernichtungsstrahlung über den Detektorring. Die beiden erzeugten Aufnahmen werden anschließend fusioniert, oder können auch getrennt betrachtet werden.

Aufbau und Funktion PET/CT:

Während das CT mittels Röntgenstrahlung lediglich die strukturelle Information übermittelt, ist das Prinzip des PET ein anderes. Die Positronen des verwendeten β^+ Strahlers stoßen mit Elektronen im Körper zusammen (Annihilation). Dadurch entstehen hochenergetische Photonen (Vernichtungsstrahlung), die in einem Winkel von 180° auseinandergehen und zeitgleich auf dem Detektorring aufgezeichnet werden. Diese, als Koinzidenzen bezeichneten Photonen haben eine Energie von 511 keV und werden mittels Photomultiplier und Szintillationskristallen vervielfältigt, in ein messbares Signal umgewandelt und aufgezeichnet. Durch das zeitgleiche Aufkommen der Photonen kann somit der Ort bestimmt werden [4]. Die gedachte Linie auf der die γ -Quanten auseinandergehen wird LOR genannt.

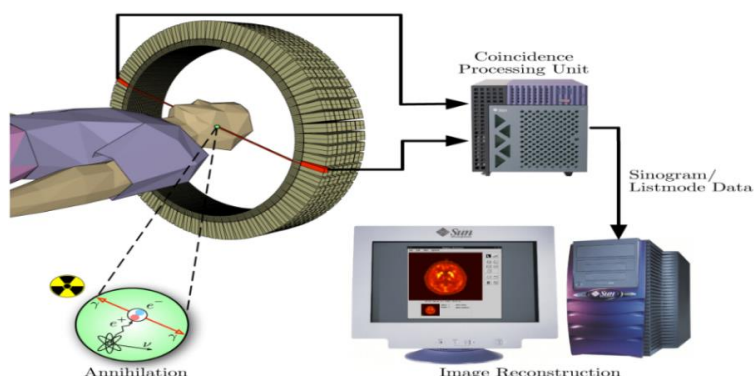


Abb.2: Prinzip der PET, Auszug aus: academic.ru

Es gibt verschiedene Arten der Annihilation. Die „echten Koinzidenzen“ sind allerdings die, die die wichtigsten und genauesten Informationen liefern.

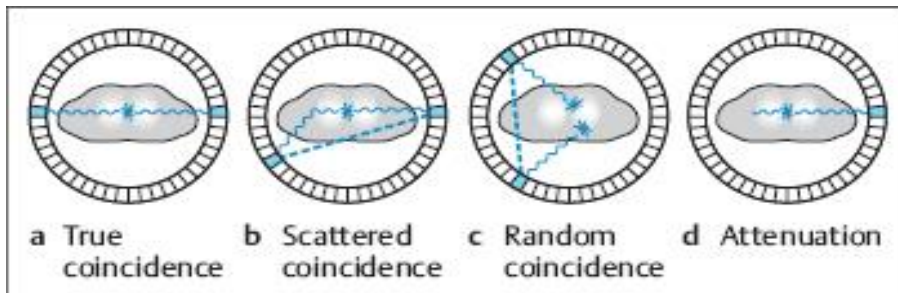


Abb.3: verschiedene Arten der Detektion von Koinzidenzen, Auszug aus: depts.washington.edu

Oben aufgeführte Abbildung zeigt die verschiedenen Formen der Detektion von Koinzidenzen. So gibt es neben den echten Koinzidenzen(a), Koinzidenzen die aufgrund einer Ablenkung entstehen(b). Ein Quant wird dabei auf dem Weg zum Detektor abgelenkt. Diese führen allerdings zu einer falschen Information, genauso wie zufällige Ereignisse(c). Bei zufälligen Ereignissen gerät jeweils ein Quant von zwei unterschiedlichen Annihilationen zur gleichen Zeit auf den Detektor und erzeugen eine zufällige Koinzidenz. Auch hier wird der Entstehungsort verfälscht. Kommt es zur Schwächung von Annihilationen, wird ein γ -Quant vom Gewebe vollständig absorbiert und nur ein Quant wird vom Detektor registriert(d). Durch eine Schwächungskorrektur können abgeschwächte Quanten kompensiert und den entlang dieser Linie registrierten Quanten ein größerer Stellenwert verliehen werden. Gestreute, d.h. abgelenkte Koinzidenzen wie in (b) dargestellt, haben meist ein anderes Energieniveau als 511 keV und können auf diese Weise herausgerechnet werden [4].

Durch verschiedene Algorithmen in der Software und durch Modellannahmen werden möglichst viele Koinzidenzen herausgerechnet, sodass am Ende nahezu ausschließlich die echten Koinzidenzen übrigbleiben.

Der wesentliche Vorteil von PET gegenüber dem SPECT liegt in der weitaus höheren Zählrate, bedingt durch die bei den SPECT-Systemen notwendigen Kollimatoren. Dies blendet einen Großteil der Photonen aus, was zu einer geringeren Zählstatistik führt, und somit auch zu einer geringeren Bildqualität und geringeren räumlichen Auflösung [4].

Ausblick und Neuerungen/ digitales PET/CT:

In den meisten PET/CT Systemen erfolgt die Datenakquisition momentan innerhalb des Detektorrings aus Szintillationskristallen mit herkömmlichen Photomultiplier analog. Neuere PET-Systeme (z.B. Philips Vereos PET/CT) akquirieren die Daten nun gänzlich digital mittels Digital Photon Counting (DPC) Technologie. DPC, die von Philips firmeneigene Technologie, konvertiert Szintillationslicht direkt in ein digitales Signal ohne störendes analoges Rauschen. Der Kontrast und die Auflösung werden auch durch eine viel größere Abdeckung und Pixeldichte verbessert. Diese verbesserte 1-1 Kopplung von Kristallen und Lichtsensoren erzeugt weitestgehend lineares Zählratenverhalten, eine erhöhte TOF (Time of Flight) Genauigkeit und eine höhere Empfindlichkeit im Vergleich zu analogen Techniken [5].

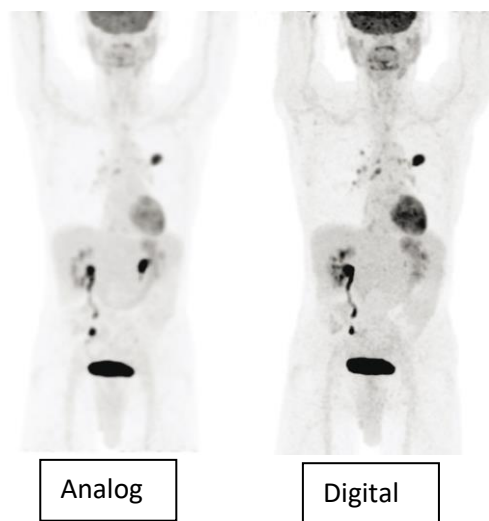


Abb.4: MIP Vergleich einer FDG-Akquisition analog/digitale PET/CT (links analog, rechts digital), klar zu erkennen ist der deutlich verbesserte Kontrast. Auszug aus www.digitalpetlearningcenter.philips.com/

c. Radiopharmazie

Die Radiopharmazie ist im Wesentlichen ein Teilgebiet der Pharmazie und befasst sich mit der Synthese, dem Modelling und den pharmakologischen Eigenschaften von Radiopharmaka. Dabei können diese Pharmaka sowohl zur Diagnostik als auch zur Therapie benutzt werden [6].

Unten abgebildet ist der allgemeine Aufbau eines peptidbasierten Radiopharmakons.

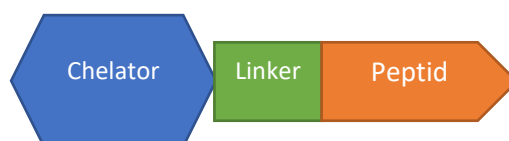


Abb.5. allgemeiner peptidbasierter Radiopharmakonaufbau

Dabei besteht üblicherweise ein peptidbasiertes Radiopharmakon aus einem Chelator, der in seinem Komplexsystem das radioaktive Metall bindet, Linkermolekülen und einem daran konjugiertem Peptid. Linker sind bestimmte Abfolgen organischer Gruppen, die einen gewissen Abstand zwischen Chelator und Peptid wahren, um einerseits Interaktionen zwischen den beiden Einheiten zu verringern, andererseits aber auch um eine Verbesserung der Bindung des Peptids in das Bindemotiv des Rezeptors zu erwirken, und somit störende Effekte des Chelators zu verringern.

So gibt es eine Reihe von Peptid-Chelator Konjugaten, die erforscht bzw. weiterentwickelt werden. DOTA, HBED, NODAGA, DTPA sind einige Beispiele für Chelatoren. Die verwendeten Peptide müssen spezifisch an den dafür anvisierten Rezeptor binden. So verwendet man DOTATATE für neuroendokrine Tumore, die den Somatostatinrezeptor überexprimieren. PSMA verwendet man z.B. zur Abklärung von Prostatakarzinomen. Kleinste Änderungen in der AS-Sequenz des Peptids können sich sowohl positiv auswirken, als auch zu einem Bindungseinbruch zum Rezeptor führen [26]. Auch dies ist Bestandteil der durchgeführten Forschungen [18] [10].

Dabei gibt es nicht nur peptidbasierte Radiopharmaka. [^{18}F]FDG (Abb.6) Fluordesoxyglukose besteht dabei aus modifizierter D-Glukose. [^{11}C]Pittsburgh compound (PiB) wird zur Alzheimerfrühdagnostik verwendet, da es an die Amyloid-Beta Plaques im Gehirn bindet. Es ist auf der Basis von Thioflavin-T, einem Fluoreszenzfarbstoff aufgebaut [24]. MIBG, Metaiodbenzylguanidin wird z.B. für szintigraphische Fragestellungen meist mit ^{131}I im SPECT/CT verwendet und ähnelt strukturell dem Noradrenalin [25].

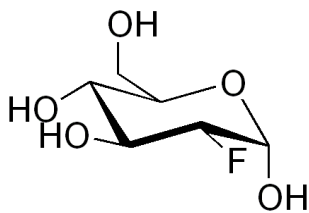


Abb.6: 2-Fluor-2-desoxy-D-glucose (FDG). Aus Wikimedia.org

^{18}F findet nicht nur Verwendung als Bestandteil eines Glukoseanalogons. Fluorethylthirosin (FET) z.B. ist eine einzelne modifizierte Aminosäure, die bei der Diagnostik von Hirntumoren Verwendung findet. Neben dem ^{18}F werden in der PET auch noch verschiedene andere Radionuklide verwendet. ^{68}Ga wird z.B. zur Diagnostik von Prostatakarzinomen verwendet, in dem es an den spezifischen Marker PSMA gekoppelt wird. Außerdem kann ^{68}Ga zur Diagnostik von neuroendokrinen Tumoren benutzt werden. Die verschiedenen Isotope haben alle eine unterschiedliche Halbwertszeit. Daher müssen immer andere Untersuchungsprotokolle eingehalten werden. So muss bei einer Hirnperfusionsuntersuchung

mit ^{15}O extrem schnell vorgegangen werden, da die Halbwertszeit des Isotops ^{15}O bei 2 Minuten liegt. Die Herstellung solcher Radionuklide und die anschließende Verwendung zur Diagnostik kann wegen der kurzen Halbwertszeit nur vor Ort geschehen.

Nachfolgende Tabelle zeigt eine Auswahl verschiedener Radiopharmaka und deren Verwendungszweck.

Tab. 1: Auswahl versch. Radiopharmaka und deren Funktion in der PET [27]

Isotop	Tracer	Verwendung
^{11}C	$[^{11}\text{C}]$ Acetat	Darstellung O ₂ Verbrauch Herzmuskel
	$[^{11}\text{C}]$ S-Methyl-L-Methionin	Darstellung Proteinbiosynthese
	$[^{11}\text{C}]$ Pittsburgh compound (PiB)	Alzheimerfrühdagnostik
^{13}N	$[^{13}\text{N}]$ L-Glutaminsäure	Aminosäurestoffwechsel
	$[^{13}\text{N}]$ Ammoniak	Herzmuskel-Perfusion
^{15}O	$[^{15}\text{O}]$ Wasser	Hirn- und Herzmuskel Perfusionsuntersuchung
^{18}F	$[^{18}\text{F}]$ Cholin	Prostatakrebsdiagnostik
	$[^{18}\text{F}]$ Fluorethylthymosin (FET)	Hirntumore
	$[^{18}\text{F}]$ FDG	Glukoseaufnahme/Stoffwechselumsatz
	$[^{18}\text{F}]$ DOPA	Präsynaptischer Dopaminpool/ neuroendokrine Tumore
^{68}Ga	$[^{68}\text{Ga}]$ DOTATATE/DOTATOC	Neuroendokrine Tumore (Somatostatin Rezeptor, SST-2)
^{68}Ga	$[^{68}\text{Ga}]$ PSMA	Prostatakrebsdiagnostik
^{82}Rb	$[^{82}\text{Rb}]$ Chlorid	Herzmuskel-Perfusion

Das in dieser Arbeit am häufigsten verwendete Radiopharmakon ist das DOTATATE, welches aus dem Chelator DOTA (1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure) [7] und dem Peptid TATE besteht. Es bindet spezifisch an den Somatostatinrezeptor SST2, welcher vor allem bei neuroendokrinen Tumoren, und auch bei Bronchial-, Brust- sowie Prostatakarzinomen überexprimiert wird. Die Inzidenz von neuroendokrinen Tumoren mit 35 Neuerkrankungen auf 100.000 Einwohner in den USA zeigt, dass es sich hierbei um eine

eher seltene Tumorgruppe handelt [8]. Für deren Diagnose und Therapie ist DOTATATE der verbreitete Goldstandard in der Klinik, der sich gegenüber Octreoscan (Octreotidszintigraphie, mittels DOTA-Octreotid Scan), MIBG Szintigraphie und der MRT in der Läsionserkennung als weit aus überlegener herausgestellt hat. Octreotid stellt dabei ebenfalls ein Somatostatinanalogon dar [9].

d. Zielsetzung

Theranostika sind in der heutigen Medizin wichtige Instrumente um nicht nur eine Krankheit zu diagnostizieren, sondern auch um diese Krankheit gleichzeitig zu therapieren. Die in der Radiopharmazie Freiburg hergestellten Radiopharmaka zählen ebenfalls zu den Theranostika und werden einerseits zur Diagnose spezifischer Krebsarten im PET/CT verwendet, sowie zur Radioendotherapie gesicherter Diagnosen. Dazu wird der Radiotracer einmal mit einem β^+ -Strahler gekoppelt, der nach der Anreicherung im Körper des Patienten durch die PET/CT-Untersuchung und der aufgenommenen Annihilationsstrahlung die Läsionen sichtbar macht. Zur Therapie wird der Radiotracer beispielsweise mit ^{177}Lu markiert, das eine längere Halbwertszeit sowie eine für die Therapie geeignete Strahlungsart hat. Mit besserer Software- sowie Hardwareentwicklung auf gerätetechnischer Seite und Entwicklung neuer Tracer auf der anderen Seite, kann immer früher eine Diagnose, und damit verbunden auch eine adäquate Therapie gefunden werden. Theranostika sind sehr sensitive sowie spezifische Medikamente, um eine evtl. Krebsdiagnose stellen und eine Therapie durchführen zu können.

Weitere Entwicklungen in diesem Bereich sollen den Tumortake verbessern, und so unter anderem die Diagnostik erleichtern. Ebenso Verbesserungsbedarf haben die Pharmaka immer in Hinblick auf ihre Lipophilie sowie Hydrophilie. Dies hat Einfluss auf Ihre Ausscheidung über die Nieren bzw. deren Anreicherung in der Leber, welches mit unnötig hohen Strahlungsexpositionen verbunden ist. Damit neuentwickelte Peptide mit dem bereits vorhandenen verglichen werden können, bedarf es der Entwicklung eines Standards in Bezug auf präklinische Charakterisierungsmethoden wie der IC_{50} Bestimmung bzw. der Bestimmung des K_D -Wertes mittels *Saturation Binding*. Diese werden durch die Durchführung von *Saturation Binding* Assays, sowie der IC_{50} -Bestimmung gesetzt. Ebenfalls gibt es Fragestellungen in Bezug auf die Affinität von Verbindungen in Abhängigkeit des Zustands des Chelators (freier Ligand oder $^{69/71}\text{Ga}$ -markiert), die durch diese Assays beantwortet werden sollen.

5. Geräteliste

Tab.2: Geräteliste

Gerät	Hersteller	Modell
Absauger	Sartorius	Midi Plus
Brutschrank	Thermo Scientific	Hera Cell
Brutschrank	Thermo Scientific	Hera Cell
Feinwaage	Sartorius	CPA 124S
Flash Chromatographie	Biotage	Isolera Assist 3.0
HPLC, analytisch	Agilent Technologies	1200 Series
HPLC, semipräparativ	Knauer	Smartline Manager 5000
Mini Spin	Eppendorf	Mini Spin
Massenspektrometer	Perkin Elmer	SQ 300 MS
Mikroskope	Zeiss	Axiovert 40 C
Peptidsynthesizer	CS Bio	CS 336 X
Pipetten	Eppendorf	Research Plus
Radiomarkierung Ga-68	Eckert & Ziegler	ModularLab PharmTracer
Rotationsverdampfer	Heidolph	Laborata 4010 digital
Rüttelplatte	Heidolph	Titramax 100
Stanzer	MerkMilipore	Multiscreen MAMP09608

6. Material/Methoden

a. Peptidsynthese DOTATATE

i. Peptidsynthese mittels Peptidsynthesizer

Als Chelator dient hier DOTA, welcher im Inneren seines Komplex das radioaktive Metall ^{68}Ga komplexiert.

Das in dieser Arbeit hergestellte Peptid heißt DOTATATE. Nachfolgend dargestellt besteht das Peptid TATE aus folgender AS Sequenz: Thr-Cys-Thr-Lys-Try-Tyr-Cys-Phe

Abb.7 zeigt den gesamten Aufbau des DOTATATE. Es ist in diesem Radiopharmakon kein Linker vorhanden. Gekennzeichnet sind jedoch der Chelator DOTA sowie das Peptid TATE, welches durch eine Disulfidbrückenbindung zwischen den beiden AS Cystein cyclisiert vorliegt. Weitere verwendete Peptide in dieser Arbeit sind NODAGA-LM3 sowie CR3N. Dies sind beides Derivate des DOTATATE und binden beide ebenfalls an den SST2-Rezeptor.

Bei NODAGA-LM3 dient NODAGA (1,4,7-triazacyclononane,1-glutaric acid, 4,7-acetic acid) als Chelator [17]. LM3 besteht dabei aus folgender AS-Sequenz:

p-Cl-Phe-cyclo(D-CysTyr-D-Aph(Cbm)-Lys-Thr-Cys)D-Tyr-NH₂ [17].

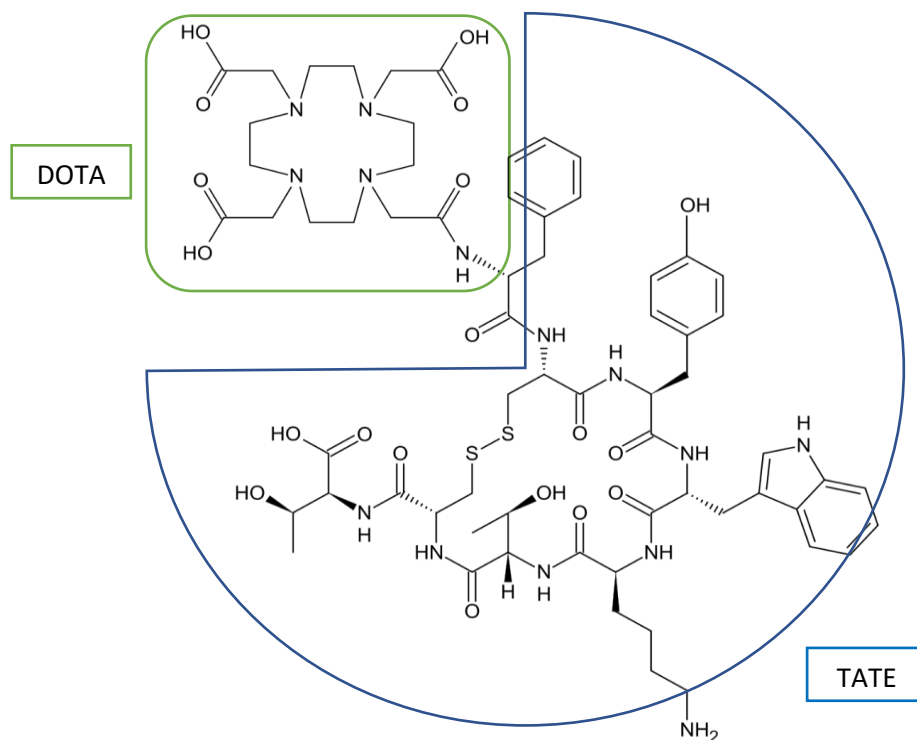


Abb.7: DOTATATE

Die Aminosäuren sind durch FMOC-Schutzgruppen am N-Terminus und durch eine tert-Buthylestergruppe oder ACM-Schutzgruppe am C-Terminus vor ungewolltem Abbau bzw. ungewollten Reaktionen geschützt. Das Peptid wird an einem Polymer synthetisiert. Somit handelt es sich hierbei um eine Festphasen-Peptid-Synthese. Dazu dient Wang-Resin (FMOC-Thr(tBu)-Wang resin (100-200 mesh), Beladungsdichte: 0,68 mmol/g) als Harz. Am Resin ist für diesen Versuch bereits die erste AS gekoppelt. Die weiteren AS wurden im 4-fachen Überschuss zum Resin (0,2 mmol = 294 mg) eingesetzt.

Als Ansatz wurden von jeder Aminosäure 0,8 mmol genommen, die wie folgt abgewogen wurden:

- (1) Fmoc- Thr(tBu)-OH $M= 397,48 \text{ g/mol} \rightarrow m= 0,318 \text{ g}$
- (2) Fmoc- Cys(Acm)-OH $M= 414,5 \text{ g/mol} \rightarrow m= 0,331 \text{ g}$
- (3) Fmoc- Thr(tBu)-OH $M= 397,48 \text{ g/mol} \rightarrow m= 0,318 \text{ g}$
- (4) Fmoc- Lys(tBu)-OH $M= 468,5 \text{ g/mol} \rightarrow m=0,375 \text{ g}$
- (5) Fmoc-D-Trp(tBu)-OH $M= 426,46 \text{ g/mol} \rightarrow m=0,341 \text{ g}$
- (6) Fmoc-Tyr(tBu)-OH $M= 459,6 \text{ g/mol} \rightarrow m=0,368 \text{ g}$
- (7) Fmoc- Cys(Acm)-OH $M= 414,5 \text{ g/mol} \rightarrow m=0,331 \text{ g}$
- (8) Fmoc- D-Phe-OH $M= 387,4 \text{ g/mol} \rightarrow m = 310 \text{ g}$

Ablauf der Peptidsynthese mittels Peptidsynthesizer:

Der Peptidsynthesizer ist ein vollautomatisches Gerät, welches ausgehend vom Resin im Reaction Vial die einzelnen Aminosäuren zu einem linearen Peptid verbindet. Es reagiert dabei immer der C-Terminus einer Aminosäure mit dem N-Terminus der nächsten Aminosäure und bildet eine Peptidbindung aus. Dabei wiederholen sich die einzelnen Schritte für jede Kopplung. Dies kann durch die Modifikation von Programmabläufen geändert werden. Die durchgeführte Synthese verlief nach Standard-FMOC-Protokoll [23].

Die einzelnen Schritte sind untenstehend aufgeführt:

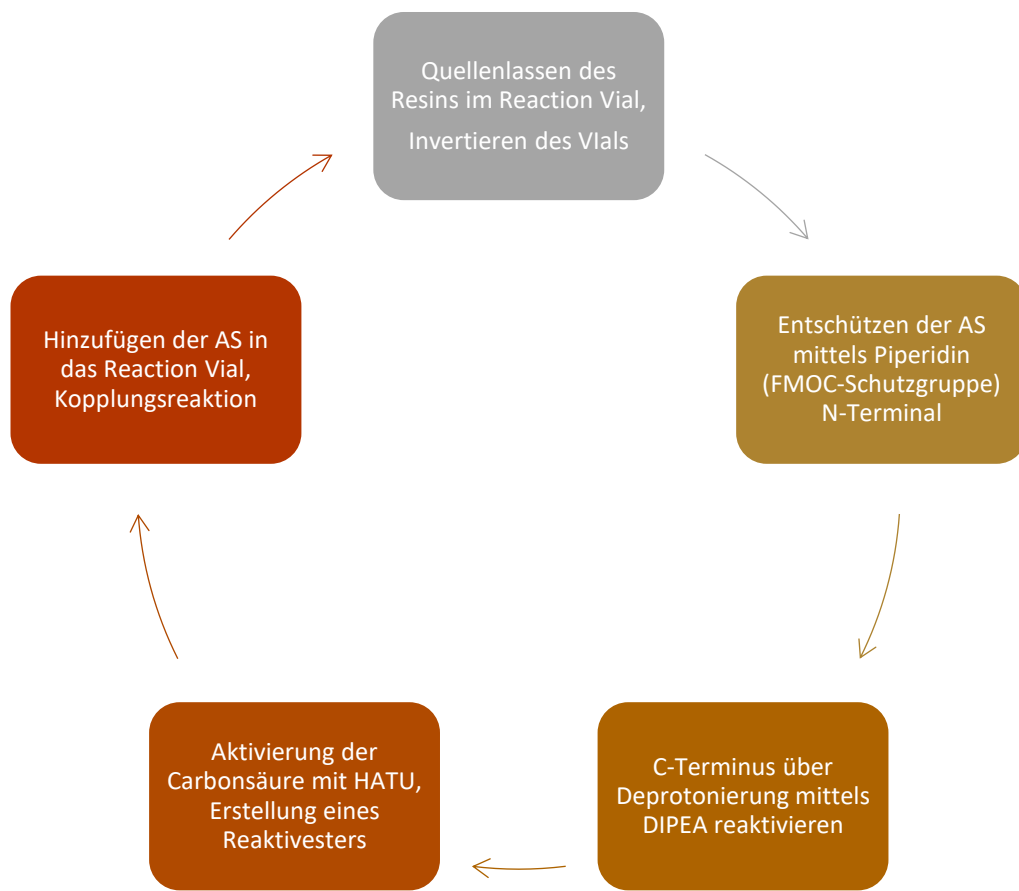


Abb.8: Allgemeiner Ablauf einer Festphasenpeptidsynthese

Die Kopplung einer Aminosäure an das Resin bzw. an das wachsende Peptid nimmt etwa 90 Minuten in Anspruch.

Für die einzelnen Lösungen wurden folgenden Ansätze verwendet, und in die einzelnen Gefäße vor Programmstart vorgelegt:

Piperidin: 20%ige Lösung in DMF insg. 300ml

DIPEA: 10mol eq/Resin pro Kopplung → pro Kopplung 10-facher Überschuss

$10 \cdot 0,2 \text{ mmol} = 2 \text{ mmol}$ pro Kopplung in 2,5 ml → für 9 Kopplungen $\triangleq 18 \text{ mmol}$ in 22,5 ml DMF

HATU: 4,5 mol eq/ Resin pro Kopplung

$4,5 \cdot 0,2 \triangleq 0,9 \text{ mmol}$ pro Kopplung in 2,5 ml → für 9 Kopplungen $\triangleq 8,1 \text{ mmol}$ in 22,5 ml DMF

ii. Ankoppeln des Chelators am Peptid

Das synthetisierte Peptid TATE, bestehend aus den 9 gekoppelten AS, wird nun aus dem Schwenkbereich des Peptid-Synthesizers entnommen. TATE muss bevor es in einem nächsten Schritt mit dem Chelator gekoppelt wird vom Resin abgespaltet werden. Dies geschieht mit einer Lösung bestehend aus 95% Trifluoressigsäure (TFA), 2,5% Triisopropylsilan (TIS) und 2,5% H₂O.

TFA wird in einem nächsten Schritt durch dreimaliges waschen und abzentrifugieren mit Diethylether herausgewaschen.

DOTA (M= 572,73 mg/mmol) wird in einem 0,8 mmol großen Ansatz mit dem zuvor synthetisierten TATE ebenfalls im Peptidsynthesizer gekoppelt. Das verwendete DOTA ist bereits am Wang-Resin gebunden.

Aus dieser Kopplungsreaktion nach demselben Prinzip entsteht das fertige Endprodukt DOTATATE.

iii. Cyclisierung des DOTATATE

Das erhaltene Produkt ist nach der Synthese noch linear und wird cyclisiert.

Die Cyclisierung des Peptids erfolgt mit Thallium (M= 543,43 g/mol). Dabei werden 1,5 eq/mol TI verwendet.

$$1,5 * 0,2 \text{ mmol} \triangleq 0,3 \text{ mmol} \triangleq 163,03 \text{ mg TI}$$

Thallium cyclisiert das Peptid durch Bildung einer Disulfidbrücke zwischen den beiden vorhandenen Cysteinen.

Anschließend wird das cyclisierte Peptid vom Resin mit der ebenfalls zuvor hergestellten TFA-Lösung getrennt. Das DOTATATE wird auch hier mittels Diethylether dreimalig gewaschen und abzentrifugiert. Durch diesen Vorgang fällt das Peptid in der Ether-Lösung aus, kann abzentrifugiert und getrocknet werden.

Ein Kaiser-Test zum Nachweis freier Amine wird ebenfalls durchgeführt.

Die nachfolgende Analyse mittels Massenspektrometer und analytischer HPLC gibt Rückschlüsse darauf, ob die Synthese funktioniert hat.

Insgesamt konnten aus der Synthese 215,4 mg crude DOTATATE gewonnen werden, die nachfolgend aufgereinigt werden müssen.

b. Aufreinigung des Peptids durch FLASH Chromatographie und HPLC

i. Vorreinigung mittels FLASH-Chromatographie

Dabei dient die FLASH-Chromatographie zur Vorreinigung des crude DOTATATE.

In die FLASH-Chromatographie wurden pro Aufreinigung immer 30 mg Peptid in 750 µl 0,1 % TFA in H₂O gelöst und auf die Säule gegeben. Als Trennmittel dienten als Phase B Acetonitril + 0,1% TFA und als Phase A H₂O + 0,1% TFA.

Der Gradient fängt bei 0 Min. mit Phase B 30 % (70 % Phase A) an, und steigt innerhalb von 27 Min. auf 60% Phase B (40% Phase A) linear an. Dann erfolgt eine rasche weiterhin lineare Erhöhung von Phase B bis Min. 28 auf 95% (5 % Phase A).

ii. Aufreinigung DOTATATE mittels semipräparativer HPLC

Nach durchgeführter Vorreinigung wurden die gesammelten Fraktionen mit der semipräparativen HPLC nochmals aufgereinigt. Pro Lauf wurden hier ca. 2 ml vorgereinigtes Produkt auf die Säule gegeben.

Die Reinigung wurde so lange durchgeführt, bis eine Reinheit von >97% per analytischer HPLC sowie durch MS nachgewiesen werden konnte. Dies ist für die nachfolgenden Assays von großer Bedeutung. Nachfolgende Abbildungen zeigen das finale Ergebnis der Aufreinigung des gesamten Produkts.

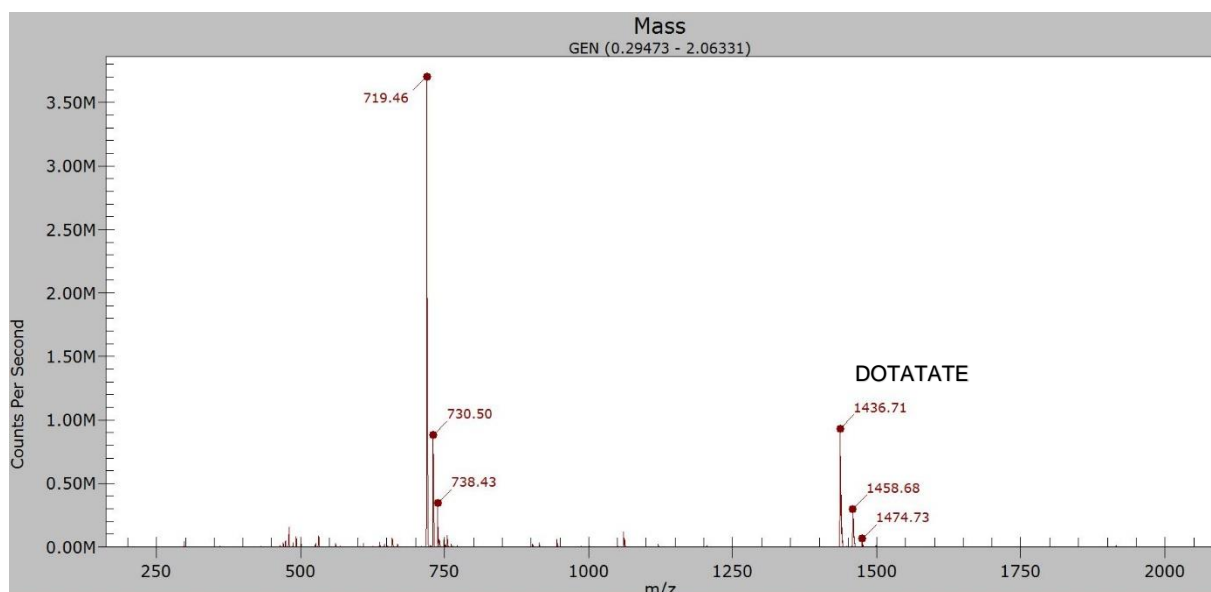


Abb.9: Massenspektrogramm des DOTATATE. Zu sehen ist das Hauptprodukt DOTATATE ($m/z=1436,71$; berechnete Masse $[M+H]^+=1435,63$).

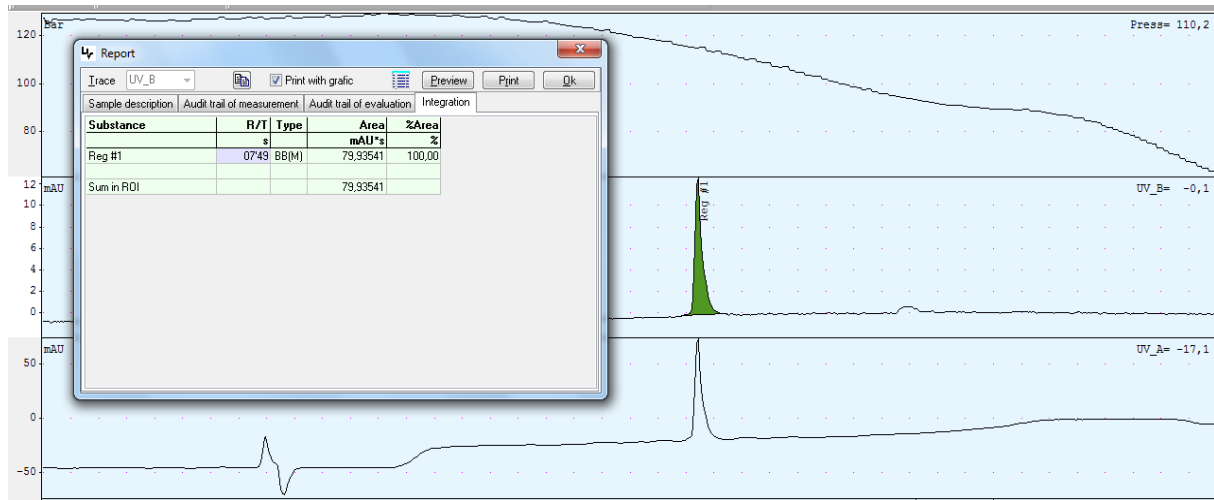


Abb.10: analytische HPLC (Gradient...) des aufgereinigten Produkts. Zu sehen ist ein einziger klar abgrenzbarer Peak (grün,100%).

Abschließend wird das aufgereinigte Produkt im Rotationsverdampfer eingedunstet, in Vials portioniert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Endprodukt wird im Lyophilisator schonend gefriergetrocknet.

c. Konzentrationsbestimmung mittels OD- Messung

Für die nachfolgenden Versuche müssen genau gleiche Mengen des hergestellten DOTATATE verwendet werden. Deshalb wird eine Stocklösung hergestellt, dessen Konzentration, sowie die Masse des Peptids mittels UV-Spektroskopie und dem Lambert-Beerschen Gesetz bestimmt werden.

Nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz ist $E = \varepsilon * c * d$

Der molare Extinktionskoeffizient ε ist mit $6940 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ gegeben aus den aromatischen Systemen des Tyrosins ($1250 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) sowie des Tryptophans ($5690 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) bei $\lambda = 280 \text{ nm}$.

Das Lyophilisat wurde in $1000 \mu\text{l H}_2\text{O}$ resuspendiert. Darin enthalten waren nach Einwaage ca. $1,7 \text{ mg}$ Peptid. Anschließend um den Faktor $41,22$ verdünnte Probe in der $500 \mu\text{l}$ Küvette ($12,13 \mu\text{l}$ Peptid und $487,87 \mu\text{l H}_2\text{O}$) ergab ein $E = 0,134$.

Die berechnete Konzentration $c = 0,79589 \text{ mmol/L}$ ergibt eine Masse $m = 1,142 \text{ mg}$

Für die Radiomarkierungen werden 5 nmol Substanz benötigt. Mit der untersuchten Stocklösung sind dies $6,33 \mu\text{l}$.

Die Stocklösung wurde auf $0,5 \text{ nmol}/\mu\text{l}$ für die Radiomarkierungen eingestellt.

d. Radiomarkierung

i. Radiomarkierung mit ^{68}Ga

Nach Herstellung des DOTATATE, Aufreinigung und Lyophilisation des Endprodukts, wurde im Anschluss eine Konzentrationsbestimmung mittels UV-Spektroskopie durchgeführt.

Für die Radiomarkierung werden 5 nmol aus der zuvor hergestellten Stock Lösung benötigt. Dies entspricht 10 μl DOTATATE.

Radiomarkierung:

Das System (Eckert & Ziegler Modular Lab PharmTracer) läuft vollständig automatisch ab und muss lediglich für jede Radiomarkierung neu bestückt werden. Da hier mit Radioaktivität gearbeitet wird, muss neben dem Strahlenschutz auf die Arbeitssicherheit sowie auf die Sicherheit und Funktionstüchtigkeit des Moduls geachtet werden, um ein mögliches Austreten von radioaktiven Stoffen aus den Reaktionsgefäßen und daraus folgenden Kontaminationen zu vermeiden.

Die Radiomarkierung läuft über eine Kassette (Eckert & Ziegler Modular Lab PharmTracer Cassettes C4-GA68 -AFPP) [19], ein System, an welchem automatisch die einzelnen Reaktionspartner nach einem Protokoll über Pumpen und Schläuchen zusammengefügt werden.

Im Mittelpunkt steht der $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generator, aus dem das Tochternuklid ^{68}Ga mittels 0.1 molarer HCL eluiert wird. Da dieses nicht in Reinform aus dem Generator eluiert, und noch neben ^{68}Ge andere Metalle mit heraus eluiert werden, wird das radioaktive ^{68}Ga durch eine N₂-Säule aufgetrennt. Lediglich das ^{68}Ga wird auf der N₂-Säule zurückgehalten und mit einem N₂-Puffer (für 50 mL der N₂-Lösung bestehend aus: 83,5 μL 37% HCl, 1,14 mL H₂O aufgefüllt auf 50 mL mit Aceton) im weiteren Verlauf von der Säule gelöst, während die anderen ungewollten Stoffe nicht zurückgehalten werden, abgetrennt werden und in den Wastebehälter geleitet werden.

In einem Reaktionsgefäß wurden 750 μL eines 1 M HEPES Puffer pH=4, 300 μL H₂O sowie 5 nmol (10 μL) des nicht-gelabelten DOTATATE vorgelegt.

Weiterhin wird ein Produktgefäß für das gelabelte Produkt bereitgestellt, ein 50 mL NaCl-Fläschchen. Außerdem 20 mL einer 50% EtOH Lösung. Der N₂-Elutionspuffer wird ebenfalls vorbereitet (3 ml), sowie eine Abfall-Flasche.

Das [^{68}Ga] Ga^{3+} wird in das Reaktionsgefäß überführt und ca. 30 Min. bei 95°C erhitzt. Durch diesen Schritt wird ^{68}Ga im DOTA Komplex eingefangen (s. Abb.11). Außerdem werden

dadurch die eingesetzten Lösungsmittel abgedampft, die für die in vivo bzw in vitro Versuche schädlich für die Zellen wären.

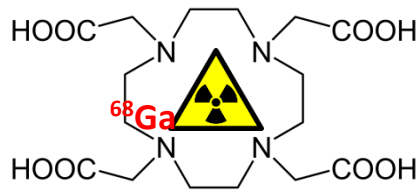


Abb.11 Durch den Heizvorgang wird ^{68}Ga im Chelator komplexiert

Im einem nächsten Schritt wird das gelabelte Produkt auf einer C18-Säule von freier Aktivität und anderen Verunreinigungen abgetrennt, schließlich von der Säule gespült und im Produktgefäß aufgefangen.

Nachfolgende Abb.12 veranschaulicht den Aufbau der Kassette

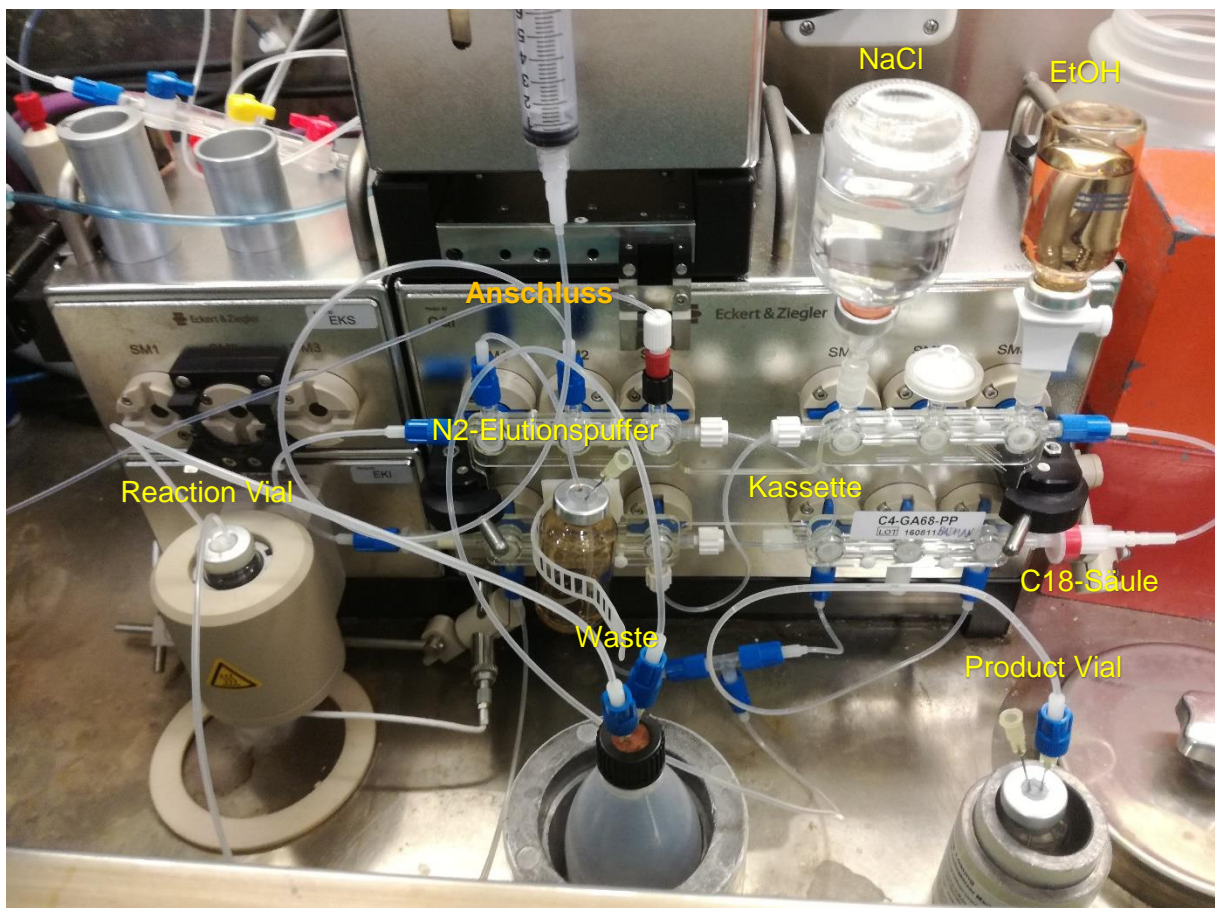


Abb.12: Synthesekassette für die Radiomarkierung angeschlossen am Modular Lab PharmTracer von Eckert & Ziegler

Im weiteren Verlauf wird die spezifische Aktivität pro μmol des gelabelten Produkts gemessen. Eine nachfolgende HPLC zur Bestimmung der radiochemischen Reinheit dient der Überprüfung der Radiomarkierung.

Weiterhin wird ein Serumstabilitätstest in humanem Serum durchgeführt, sowie der $\log D$ -Wert zur Überprüfung der Lipophilie bzw. Hydrophilie des gelabelten ^{68}Ga durchgeführt.

Ein zu niedriger Wert zeigt eine hohe Hydrophilie des Produkts auf, während ein Wert > 0 darauf hinweist, dass das Produkt lipophil ist. Mit diesem Experiment kann abgeschätzt werden, ob das spätere Medikament möglicherweise in der Leber gespeichert bzw. verstoffwechselt wird, oder ob es durch seine hydrophilen Eigenschaften durch die Nieren wieder ausgeschieden wird. Aufgrund der Biologie der Leber werden lipophile Stoffe relativ lange in der Leber retentiert, bevor sie weiterverarbeitet bzw. ausgeschieden werden.

ii. Radiomarkierung mit ^{177}Lu

DOTATATE kann ebenso mit ^{177}Lu markiert werden. Als Betastrahler hat ^{177}Lu geringe Reichweiten von nur wenigen Millimetern, welches von Vorteil ist, da gesundes Gewebe bei einer Therapie weitestgehend dadurch verschont bleibt. ^{177}Lu wird in einen der wenigen weltweit existierenden Forschungs-Neutronenquellen an der TU München hergestellt. Aus der Bestrahlung von Ytterbium-176 (^{176}Yb) mit Neutronen entsteht ein sehr kurzlebige Nuklid ^{177}Yb , das schnell zu ^{177}Lu zerfällt. Das entstehende, und in seinen chemischen Eigenschaften, ähnliche Produktgemisch aus Ytterbium und Lutetium muss anschließend aufgereinigt werden. Dies geschieht mittels einer Kombination aus Komplexbildner und Säulenharz. Die Firma ITG (Isotope Technologies Garching) ist für die Aufreinigung des ^{177}Lu mittels oben genannten Methoden unter GMP konformen Bedingungen zuständig, bevor es dann an die Kliniken verschickt wird. Anschließend erfolgt vor Ort in abgeschirmten Schutzzellen, den sog. Heißzellen, die Radiomarkierung mit dem jeweiligen Peptid [20].

Für die Radiomarkierung mit DOTATATE werden

50 μL 50mM HEPES-Puffer

20-30 MBq ^{177}Lu

1 nmol DOTATATE

in ein Eppendorfgefäß pipettiert und in einem Heizblock bei 95°C ca. 15 min. geheizt. Je nach gewünschter spezifischer Aktivität kann eine größere Stoffmenge an DOTATATE verwendet werden, oder auch mehr ^{177}Lu . Mehr als 30 MBq pro nmol sollten jedoch nicht verwendet werden, da sonst eine Übersättigung erreicht ist, und sich an der anschließenden Qualitätskontrolle freie, ungebundene Aktivität wiederfindet.

iii. Markierung mit $^{69/71}\text{Ga}$

Nachfolgende Markierungsmethode ist eine nichtradioaktive Markierung und wird daher im Gegensatz zur radioaktiven „heißen“ Markierung auch als „Kaltmarkierung“ bezeichnet. Dabei wird das Peptid, DOTATATE, mit einer $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ -Lösung „kalt“ markiert. Das Markierungsprotokoll ähnelt dem der „heißen“ Markierung. Kalte Markierungen werden durchgeführt, um entweder die Verdünnungsreihe für den Kompetitor im IC_{50} zu machen, oder um eine Heißmarkierung zusätzlich mit $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ abzusättigen.

logD-Wert Bestimmung:

Es werden aus einer 100 nM Radiotracer-Stammlösung (physiologische Kochsalzlösung) 10 μL Radiotracer entnommen und 10-fach verdünnt. 8 leere Gamma-Counter-Gläser (4 x für PBS + 4 x für Octanol) werden mit 4 Eppendorfgefäßen vorbereitet. In jeden Epi werden 500 μL n-Octanol + 490 μL PBS vorgelegt. Im Anschluss an die Radiomarkierung werden 10 μL des 1:10 verdünnten Radiotracers in die 4 vorgelegten Epis hinzugefügt. Alle Epis werden in gleichem zeitlichem Abstand ca. 1 Stunde gevortext, um ein Equilibrium zu erreichen, und anschließend 90 Sek. bei 13000 rpm zentrifugiert. n-Octanol befindet sich nach der Zentrifugation mit $\delta = 0,817 \text{ g/cm}^3$ in der oberen Phase, während PBS in der unteren Phase ist. Aus den beiden Phasen werden je 100 μL n-Octanol bzw. PBS in die vorgelegten Reagenz- bzw. Gamma-Counter-Gläser gegeben. Abschließend werden die Reagenz- bzw. Gamma-Counter-Gläser in den Gamma-Counter gegeben und die Messung durchführen.

Die Berechnung des logD wird mit folgender Formel bestimmt:

$$\log D = \log\left(\frac{\text{counts}_{n\text{-Octanol}}}{\text{counts}_{\text{PBS}}}\right)$$

Im konkreten Fall wurde ein logD-Wert von -4,045 nach doppelter Durchführung bestimmt. Dies weist auf den hohen hydrophilen Charakter des DOTATATE hin.

Serumstabilität:

Es werden 450 µL humanes Serum (auf 37 °C vorgewärmt) in ein Eppendorfgefäß vorgelegt. Dazu kommen 50 µL des radiomarkierten Tracers. Das Eppendorfgefäß wird nachfolgend bei 37°C inkubiert.

Man entnimmt nun zu folgenden Zeitpunkten je 100 µL aus dem Serum:

- 1) 60 min
- 2) 90 min
- 3) 120 min

Die 100 µl werden jeweils in einen VIVACON Filter (30000 MWCO) gegeben und bei 13000 rpm für 5 Minuten in der Zentrifuge abzentrifugiert. MWCO bezeichnet die Retention angegebener Molekülgrößen in Dalton, die durch einen Filter bzw. einer Membran zurückgehalten werden (Molecular weight cut off). In diesem Fall hält der Filter Molekülgrößen bis 30 kDa zurück. Das Eluat wird nach der Zentrifugation mittels HPLC gemessen.

Nachfolgende Abb. zeigt eine analytische HPLC, nach dem Serumstabilitätstest bei ca. 2 Stunden.

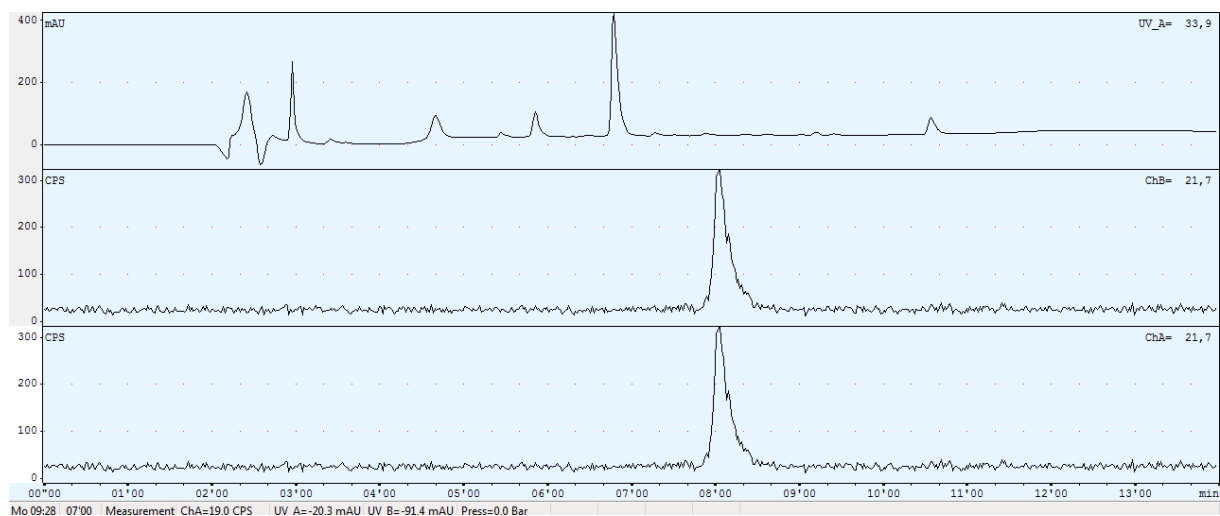


Abb13: Serumstabilität nach 2 Stunden, analytische HPLC Aufnahme

Klar zu erkennen, ist ein abgrenzbarer Peak im CPS Fenster (Gammastrahlung) bei ca. 8:02 Minuten. Ein Verdau würde sich durch weitere Peaks erkenntlich machen.

e. Zellkulturassays

i. Saturation Binding Assay

Der Saturation Binding Assay ist eine präklinische Charakterisierungsmethode zur Überprüfung der spezifischen Bindung an den gewünschten Rezeptor, und zur Ermittlung der Affinität der Substanz. Dabei wird auf die Zelllinie Hek-hsst2 in aufsteigender Konzentration das gelabelte ^{68}Ga -DOTATATE hinzugegeben und das Bindungsverhalten der Substanz zum Rezeptor untersucht. Die Zellen werden in Dubelcco's Modified Eagle Medium (DMEM), zugesetzt mit 10 % FBS, 5 % Penicillin/Streptomycin und 1 % Geneticin in einem Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ in einer T-175 Zellkulturflasche kultiviert.

Der Zellkulturassay benötigt einen Tag zur Versuchsvorbereitung, und einen Tag zur Versuchsdurchführung.

Am Tag der Versuchsvorbereitung müssen zehn 6-Well Plates mit je 10⁶ Zellen in jedem Well vorbereitet werden. Dafür werden die 6-Well-Plates mit Poly-L-Lysin zur besseren Adhäsion beschichtet. Je 1 mL einer 1:10 mit H₂O verdünnten Poly-L-Lysin Lösung werden für 30 min. bei Raumtemperatur in jedes Well gegeben und anschließend wieder abgesaugt. Die Wells werden dann jeweils mit 1ml H₂O sorgsam gespült.

Aus einer vollen Zellkulturflasche müssen mindestens 60x10⁶ Zellen entnommen werden, da insgesamt 60 Wells mit je 10⁶ Zellen benötigt werden. Dazu wird die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen werden zuvor vorsichtig mit 5 mL 1x-PBS gewaschen und anschließend mit 2 mL Trypsin vom Boden der Flasche abgelöst. Nach Zugabe des Trypsins wird die Platte 5 min bei 37° inkubiert. Nach der Inkubation folgt die Zugabe von 8 mL Zellmedium mit dem die gelösten Zellen gut resuspendiert werden. Anschließend wird das Gesamtvolumen von 10 mL in ein 50 mL Falcon überführt.

In die beschichteten Wells wird jeweils 1 mL Zellmedium vorgelegt. Als nächstes kommen in jedes Well standardmäßig 10⁶ Zellen. Zum Schluss wird das Endvolumen in jedem Well auf 2 mL erhöht. Nach Vorbereitung der 6-Well Plates werden diese über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Folgende Konzentrationen werden benötigt:

1nM, 2,5nM, 5nM, 7,5nM, 10nM, 25nM, 50nM, 75nM, 100nM

Für jede Konzentration werden 15 Reagenzgläser benötigt:

- 6 für den PBS Waschschrift, darunter
 - o 3 für PBS-f (ungebundenen Peptid)
 - o 3 für PBS-B (ungebundenen Peptid + Blocking)

- 6 für den Lysierungswaschschritt, darunter
 - o 3 für NaOH-f (gebundenes Peptid, spezifische Aktivität)
 - o 3 für NaOH-B (gebundenes Peptid + Blocking, unspezifische Aktivität)
- 3 weitere Reagenzgläser werden für den Standard der jeweiligen Konzentration benötigt.

Diese Reagenzgläser werden für den Gamma-Counter benötigt, der zum Schluss die Counts in den einzelnen Gläsern registriert.

Die Verdünnungsreihe des ^{68}Ga -DOTATATE, dessen Verdünnungen am Versuchstag auf die verschiedenen Platten gegeben werden, kann ebenfalls schon am Vortag vorgelegt werden. Dabei wird wie in untenstehender Tabelle vorgegangen.

Tab.3. Verdünnungsreihe für den Saturation Binding Assay

Konzentration	NaCl	Stammlösung	Gefäß
1000 nM	Hier werden direkt 100 µl des Labelings in die Wells pipettiert		
750 nM	375 µl	1125 µl	Glasvial
500 nM	750 µl	750 µl	Glasvial
250 nM	1125 µl	375 µl	Glasvial
100 nM	1350 µl	150 µl	Glasvial
75 nM	900 µl	100 µl aus dem 750nM-Stock	Epi
50 nM	900 µl	100 µl aus dem 500nM-Stock	Epi
25 nM	900 µl	100 µl aus dem 250nM-Stock	Epi
10 nM	900 µl	100 µl aus dem 100nM-Stock	Epi

Am Versuchstag wird das alte Medium abgesaugt und 0,8 mL frisches Medium in die einzelnen Wells gegeben. Anschließend lässt man die Zellen ca. 1 Stunde in dem neuem Medium im Brutschrank bei 37°/ 5 % CO₂ equilibrieren.

In dieser Zeit wird die zu untersuchende Verbindung radiomarkiert (hier: ^{68}Ga -DOTATATE). 20 nmol DOTATATE werden hierbei standardmäßig über das halbautomatische Kassettenverfahren gelabelt. Dieses wird auf 20 mL aufgefüllt, um eine Konzentration von 1 nmol pro mL zu erhalten.

- 1.) Ebenfalls muss eine Blockierlösung bereitstehen. Benötigt wird eine Substanz, die ebenso wie das DOTATATE an die SST-2 Rezeptoren bindet. Die hergestellte Stocklösung sollte eine Konzentration zwischen 10-30 µM haben. Diese wird in einer gleichbleibenden Konzentration, aber in einem Überschuss zum Binder hinzugegeben. Während anfänglich 15 µM NODAGA-LM3 für die ersten beiden

Assay benutzt wurden, musste aus logistischen Gründen auf CR3N umgestiegen werden. Beides sind DOTATATE-Analoga.

Nach dem Equilibrieren des Mediums wird wie folgt pipettiert:

- 1.) In die oberen drei Wells der Platten werden je 100 μ l PBS pipettiert.
- 2.) In die unteren drei Wells der Platten werden je 100 μ l der Blockinglösung pipettiert.
- 3.) Gleich danach gibt man in jedes Well die 100 μ l der jeweiligen vorbereiteten Stocklösung aus der Verdünnungsreihe auf die Platte

Das Endvolumen in jedem Well beträgt nun 1 ml. Zur Veranschaulichung des Pipettierschemas auf die Platten siehe untenstehende Abbildung.

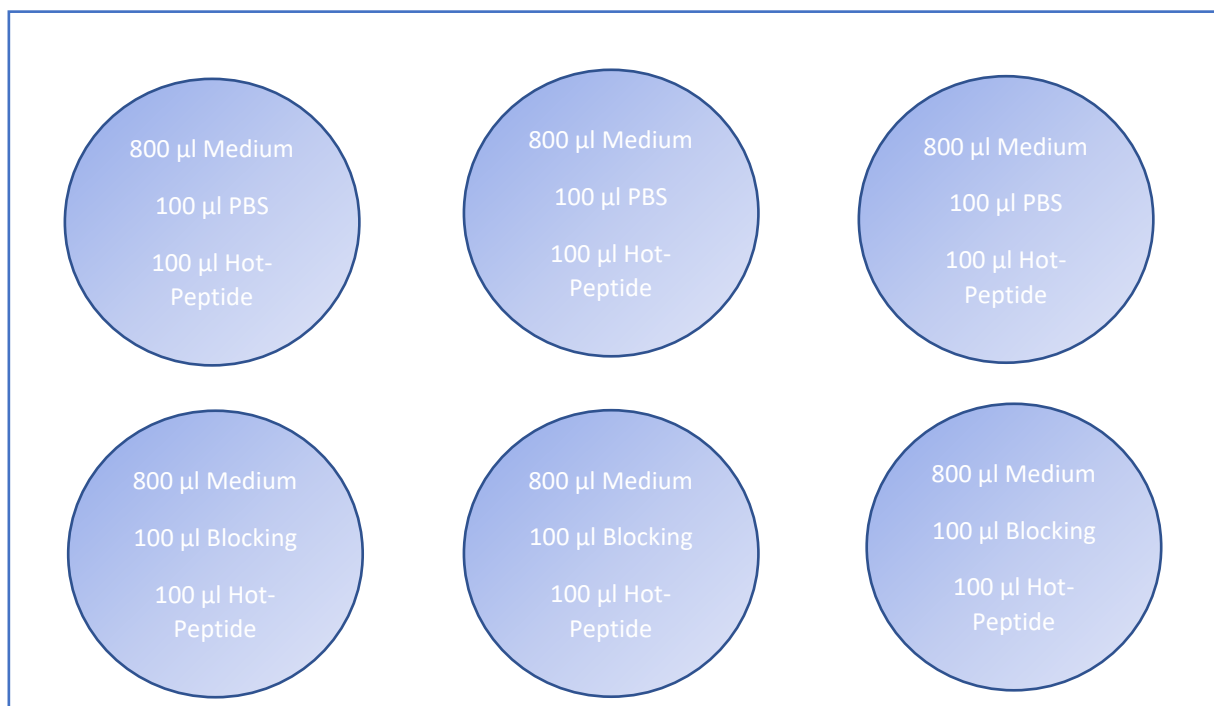


Abb.14. Pipettierschema des Saturation Binding Assay

Nach Zugabe der Aktivität werden die Platten bei 4°C 2 Stunden inkubiert.

Während der 2 Stunden Inkubation wird die Zellzahl auf der übrig gebliebenen Platte bestimmt. Dazu wird das Zellmedium der Zählplatte abgesaugt, und die Wells einmal mit PBS gespült. Nachfolgend werden 300 µl Trypsin in die oberen 3 Wells gegeben, und für 5 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation werden 700 µl Medium in die Wells hinzugegeben, die Zellen gut resuspendiert, und alles in einem Well zusammengeführt. Aus der gut resuspendierten Zellsuspension entnimmt man 10 µl und gibt dieses in ein Reaktionsgefäß, in welchem schon 80 µl PBS und 10 µl Trypan Blue vorgegeben wurden. Aus diesen Verdünnungen werden 10 µl entnommen und in die Neubauer-Zählkammer gegeben. Anschließend wird die Zellzahl bestimmt und folgendermaßen hochgerechnet:

$(\text{Durchschnittliche Zellzahl}) * 10(\text{Verdünnungsfaktor}) * 10^5 (\text{pro ml}) = \text{Zellzahl}$

Nach der Zellzahlbestimmung wird das PBS auf Eis gestellt.

Nach den 2 Stunden Inkubation auf Eis werden die Platten folgendermaßen pipettiert:

- 1.) Abnehmen des Medium aus den Wells und Überführung in die entsprechenden Gamma-Counter Röhren. Anschließend wird zweimal vorsichtig mit je 1 ml kaltem PBS gewaschen, um ungebundenes Peptid zu entfernen. Auch dieses wird in die entsprechenden Röhren gegeben. (PBS-f & PBS-B)

Nach den Waschschritten wird immer in jedes Well 1 ml 0.3 M NaOH gegeben um die Zellen zu lysieren und das Blocking zu stoppen.

- 2.) Nun werden die NaOH- Waschschrritte durchgeführt. Jeweils 3-mal wäscht man jedes Well mit dem vorher zugegeben 1 ml pro Well gründlich, und überführt diesen wieder in die dazugehörigen Reagenzgläser. Dabei handelt es sich hier um die an die Zelle gebundene Aktivität, bzw um die gebundene Aktivität und Blocking.

Als letzter Schritt werden die Proben in den Gamma-Counter zur Auswertung gegeben. Dafür wird zu allererst das Programm für das zu untersuchende Radionuklid ausgewählt. Im Anschluss wird der Gamma Counter beginnend mit der geringsten Konzentration wie folgt beladen:

- 1.) 3 leere Tubes als Kontrolle des Backgrounds
- 2.) 3 Standards der jeweiligen Konzentration
- 3.) 3 Röhren der jeweiligen Konzentration PBS-f (ungebundenes Peptid)
- 4.) 3 Röhren der jeweiligen Konzentration PBS-B (ungebundenes Peptid+ Blocking)
- 5.) 3 Röhren der jeweiligen Konzentration NaOH (gebundenes Peptid)
- 6.) 3 Röhren der jeweiligen Konzentration NaOH-B (gebundenes Peptid+ Blocking)

ii. IC₅₀-Bestimmung mittels Vakuum-Puncher

Der IC₅₀-Wert gibt die mittlere inhibitorische Konzentration eines Inhibitors an. Hierbei wird eine halbmaximale Inhibition beobachtet. Dabei findet eine Kompetition zwischen einem Binder und dessen Inhibitor statt. Der IC₅₀-Wert wird in der Pharmakologie dazu verwendet, die Wirkstärke eines Antagonisten zu bestimmen und ist nach entsprechender Umrechnung (siehe Formel) vergleichbar mit dem EC₅₀-Wert bzw. K_D-Wert. In diesem Versuch kommt das radioaktive ⁶⁸Ga-DOTATATE jeweils in gleicher geringer Konzentration auf die Platte während ein Kompetitor, in diesem Fall kalt gelabeltes, nicht radioaktives ^{69/71}Ga-DOTATATE in einer aufsteigenden Verdünnungsreihe als Kompetitor ebenfalls auf die Zellen kommt.

Zur Bestimmung des IC₅₀ kann folgende Formel angewendet werden:

$$IC_{50} = \left(1 + \frac{[S]}{K_i} \right) * K_D$$

Dabei ist

[S] = Substratkonzentration

K_i = Dissoziationskonstante Inhibitor

K_D = Dissoziationskonstante

Am Tag vor dem Versuchstag:

- Gamma-Counter Röhren beschriften und vorbereiten:
 - o Pro Konzentration ergeben sich 8 Röhren, da eine 8-fach Bestimmung durchgeführt wird.

Die Konzentrationen sind wie folgt zu beschriften:

0 nM; 0,25 nM; 0,5 nM; 0,75 nM; 1 nM; 2,5nM; 5nM; 10nM; 50nM; 100nM; 500nM; 1000nM;
5000nM

- Herstellung der kalten, nicht radioaktiven $^{69/71}\text{Ga}$ -Lösung:

Dazu werden 50 nmol DOTATATE mit 1 mol eq. $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ nach dem folgenden Schema in einem Eppendorfgefäß markiert:

50 nmol DOTATATE (100 μl) bei 2 $\mu\text{l} \cong 1$ nmol

50 nmol $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ (257 μl) bei 5,14 $\mu\text{l} \cong 1$ nmol

0,5 M HEPES-Puffer pH=4 (642,5 μl)

Das Reaktionsgemisch wird 15 min. bei 95° geheizt. Es erfolgt keine Aufreinigung über eine C18-Säule. Wichtig ist nur ein Endvolumen des Reaktionsprodukts von 1mL. Je nach Konzentration können die Maßangaben variieren. Wichtig ist, dass die angesetzte $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ -Lösung pH= 4 besitzt, um ein Ausfällen von unlöslichem Galliumhydroxid zu vermeiden. Im Folgenden wird dies als die Stammlösung bezeichnet, welche in die Verdünnungsreihe gegeben wird.

- Ebenfalls kann am Vortag die Verdünnungsreihe vorbereitet werden, in der wie folgt PBS vorgelegt wird. Die Verdünnungsreihe bezieht sich auf das kalte $^{69/71}\text{Ga}$ -DOTATATE

Es wird wie in Tab.4 wird vorgegangen:

Tab.4: Verdünnungsreihe des „kalten“ DOTATATE

Vial N°	Volumen	Konzentration	Endkonz im Well
1	800 μl Stammlsg. + 1200 μl PBS	20 μM	5 μM
2	160 μl Stammlsg. + 18480 μl PBS	4 μM	1 μM
3	100 μl (aus Stock 1) + 900 μl PBS	2 μM	500 nM
4	100 μl (aus Stock 2) + 900 μl PBS	400 nM	100 nM
5	50 μl (aus Stock 2) + 950 μl PBS	200 nM	50 nM
6	20 μl (aus Stock 2) + 980 μl PBS	40 nM	10 nM
7	500 μl (aus Stock 6) + 500 μl PBS	20 nM	5 nM
8	250 μl (aus Stock 6) + 750 μl PBS	10 nM	2,5 nM
9	100 μl (aus Stock 6) + 900 μl PBS	4 nM	1 nM
10	50 μl (aus Stock 6) + 950 μl PBS	2 nM	0,5 nM
11	25 μl (aus Stock 6) + 975 μl PBS	1 nM	0,25 nM
12	1000 μl PBS	0 nM	0 nM

Nach Fertigstellung der Verdünnungsreihe des Kompetitors, wird aus den Vials 1,2 und 6 jeweils ein 1mL entnommen, und in ein neues Vial überführt. Dies dient der Einhaltung der Konzentrationsfolge.

Die Verdünnungsreihe kann dann über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen werden.

Am Versuchstag:

- In jedes Well einer 96-Well Platte des „MultiScreen_{HTS}“ wird 300 µl Zellmedium pipettiert. Dies dient der Absättigung möglicher vorhandener unspezifischer Bindungsstellen in den Wells. Die Platte wird so 1-2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.
- In dieser Zeit kann die „heiße“ Radiotracer-Lösung gelabelt werden. Im Falle von ⁶⁸Ga werden 20 nmol DOTATATE über die halbautomatische Kassettensynthese gelabelt (s. dazu „Radiomarkierung von DOTATATE“)

Das Produkt wird entnommen und mit physiologischer NaCl-Lsg. auf 20 ml aufgefüllt, sodass 1nmol in einem mL vorhanden sind (1000nM).

Die 1000nM Lösung wird auf die gewünschte Konzentration verdünnt, die man nachfolgend auf die Zellen geben möchte. Diese sollte bei 2-5 nM liegen. Das PBS dient als Puffer und wird zur pH-Wert Stabilisierung benutzt.

Im Falle einer Markierung mit ¹⁷⁷Lu wird wie folgt vorgegangen:

Es wird eine Markierung mit 1nmol DOTATATE durchgeführt. Dazu benötigt man 50µl 50mM HEPES Puffer (pH =7), 25 MBq [¹⁷⁷Lu]LuCl₃ (5-10 µl) und 1nmol DOTATATE, idealerweise in 2-4 µl. Das Reaktionsgemisch wird bei 95°C 15 min in einem Eppendorfgefäß im Heizblock geheizt, und anschließend in ein 50mL Falcon mit 50mL PBS überführt.

Aus dem gelabelten Produkt entnimmt man außerdem eine Probe für eine analytische HPLC und untersucht vor allem, ob freie ungebundene Aktivität vorhanden ist. Diese äußert sich in einem Vorpeak.

Sofern die analytische HPLC eine erfolgreiche Markierung (Radiochemische Ausbeute > 95%) bestätigt, pipettiert man in die angesetzte Verdünnungsreihe des Vortags jeweils 1 ml des heißen Radioliganden ⁶⁸Ga-DOTATATE, bzw ¹⁷⁷Lu-DOTATATE hinzu, sodass in jedem Vial eine gleiche Konzentration des Heißliganden vorhanden ist.

- Als nächstes werden die Zellen trypsinisiert und gezählt. Hierfür wird das alte Medium abgesaugt, 2 mL Trypsin in die Flasche gegeben und 5 min. bei 37°C im Inkubator inkubiert. Anschließend gibt man in die Flasche 8ml Medium hinzu und resuspendiert die Zellen, bevor diese in ein 50 mL Falcon überführt werden.

Pro Well werden 100.000 Zellen benötigt. Dies entspricht 1×10^7 Zellen pro Platte. Um sicher zu gehen, genug Zellen zu verwenden, werden $1,5 \times 10^7$ Zellen in ein anderes 50 mL Falcon überführt und zentrifugiert (bei 1200 rpm, 3 min). Der Überstand wird verworfen und 7,5 mL Medium hinzugegeben, sodass in 50 μ L 100.000 Zellen vorhanden sind.

- Nach Inkubation des Zellmedium in der 96-Well Platte, die je 200 μ L Zellmedium unter Vakuum absaugen und die Wells 3-mal mit 200 μ L PBS mittels einer Multipipette waschen.
- Im nächsten Schritt werden je 50 μ L Zellen in die einzelnen Wells gegeben.
- Anschließend kommen 50 μ L des Gemischs aus kaltem und heißem Radioligand in die entsprechende Reihe der Platte. Pro Verdünnung wird eine 8-fach Bestimmung durchgeführt.
- Aus dem Rest 3 verschiedener Vials werden 50 μ L für den Standard entnommen und in Gamma Counter Röhren pipettiert.
- Die fertig pipettierte Platte wird nun bei 4°C, 2h im Kühlschrank auf einem Schwenkrüttler inkubiert.
- Nach der Inkubation werden die Wells wieder mittels Vakuumpumpe abgesaugt. Die Zellen mit der gebundenen Aktivität bleiben dabei im Filter zurück. Anschließend wird die Platte 3-mal mit 200 μ L PBS gewaschen. Dies dient der Entfernung der ungebundenen Aktivität.
- Nun können die einzelnen zellbesetzten Filter mit der gebundenen Aktivität der 96-Well Platte mittels Puncher (MerckMilipore, Multiscreen®Punch) in die einzelnen entsprechend beschrifteten Gamma-Counter Röhren ausgestanzt werden.

Der Gamma Counter wird zum Schluss wie folgt beladen:

1. 2 leere Tubes für den Background
2. Die 3 Standards (je 50 μ l des Tracers)
3. Die 8 Röhrrchen mit 0 nM (entspricht der Konkurrenz gegen PBS)
4. Die 8 Röhrrchen mit 0,25 nM
5. Die 8 Röhrrchen mit 0,5 nM
6. Die 8 Röhrrchen mit 1 nM
7. Die 8 Röhrrchen mit 2,5 nM
8. Die 8 Röhrrchen mit 5 nM
9. Die 8 Röhrrchen mit 10 nM
10. Die 8 Röhrrchen mit 50 nM
11. Die 8 Röhrrchen mit 100 nM
12. Die 8 Röhrrchen mit 500 nM
13. Die 8 Röhrrchen mit 1000 nM

Zwischen den einzelnen Konzentrationen kommt zusätzlich immer ein Blank.



Abb.15: 96-Well Plate von Millipore mit 8 mal 12 Messpunkten. Die Platte ist auf die angeschlossene Absaugeinheit aufgelegt, bestehend aus einer Vakuumpumpe, einem Auffangbehälter und Schläuchen. Während des Absaugvorgangs wird der Inhalt der Wells durch die Filter in das untenstehende Behältnis abgesaugt. Die Zellen werden durch die Filter retentiert.

7. Ergebnisse

Saturation Binding Experimente

Insgesamt wurden 8 Saturation Binding Experimente durchgeführt. Dabei wurde der Fragestellung nachgegangen, ob eine nachträgliche kalte Nachmarkierung des heißen Radioliganden einen Effekt auf die Bindung zum Rezeptor hat. Zusätzlich sollte herausgefunden werden, ob es einen Unterschied zwischen manueller Synthese und einer Radiomarkierung über die automatisierte Kassettensynthese gibt.

Drei Experimente wurden ohne „Kaltmarkierung“ durchgeführt und vier mit nachträglicher Kaltmarkierung, wobei von diesen nur 3 vergleichbar abgelaufene Versuche in die Auswertung fließen. Nachfolgende Tabelle soll einen Überblick über die Experimente geben.

Ein zusätzlicher *Saturation Binding* diente der Testung einer neuen Verbindung, um einen Vergleich gegenüber des Standards DOTATATE zu erstreben. Getestet wurde CR2N, ein DOTATATE-Analogon.

Tab.5. Übersicht der Saturation Binding Experimente

N°	Stoffmenge, Aktivität, Art der Markierung	Spez. Aktivität	Zellzahl pro Well	Kalt Markierung	Blocking
1	20nmol, 165 MBq	8,25 GBq/μm	1,75 *10 ⁶	2 eq Ga(NO ₃) ₃	NODAGA-LM3 15μM
2	20nmol, 280 MBq, Handmarkierung	14 GBq/μm	0,70 *10 ⁶	-	NODAGA-LM3 15μM
3	20nmol, 267 MBq, Handmarkierung	13,4 GBq/μm	0,80 *10 ⁶	-	CR3N, 25 μM
4	20nmol, 274 MBq, Handmarkierung	13,7 GBq/μm	1,05 *10 ⁶	-	CR3N, 25 μM
5	20nmol, 244 MBq, Kassettensynthese	12,2 GBq/μm	1,2 *10 ⁶	Equimolar GaNO ₃	CR3N, 25 μM
6	20nmol, 111 MBq, Kassettensynthese	5,6 GBq/μm	0,95 *10 ⁶	Equimolar GaNO ₃	CR3N, 25 μM
7	20nmol, 300 MBq, Handmarkierung	15 GBq/μm	1,25 *10 ⁶	Equimolar GaNO ₃	CR3N, 25 μM

Als 8. Saturation Binding wurde eine neue Verbindung getestet. CR2N ist wie das DOTATATE aufgebaut, jedoch ist die AS an der Stelle des Phenylalanins durch Naphtylalanin ausgetauscht. Als Blocking wurde hier ebenfalls CR3N, 25 μM genommen. Die Radiomarkierung erfolgte ohne nachträgliche Kaltmarkierung mit 20 nmol und einer Ausbeute von 270 MBq.

Auswertbar war dieses Experiment aufgrund einer geringen Menge an gebundener Aktivität und eines Bindungseinbruchs nicht. CR2N wurde im weiteren Verlauf nicht mehr berücksichtigt.

Nachfolgend ist eine Übersicht über die Ergebnisse der K_D -Werte aufgelistet.

Tab.6. Übersicht über die Ergebnisse der Saturation Binding Experimente

N°		EC50 (K_D -Wert)	Mittelwert
1	mit Kaltmarkierung + Aufreinigung über C18, Handmarkierung	14,44	
2	ohne Kaltmarkierung, Handmarkierung	28,68	31,77 ±
3	ohne Kaltmarkierung, Handmarkierung	29,82	4,4
4	ohne Kaltmarkierung, Handmarkierung	36,81	
5	mit Kaltmarkierung, Kassettsynthese	54,79	46,25 ±
6	mit Kaltmarkierung, Kassettsynthese	50,24	11,09
7	mit Kaltmarkierung, Handmarkierung	33,71	

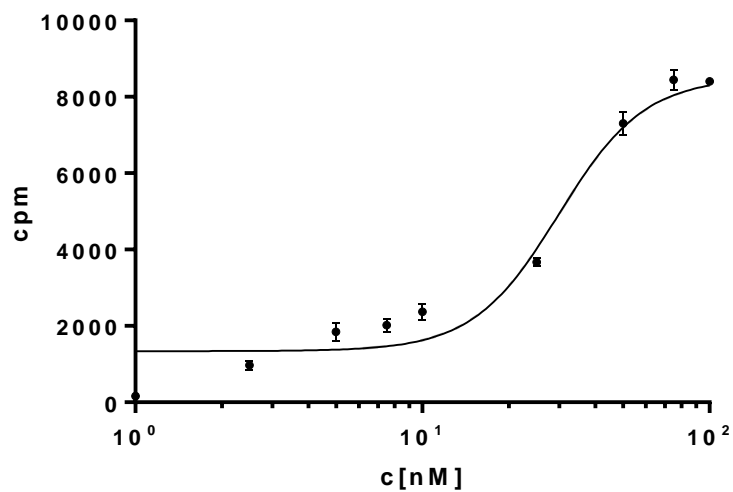
Zur Auswertung wurden die Experimente 2-7 verwendet in der $n = 3$ jeweils mit und ohne nachträgliche Kaltmarkierung ist. Die Mittelwerte der jeweiligen 2 Gruppen ohne und mit Kaltmarkierung wurden durch ein Zweistichproben-Student's-t-Test auf ihre statistische Signifikanz untersucht.

Der ermittelte p-Wert von 0,1 des t-Tests deutet daraufhin, dass statistisch gesehen, kein signifikanter Unterschied besteht, wenn der heiße Radiotracer direkt nach der Radiomarkierung nochmals „kalt“ nachmarkiert wird, um die offenen Bindungsstellen abzusättigen. Nach den vorliegenden Werten deutet eine kalte Nachmarkierung eher auf eine Verschlechterung des K_D -Wertes hin als auf eine Besserung.

In Bezug auf die Frage, ob eine Kassetten- oder Handsynthese einen Unterschied auf den K_D -Wert ergibt, zeigt sich, dass die Versuche N°5 & 6 einen viel höheren K_D -Wert aufweisen. Eine Kassettensynthese scheint den K_D -Wert im vorliegenden Fall eher zu verschlechtern, wenn man dies mit dem 7. Wert vergleicht, der einen weitaus besseren und niedrigeren K_D -Wert besitzt.

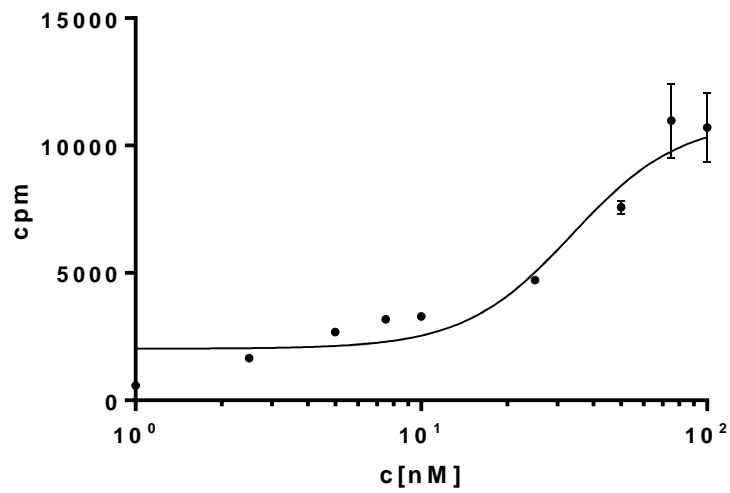
Der 7. Wert ähnelt den der Gruppe ohne „Kaltmarkierung“.

Die Auswertungen erfolgten auch hier mittels GraphPad Prism. Nachfolgende Abbildungen zeigen einen Ausschnitt der Ergebnisse der Sättigungskinetik. Die weiteren Ergebnisse sind dem Anhang zu entnehmen.



	Specific uptake
Sigmoidal dose-response (variable slope)	
Best-fit values	
Bottom	1340
Top	= 8500
LogEC50	1.475
HillSlope	2.912
EC50	29.82

Abb.16: Versuch N°3, ohne Kaltmarkierung. Zu sehen ist der signifikante exponentielle Anstieg in der Bindung, bevor dieser in einer Sättigung sein Plateau erreicht. Die Bindung steigt nur unwesentlich bei Konzentrationen bis zu 101 nM.



	Specific uptake
Sigmoidal dose-response (variable slope)	
Best-fit values	
Bottom	2027
Top	= 11000
LogEC50	1.528
HillSlope	2.304
EC50	33.71

Abb.17: Versuch N°7: mit Kaltmarkierung. Auch hier erkennbar ein Anstieg der Bindung um 10^1 nM und anschließende Plateaubildung bei Konzentrationen um 10^2 nM. Der daraus resultierende EC-50 (K_D -Wert) liegt bei 33,71.

Die weiteren Ergebnisse sind dem Anhang zu entnehmen.

IC50-Experimente

Ziel bei den IC50 Experimente war es, ein Protokoll zu etablieren, welches reproduzierbare Ergebnisse erbringt. Dabei wurden verschiedene Parameter im Versuchsablauf verändert. Diese sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Tab.7: Übersicht über die IC50 Experimente

N°	Radionuklid	Konzentration(c)	IC50	Ergebnis	Ablauf
1	⁶⁸ Ga	0,4 nM	-	Nicht auswertbar	1h Inkubation
2	⁶⁸ Ga	0,8 nM	-	Nicht auswertbar	1h Inkubation, optimierter Ablauf
3	⁶⁸ Ga	2,0 nM	8,5	wenig Detektion, jedoch auswertbar	1h Inkubation
4	¹⁷⁷ Lu	0,8 nM	-	Nicht auswertbar	1h Inkubation
5	¹⁷⁷ Lu	2,0 nM	3,2	Detektierbar	2 Inkubation
6	¹⁷⁷ Lu	5,0 nM	7,4	Detektierbar	2 Inkubation
7	¹⁷⁷ Lu	10 nM	3,6	Detektierbar, zu hohe [c]	2 Inkubation
8	¹⁷⁷ Lu	10 nM	15,8	Detektierbar, zu hohe [c]	2 Inkubation

Verändert wurden die Inkubationszeit, die Konzentration des heißen Radioliganden sowie die spezifische Aktivität.

Der IC₅₀ N°1 war aufgrund einer zu geringen Konzentration des heißen Radioliganden nicht auswertbar. Da ⁶⁸Ga mit einer physikalischen Halbwertszeit von $T_{1/2} = 67,7$ Min außerdem schnell abklingt, erhöhte dies die Problematik. Die Aktivität auf den gestanzten Filterplättchen konnte selbst durch den hochsensitiven Gamma-Counter nicht mehr erfasst werden.

Auch bei Versuch N°2 war keine Detektion möglich. Durch eine nochmalige Erhöhung auf 2,0 nM bei N°3 konnte erstmals eine Detektion ermöglicht werden. Jedoch ist diese so niedrig, dass nicht auszuschließen ist, dass sich die unteren Werte am Detektorlimit befinden, und sich deshalb die Ergebnisse nicht reproduzieren lassen.

Die nachfolgenden Versuche wurden mit ¹⁷⁷Lu durchgeführt, welches mit einer physikalischen Halbwertszeit von $T_{1/2} = 6,9$ d eine längere Inkubation ermöglicht. Versuch N°4 mit 0,8 nM war jedoch ebenfalls nicht auswertbar, weswegen die nachfolgenden Experimente nur noch mit höheren Konzentration durchgeführt wurden. Dabei erwies sich eine Konzentration von 2,0 nM und maximal 5,0 nM am besten mit einem IC₅₀ von 3,2 bzw. 7,4. Versuch N°7 und N°8 erwiesen sich zwar als detektierbar, jedoch als nicht auswertbar, da die Konzentration des Radioliganden im Vergleich zum Kompetitor zu hoch ist, und somit der Effekt der Konkurrenz

nicht mehr gegeben ist. Eine auswertbare und repräsentative Kurve konnte somit nicht erstellt werden.

Nachfolgende Abbildungen zeigen die Kurven der ausgewerteten IC_{50} . Ausgewertet wurden die Versuche mittels GraphPad Prism 7. Die nicht berücksichtigten, aber ebenfalls ausgewerteten Versuche N°7 und N°8 befinden sich im Anhang.

Sigmoidal dose-response (variable slope)	Ambiguous
Best-fit values	
Bottom	22.63
Top	113.8
LogEC50	~ 0.9311
HillSlope	~ -6.94
EC50	~ 8.532

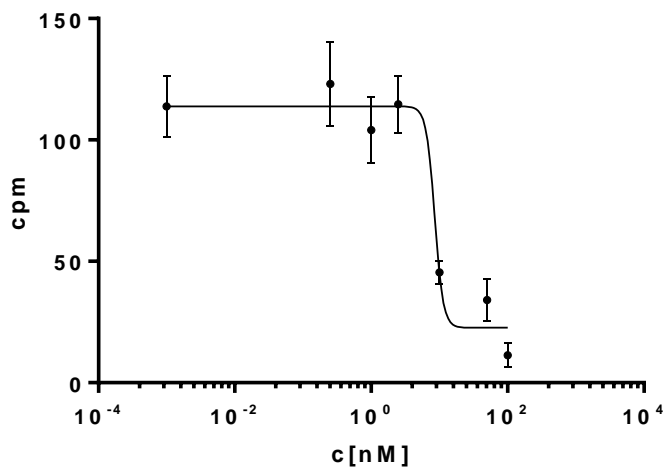
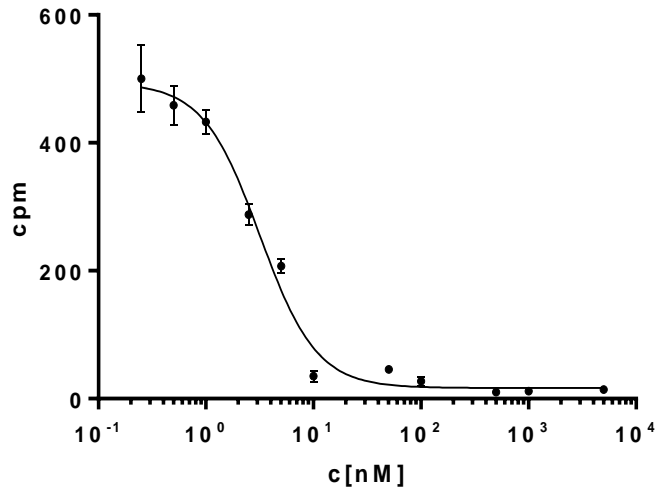
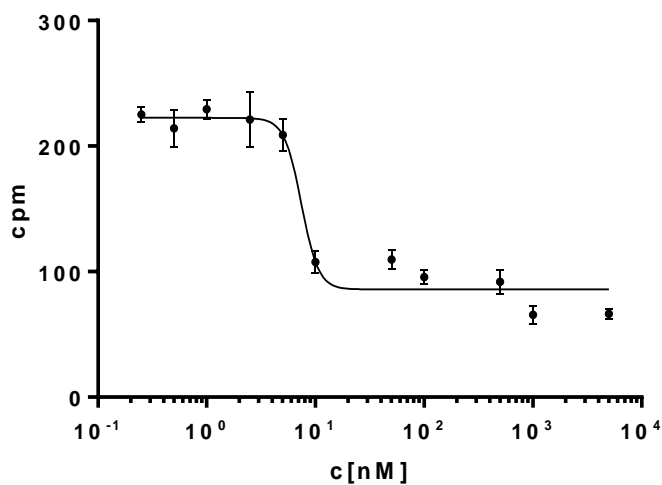


Abb.18: Versuch N°3: IC_{50} 2 nM ^{68}Ga

Sigmoidal dose-response (variable slope)	
Best-fit values	
Bottom	16.69
Top	493.8
LogEC50	0.5008
HillSlope	-1.646
EC50	3.168

Abb.19: Versuch N°5: IC50 2 nM ¹⁷⁷Lu

Sigmoidal dose-response (variable slope)	
Best-fit values	
Bottom	85.83
Top	222.5
LogEC50	0.87
HillSlope	-5.548
EC50	7.413

Abb.20: Versuch N°6 IC50 5 nM ¹⁷⁷Lu

Die weiteren Ergebnisse sind dem Anhang zu entnehmen.

8. Diskussion

Somatostatin ist ein endogenes Hormon welches in den neuroendokrinen Zellen des Pankreas- sowie dem Gastrointestinaltrakts und dem zentralen Nervensystem entdeckt wurde. Es inhibiert im eigentlichen Sinne die Zellproliferation, die Angiogenese und spielt eine wichtige Rolle in der Immunomodulation sowie der Neurotransmission. Somatostatin vermittelt dabei seinen Effekt über G-Protein gekoppelte Somatostatinrezeptoren. Von diesen Rezeptoren sind 5 Subtypen bekannt, die sog. hSST_R-Rezeptoren. Dabei ist es der Rezeptortyp 2, der in menschlichen Tumoren am häufigsten überexprimiert zu sein scheint [10].

Später wurde festgestellt, dass nicht nur neuroendokrine Zellen diesen Rezeptortyp überexprimieren, sondern auch Nierenzellkarzinome, hochaggressive kleinzellige Bronchialkarzinome, Brustkrebszellen, Prostatakrebszellen sowie maligne Lymphome ebenfalls diesen Rezeptortypen besitzen [13]. Dies machte die Entwicklung und Radiomarkierung von Somatostatinanaloga für diagnostische als auch für therapeutische Zwecke noch interessanter, da die Anzahl derer, die eine Behandlung mittels Somatostatinganaloga bekommen könnten stieg. So wurden viele DOTA-Peptid-Konjugate sowie weitere Chelator-Peptid-Konjugate synthetisiert (s. Tab8.) und getestet bevor schließlich DOTA-TATE als der heutige Goldstandard gesetzt wurde.

Tab.8: Übersicht über versch. DOTA-Peptid Konjugate. Die Unterschiede liegen in 2 ausgetauschten Aminosäuren R1/R2

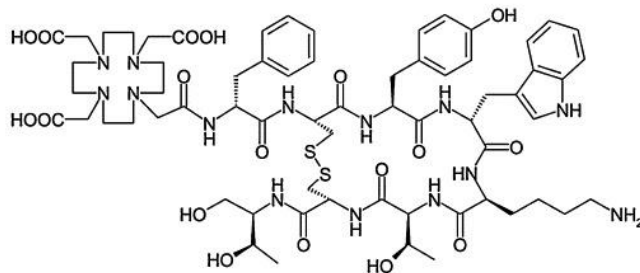
Compound	R1	R2
DOTA-OC	Phe	Thr(ol)
DOTA-TOC	Tyr	Thr(ol)
DOTA-NOC	Nal-1	Thr(ol)
DOTA-NOC-ATE	Nal-1	Thr
DOTA-BOC	BzThi	Thr(ol)
DOTA-BOC-ATE	BzThi	Thr

So wurde in nachkommenden Studien auch untersucht mit welchem radioaktiven Metall bessere Bindungen einhergehen.

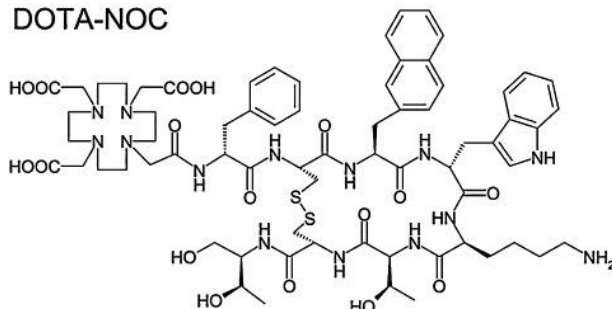
P. Antunes, H.Maecke et al. fanden in Ihrer Studie über Somatostatinanaloga z.B. heraus, dass mit ⁶⁸Ga gelabelte DOTA-Octapeptide präklinisch sowie pharmakologisch bessere Eigenschaften haben, als mit ¹¹¹In- gelabelte Peptide. Der Effekt verstärkte sich vorallem auf Zellen mit SST2-Rezeptoren [11].

DOTATATE stellte sich als sehr sensibler Marker heraus, der Läsionen sichtbar machte, die in vorangegangenen Untersuchungen nicht sichtbar waren.

a) DOTA-TOC



b) DOTA-NOC



c) DOTA-TATE

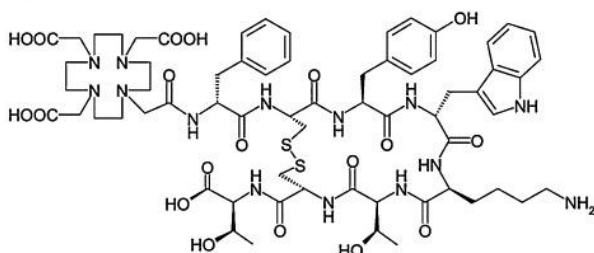


Abb.21: Die am meisten klinisch applizierten ^{68}Ga -gelabelten SSTR-spezifischen Radiopharmazeutika in der Nuklearmedizin [19].

Srirajaskanthan et al. erbrachten in ihrem Vergleich von ^{68}Ga -DOTATATE mit ^{111}In -DTPA-Octreotide den Beweis, dass Patienten mit negativen ^{111}In -DTPA-Octreotide Befund, wiederum einen positiven Befund PET-Befund mit ^{68}Ga -DOTATATE zeigten, und daraufhin auf eine adäquate Behandlung umgestellt werden konnten. Von den 51 untersuchten Patienten wurden 47 (87,2%) positiv mittels ^{68}Ga -DOTATATE untersucht. Es gab keinerlei falsch positive Ergebnisse. Von den 226 Läsionen wurden durch ^{68}Ga -DOTATATE 168 (74,3%) sichtbar gemacht. ^{68}Ga -DOTATATE erkannte signifikant mehr Läsionen als ^{111}In -DTPA-Octreotide. Ebenfalls stellte sich heraus, dass es keine Korrelation zwischen den Uptake von ^{68}Ga -DOTATATE und dem histologischen Grad des Tumors gab [12].

Allerdings lässt ein hoher Uptake von ^{68}Ga -DOTATATE auch auf eine hohe SST2-Rezeptorenanzahl schließen, und damit auch auf höhere antitumoröse Eigenschaft bei Behandlung mit ^{177}Lu -DOTATATE [13].

Saturation Binding

Das eigentliche Ziel der Bindungsstudien mit DOTATATE war es zu untersuchen, ob sich eine nachträgliche „Kaltmarkierung“ des Radioliganden mit $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ auf die Bindungsaffinität zum Rezeptor auswirkt, da durch eine Markierung nur ein kleiner Bruchteil des DOTATATE überhaupt in seinem Chelator das Metall komplexiert.

Durch die Absättigung über die „Kaltmarkierung“ sollte weniger bis gar kein freies unkomplexiertes DOTATATE mehr vorhanden sein. Daraus resultiert, dass Bestimmungen zur Sättigungskinetik verfälscht werden können, da es zu einer Konkurrenz der einzelnen Reaktionspartner kommt.

Erkennbar ist der über die Zeit immer größer werdende K_D -Wert. Vorallem die Versuche 5&6 stechen dabei heraus. Auffällig ist dabei, dass diese Versuche mittels Kassettensynthese durchgeführt wurden. Möglich ist, dass es zu Produktverlusten während der Synthese kommt, und sich dadurch weniger Produkt im Gefäß befindet. Diese Verluste können durch Rückstände im Schlauchsystem der Kassette entstehen, oder durch Verluste bei der Überführung in das Produktgefäß. Eine dadurch herbeigeführte Konzentrationsverschiebung würde dazu führen, dass der K_D -Wert größer ist, als er eigentlich sein sollte.

Der p-Wert mit 0,1 weist darauf hin, dass eine statistische Signifikanz beider Stichproben nicht gegeben ist. Der Blick in die K_D -Werte mit „kalter“ Nachmarkierung zeigt, dass Versuch N°7 dafür verantwortlich sein könnte, dass die Standardabweichung σ größer ist, als bei den Versuchen ohne Kaltmarkierung. Genauso möglich ist es aber auch, wie oben erwähnt, dass die Versuche 5&6 durch eine Konzentrationsverschiebung falsche Ergebnisse liefert, und der Mittelwert zu hoch ist und eigentlich im Bereich um Versuch N°7 liegen sollte. Da der Wert von N°7 mit einem K_D -Wert von 33,71 im Bereich der Gruppe ohne „Kaltmarkierung“ liegt, unterstützt dies allerdings nochmals die Aussage, dass eine nachträglich „Kaltmarkierung“ keinen signifikanten Unterschied erwirkt. Eine Erhöhung von n in beiden Stichproben, könnte die Aussagekraft der Ergebnisse eventuell vergrößern und ein statistisch signifikanteres Ergebnis erwirken. Zur besseren Vergleichbarkeit wäre es besser gewesen, hier nicht zwischen Kassettensynthese und Handsynthese zu variieren.

Betrachtet man noch zusätzlich den durchgeführten ersten Assay der nicht in die Ergebnisse aufgenommen wurde, da dieser nicht denselben Versuchsablauf hatte, so würde dieser die Standardabweichung der kalt-nachmarkierten Gruppe nochmals verschlechtern und ebenso den p-Wert nicht verbessern.

Pimentel et al. beschrieben in einem in vitro Vergleich zwischen DOTATATE und dem Peptid ior-P1394 einen K_D -Wert von 30,2 nM für DOTATATE. Diese Ergebnisse entsprechen in etwa den ermittelten K_D -Werten in den Versuchen 2,3,4 und 7 [14].

IC₅₀

Eine Möglichkeit die Rezeptoranzahl oder dessen Affinität eines Medikaments zu bestimmen, ist es Saturation Binding Experimente durchführen, bei denen man die Konzentration des Radioliganden variieren kann. Die Alternative dazu ist es, die Konzentration des Radioliganden konstant zu halten, und ihn mit demselben bzw. gegen denselben Rezeptor gerichteten Liganden kompetitiv zu verdrängen. Da hier der „heiße“ radioaktive sowie der kalte Ligand (Kompetitor) identisch sind, werden solche Versuche auch als homologe Kompetitionsassays bezeichnet.

Ziel des IC₅₀ war es, ein Protokoll zu etablieren, mit welchem man rechnerisch auf den K_D- bzw. K_i-Wert durch die Ermittlung des IC₅₀-Wertes schließen kann.

Durch Umstellung der schon genannten Formel zur rechnerischen Bestimmung des IC₅₀ nach K_i ergibt sich wie folgt:

$$[1] IC_{50} = \left(1 + \frac{[c]}{K_i} \right) * K_D$$

$$[2] K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[c]}{K_D}}$$

Unten aufgeführte vereinfachte Annahme sowie [2] stimmen jedoch nur, wenn der Kompetitor im Kompetitionsassay gegen sich selbst getestet wird. In diesem Falle, wurde als Kompetitor DOTATATE gegen sich selbst getestet. Wenn die Annahme gegeben ist, lässt sich die Formel weiter vereinfachen:

$$K_i = IC_{50} - [c]$$

Der K_i-Wert, der in dem Fall gleich dem K_D-Wert des Saturation Binding ist, lässt sich als Ergebnis der Subtraktion des IC₅₀-Werts und der Konzentration des eingesetzten Heißliganden bestimmen.

Nach Etablierung eines auswertbaren Protokolls wie im Ergebnisteil beschrieben, konnte dieser Annahme nachgegangen werden, in dem IC₅₀-Experimente mit 2,0 nM, 5,0nM und 10 nM durchgeführt wurden.

Nach Abzug der Konzentration des Heißliganden sollten theoretisch gleiche K_i -Werte herauskommen. Vergleicht man die Versuche N°3,5,6 und 7 miteinander, kann folgendes interpretiert werden:

Tab.9: Übersicht über die IC_{50} -Ergebnisse

N°	[c] nM, Radionuklid	IC_{50} [nM]	K_i [nM]
3	2,0 ^{68}Ga	8,5	$8,5-2 = 6,5$
5	2,0 ^{177}Lu	3,2	$3,2-2 = 1,2$
6	5,0 ^{177}Lu	7,4	$7,4-5 = 2,4$
7	10,0 ^{177}Lu	3,6	$3,6-10 = -6,4$

Die theoretisch aufgestellte Formel kann unter Berücksichtigung, dass es sich hierbei um ein biologisches Experiment handelt, teilweise bestätigt werden. Viele Parameter wie die Zellzahl, Rezeptorzahl, Bindung usw. haben einen Einfluss auf das Ergebnis und lösen somit Schwankungen aus.

Homologe IC_{50} -Experimente führen nur zu guten und verlässlichen Ergebnissen, wenn [c] des Heißliganden weniger als die Hälfte des Wertes vom IC_{50} ist [15].

Es gibt verschiedene Möglichkeiten zur Interpretation der Ergebnisse.

Ist [c] des Heißliganden 2-10-mal geringer als der des IC_{50} , können diese Werte als vertrauenswürdig angesehen werden und auch herangezogen werden [15].

Diese Aussage spiegelt sich in N°3 wieder. Experiment N°3 ist dementsprechend als vertrauenswürdiges Ergebnis zu betrachten. Eine direkte Vergleichbarkeit mit den anderen Werten ist allerdings aufgrund der unterschiedlichen Inkubationszeiten nicht gegeben [15].

Ist [c] des Heißliganden kleiner als der IC_{50} , aber nicht weniger als 2-mal so klein, sollte das Experiment mit einer geringeren Menge des Heißliganden wiederholt werden [15].

Dies ist bei den Experimenten N°5 & 6 zu beobachten gewesen. Allerdings ist die [c] des Heißliganden bei N°5 dieselbe wie bei N°3.

Die dritte Möglichkeit ist die eines negativen K_i -Werts, welche daraus resultiert, wenn der IC_{50} geringer ist als [c] des Heißliganden. Dies ist aus theoretischer Sicht unmöglich. Eine solche Konstellation entsteht, wenn die eingesetzte Konzentration des Heißliganden während des Versuchs im Vergleich zum Kompetitor zu hoch ist, und eine Konkurrenz nicht mehr richtig gegeben ist. Somit steigt auch die unspezifische Bindung enorm an, welche im Gesamten das Ergebnis verfälscht. Bei einem solchem Ergebnis sollte der Versuch mit einer geringeren Konzentration des Heißliganden durchgeführt werden.

Durch eine Verdopplung der Konzentration auf 0,8 nM bei Versuch N°2 und einem optimierten Zeitmanagement bei der Durchführung (Vorbereitung der Verdünnungsreihe am Vortag, vorbereiten der Zellen vor der Radiomarkierung, Durchführung der Radiomarkierung wenn alles andere bereits vorbereitet ist) war eine Detektion immer noch nicht möglich.

Versuch N°7 ist aufgrund einer zu hohen Konzentration des Heißliganden im Gegensatz zum Kompetitor nicht auswertbar, und ist ein Beispiel für die o.g. Aussage.

Eine 8-Fach Bestimmung wie sie hier durchgeführt wurde ist sinnvoll, da es bei der Durchführung vorkommt, dass vereinzelt Wells durch den 2-stündigen Wipp-Vorgang auslaufen und somit fehlerhaft sind, da es zu Konzentrationsveränderungen kommt.

Ein weiterer unklarer Faktor stellten in diesen Versuchen die Zellen dar. So verändert sich die Zelllinie Hek-hsst 2 im Laufe der Passagenzahl, sodass die Expression des Rezeptors eventuell nachlässt, und eine Bindung verschlechtert wird. Dabei handelt es sich bei Hek-hsst 2 um eine transfizierte Zelllinie immortalisierter embryonaler Nierenzellen [16]. Durch die steigende Passagenzahl, wird das transfizierte Gen zur Überexprimierung der Rezeptoren möglicherweise reduziert. Für die IC_{50} - Experimente hatten die Zellen die Passage 20-28.

Eine ungenügende Bindung könnte allerdings auch das Resultat einer schnellen Absetzung der Zellen in den Filter sein, welches dazu führt, dass das erst in Nachhinein zugegebene Gemisch aus Kompetitor und Heißligand nicht alle Zellen homogen erreicht, und somit auch hier eine Bindung negativ verfälscht.

Als Fazit der IC_{50} - Experimente lässt sich sagen, dass im Falle des DOTATATE die verlässlichsten Ergebnisse erzielt werden, wenn die Konzentration des Heißliganden 2-10-mal niedriger ist, als der IC_{50} , hier also bei 2 nM liegt. Auch eine Durchführung mit 5 nM ist erwägbar. Höhere Konzentration sind nicht auswertbar.

Tab.10: Vergleich beider verwendeter Methoden

	Saturation Binding	IC ₅₀
Vorteile	<ul style="list-style-type: none"> - Sättigungskinetik, direkte Bestimmung k_D-Wert 	<ul style="list-style-type: none"> - Geringere Strahlenexposition - Praktikablere Durchführung - kosteneffizienter
Nachteile	<ul style="list-style-type: none"> - Hoher Materialaufwand - Kostenaufwendig - Benötigt viele Zellen - Hohe Strahlenexposition - Durchführung zeitaufwendig 	<ul style="list-style-type: none"> - Arbeit mit geringen Konz. erfordert Einsatz längerlebiger Nuklide wie Lu-177

Fazit:

Abschließend können sich beide behandelten Methoden vergleichen lassen. Der IC₅₀ zur Bestimmung des K_D-Werts lässt sich nur durchführen, wenn zuvor das als Radioligand eingesetzte Peptid gegen sich selbst kompetitiert wird, und somit der K_D des Radioliganden bekannt ist. Ein geeignetes Protokoll dafür scheint gefunden zu sein, und eine Durchführung mit nicht mehr als 2 nM heißem Radioligand sollte erwogen werden. Aufgrund der geringeren Kosten und der erheblich geringeren Strahlenexposition während der Assays, ist die Ermittlung von Bindungsdaten über den IC₅₀ zu bevorzugen. Ebenso stellte sich die Durchführung zeitlich als viel praktikabler heraus. Als einziger Nachteil bleibt zu erwähnen, dass aufgrund der Arbeit mit geringen Konzentrationen der Einsatz von längerlebigen Nukliden als nötig erscheint, wobei weitere Versuche mit ⁶⁸Ga im 2 nM Bereich erfolgen sollten. Außerdem könnten in Zukunft mehrere Versuche auf einer Platte durchgeführt werden, sodass mehrere Fragestellungen mit einem Versuch gelöst werden. Die Frage einer positiven Auswirkung der „kalten“ Nachmarkierung auf den K_D-Wert während der *Saturation Binding* Versuche wurde nicht nachgewiesen. Ebenso stellte sich heraus, dass Markierungen über die Kassettensynthese zu Ungenauigkeiten in der Konzentration führen kann, und damit auch erhebliche Verzerrungen des K_D-Wertes einhergehen, weshalb eine zusätzliche Konzentrationsbestimmung an diesem Punkt von Vorteil wäre.

Die Präklinik und Weiterentwicklung bzw. Neuentwicklung von Radiopharmaka erfährt in den letzten Jahren viele Neuerungen und Verbesserungen. Trotz dessen wird die Diagnostik mittels PET in Deutschland eher zurückhaltend eingesetzt, obwohl diese einen erheblichen Vorteil für den Diagnosesteller und den Patienten haben. Gegenüber 2008 erfuhr die PET-Diagnostik in Deutschland bis heute im internationalen Vergleich nur einen moderaten

Zuwachs von etwa 9% pro Jahr. Nicht zuletzt hängt dies auch mit der mangelnden Vergütungssituation durch die Krankenkassen zusammen [21].

9. Literaturverzeichnis

- [1] <https://www.uniklinik-freiburg.de/nuklearmedizin.html>
- [2] <http://www.leifiphysik.de/kern-teilchenphysik/radioaktivitat-einfuehrung>
- [3] <http://www.med.harvard.edu/jpnm/chetan/lungca/petct/petct.html>
- [4] <https://de.wikipedia.org/wiki/Positronen-Emissions-Tomographie>
- [5] <http://www.philips.de/healthcare/product/HC882446/vereos-petct-petct-system>
- [6] <http://www.spektrum.de/lexikon/biologie/radiopharmazie/55496>
- [7] <https://de.wikipedia.org/wiki/1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigs%C3%A4ure>
- [8] 1. Yao JC, Hassan M, Phan A, Dagohoy C, Leary C, Mares JE, Abdalla EK, Fleming JB, Vauthey JN, Rashid A, Evans DB. One hundred years after carcinoid: epidemiology of and prognostic factors for neuroendocrine tumors in 35,825 cases in the United States. *J Clin Oncol.* 2008;26:3063–72.
- [9] Mojtahedi A, Thamake S, Tworowska I, Ranganathan D, Delpassand ES. The value of ⁶⁸Ga-DOTATATE PET/CT in diagnosis and management of neuroendocrine tumors compared to current FDA approved imaging modalities: a review of literature. *American Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging.* 2014;4(5):426-434.
- [10] Vincent T. Devita, Samuel Hellman, Steven A. Rosenberg, *Progress in Oncology* 2003
- [11] Antunes, P., Ginja, M., Zhang, H. et al. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* (2007) 34: 982. <https://doi.org/10.1007/s00259-006-0317-x>
- [12] <http://jnm.snmjournals.org/content/51/6/875.full.pdf+html>
- [13] Zhang, Libo et al. "Correlation of Somatostatin Receptor-2 Expression with Gallium-68-DOTA-TATE Uptake in Neuroblastoma Xenograft Models." *Contrast Media & Molecular Imaging* 2017 (2017): 9481276. PMC. Web. 18 Mar. 2018.
- [14] Pimentel, G., Miranda, M., Ravelo, R., Sanchez, I., Garay, H.E., & Reyes, O. (2007). Comparative evaluation of ¹³⁹La and DOTA-TATE for radionuclide therapy. *World Journal of Nuclear Medicine*, 6(suppl1), S43.

- [15] H.J. Mutulsky and A Christopolous, Fiting models to a biological data using linear and nonlinear regression. A practical guide to curve fitting. 2003, Graph Pad Software Inc., San Diego CA, www.graphpad.com
- [16] <http://www.hek293.com/transfection-information/>
- [17] Melpomeni Fani, PET of Somatostatin Receptor–Positive Tumors Using ⁶⁴Cu- and ⁶⁸Ga-Somatostatin Antagonists: The Chelate Makes the Difference. *J Nucl Med* July 1, 2011 vol. 52 no. 7 1110-1118
- [18] Kilian K. ⁶⁸Ga-DOTA and analogs: Current status and future perspectives. *Reports of Practical Oncology and Radiotherapy*. 2014;19(Suppl):S13-S21.
doi:10.1016/j.rpor.2014.04.016.
- [19] <https://radiopharma.com/wp-content/uploads/2017/03/7131-0070.pdf>
- [20] <https://www.frm2.tum.de/industrie-medizin/radioisotopen-produktion/lutetium-177/>
- [21] J.Kotzerke, Positron emission tomography 2013 in Germany, Results of the query and current status. *Nuklearmedizin* 2015; 54: 53–59
- [22] Yao JC, Hassan M, Phan A, Dagohoy C, Leary C, Mares JE, Abdalla EK, Fleming JB, Vauthey JN, Rashid A, Evans DB. One hundred years after carcinoid: epidemiology of and prognostic factors for neuroendocrine tumors in 35,825 cases in the United States. *J Clin Oncol*. 2008;26:3063–72.
- [23] http://www.carellgroup.de/images/pdf_teaching/bachelor/a2_peptide_2018.pdf
- [24] <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/pittsburgh-compound-b>
- [25] Padberg, BC., Rordorf, T., Suter, S.L. et al. *Pathologie* (2007) 28: 281.
<https://doi.org/10.1007/s00292-006-0832-3>
- [26] Chopra A. [¹¹¹In]-DOTA-Aminohexanoyl-[D-Phe⁶,Leu-NHCH₂CH₂CH₃13,desMet¹⁴]BBN[6-14] 2010 May 20 [Updated 2010 Jul 8]. In: *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)* [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2004-2013. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK45125/>
- [27] Harald Schicha, Otmar Schober, *Basiswissen und klinische Anwendung*; mit 66 Tabellen Verlag Schattauer Verlag, 2013 ISBN 3794528891, 9783794528899, S 56 ff.

10. Bilderverzeichnis

Abb.1:

https://de.wikibooks.org/wiki/Physikalische_Grundlagen_der_Nuklearmedizin/_Radioaktiver_Zerfall

Abb.2: <http://de.academic.ru/dic.nsf/dewiki/1067664>

Abb.3: http://depts.washington.edu/nucmed/IRL/pet_intro/intro_src/section2.html

Abb.4: <http://www.digitalpetlearningcenter.philips.com/>

Abb.5: allgemeiner Radiopharmakonaufbau

Abb.6: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c2/Fluorodeoxyglucose.PNG>

Abb.7: <https://en.wikipedia.org/wiki/DOTA-TATE#/media/File:DOTATATE.svg>

Abb.8: Allgemeiner Ablauf einer Festphasenpeptidsynthese

Abb.9: Massenspektrogramm des DOTATATE. Zu sehen ist das Hauptprodukt DOTATATE(1436m/z) sowie die halbe Masse(719m/z)

Abb.10: analytische HPLC des aufgereinigten Produkts. Zu sehen ist ein einziger klar abgrenzbarer Peak (grün,100%).

Abb.11: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:DOTA_chelate.png

Abb.12: Synthesekassette für die Radiomarkierung, private Aufnahme

Abb.13: Serumstabilität nach 2 Stunden, analytische HPLC Aufnahme

Abb.14: Pipettierschema des Saturation Binding Assay

Abb.15: http://www.bostonlabco.com/uploads/2/4/5/1/24519591/4737229_orig.jpg

Abb.16: GraphPad Prism

Abb.17: GraphPad Prism

Abb.18: GraphPad Prism

Abb.19: GraphPad Prism

Abb.20: GraphPad Prism

Abb.21: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5394743/figure/fig0010/>

Abb.22: GraphPad Prism

Abb.23: GraphPad Prism

Abb.24: GraphPad Prism

Abb.25: GraphPad Prism

Abb.26: GraphPad Prism

Abb.27: GraphPad Prism

Abb.28: GraphPad Prism

11. Tabellenverzeichnis

Tab.1: *Auswahl versch. Radiopharmaka und deren Funktion in der PET*

Tab.2: *Geräteliste*

Tab.3: *Verdünnungsreihe für den Saturation Binding Assay*

Tab.4: *Verdünnungsreihe des „kalten“ DOTATATE*

Tab.5: *Übersicht der Saturation Binding Experimente*

Tab.6: *Übersicht über die Ergebnisse der Saturation Binding Experimente*

Tab.7: *Übersicht über die IC50 Experimente*

Tab.8: *Übersicht über versch. DOTA-Peptid Konjugate. Die Unterschiede liegen in 2 ausgetauschten Aminosäuren R1/R2*

Tab.9: *Übersicht über die IC50-Ergebnisse*

Tab.10: *Vergleich beider verwendeter Methoden*

12. Eidesstattliche Erklärung

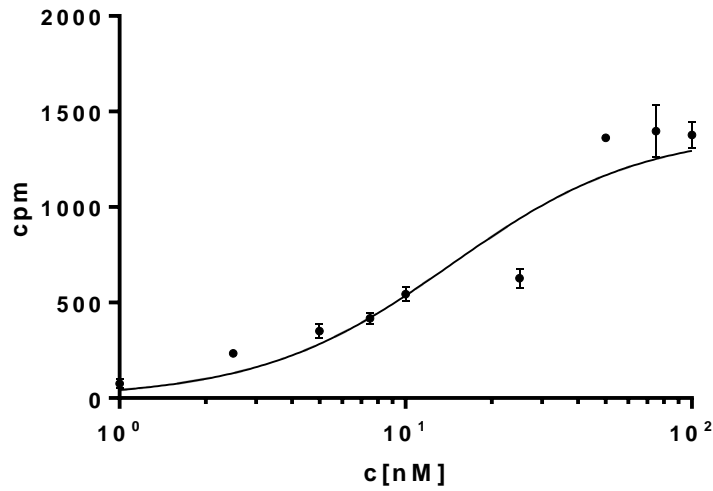
Ich erkläre, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit selbst verfasst und dazu keine anderen als die angeführten Behelfe verwendet, die Autorenschaft eines Textes nicht angemaßt und wissenschaftliche Texte oder Daten nicht unbefugt verwertet habe. Außerdem habe ich die Reinschrift der Bachelorarbeit einer Korrektur unterzogen und ein Belegexemplar verwahrt.

Ort, Datum

Unterschrift

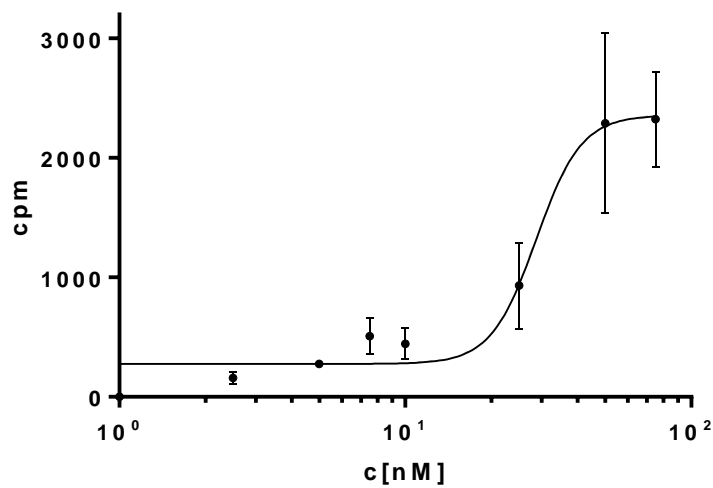
X. Anhang

Saturation Binding Versuche



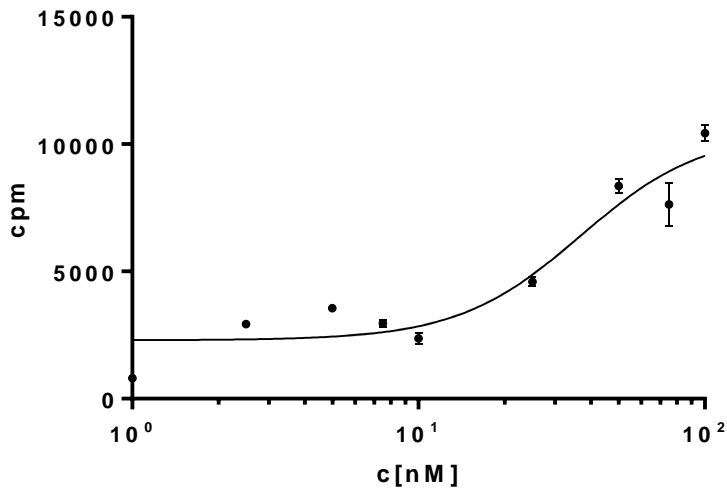
	Specific uptake
Sigmoidal dose-response (variable slope)	
Best-fit values	
Bottom	= 0
Top	= 1400
LogEC50	1.16
HillSlope	1.295
EC50	14.44

Abb.22: Versuch N°1 Saturation Binding



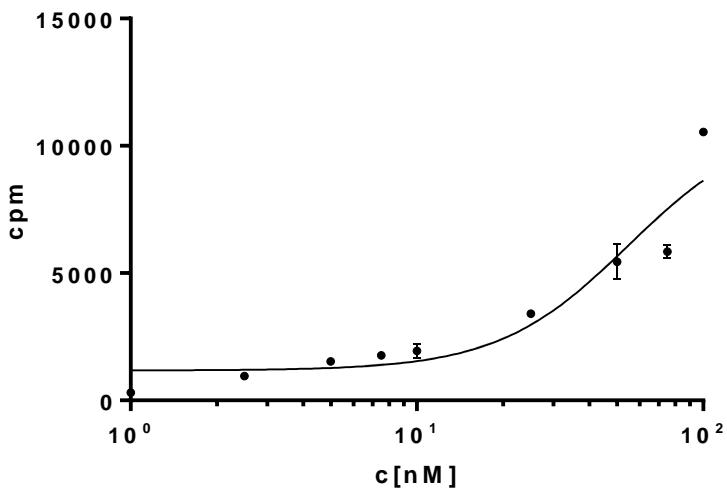
	Specific uptake
Sigmoidal dose-response (variable slope)	
Best-fit values	
Bottom	275.7
Top	2357
LogEC50	1.458
HillSlope	5.506
EC50	28.68

Abb.23: Versuch N°2 Saturation Binding



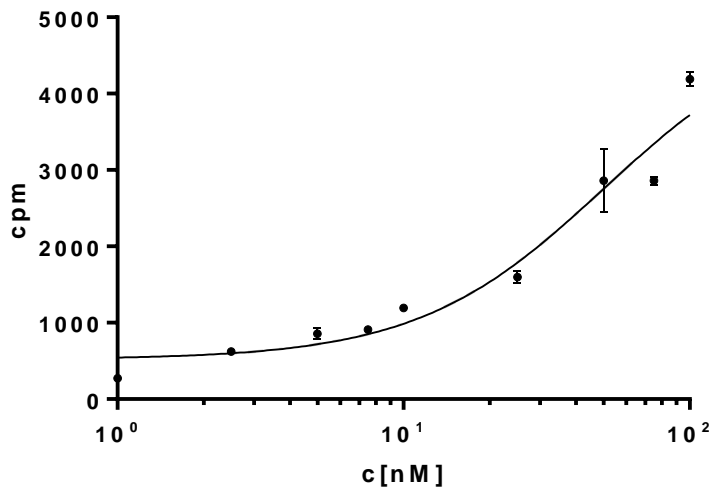
	Specific uptake
Sigmoidal dose-response (variable slope)	
Best-fit values	
Bottom	2296
Top	= 10500
LogEC50	1.566
HillSlope	2.022
EC50	36.81

Abb.24: Versuch N°4 Saturation Binding



	Specific uptake
Sigmoidal dose-response (variable slope)	
Best-fit values	
Bottom	1175
Top	= 11000
LogEC50	1.739
HillSlope	1.91
EC50	54.79

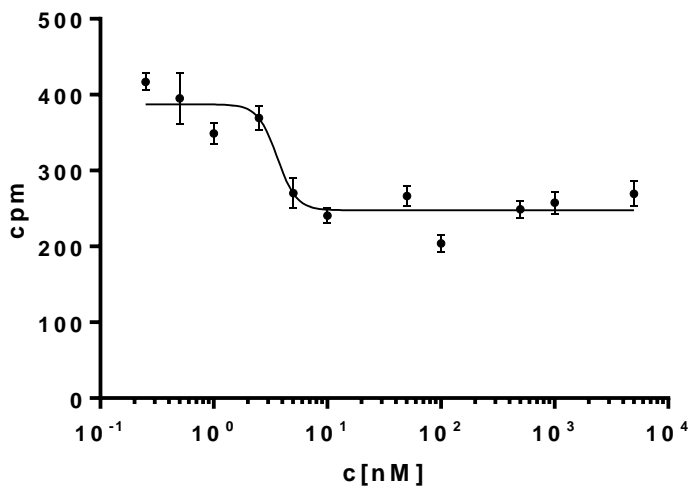
Abb.25: Versuch N°5 Saturation Binding



	Specific uptake
Sigmoidal dose-response (variable slope)	
Best-fit values	
Bottom	519.9
Top	= 5000
LogEC50	1.701
HillSlope	1.332
EC50	50.24

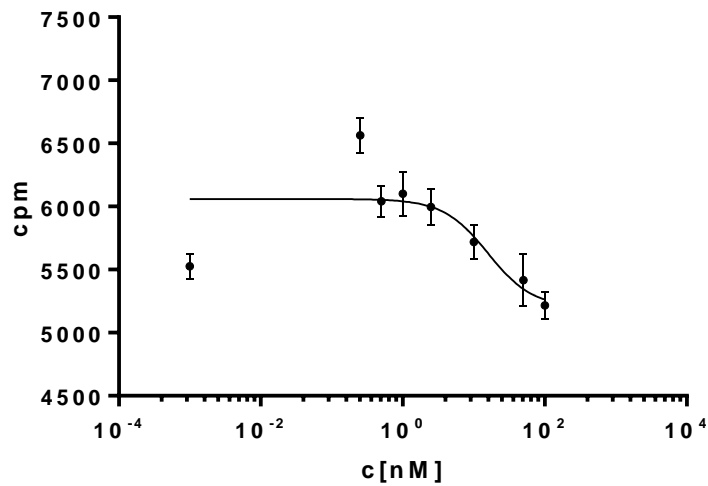
Abb.26: Versuch N°6 Saturation Binding

IC50-Experimente



Sigmoidal dose-response (variable slope)	
Best-fit values	
Bottom	247.7
Top	387.3
LogEC50	0.5569
HillSlope	-5.087
EC50	3.605

Abb.27: Versuch N°7 IC₅₀ mit ¹⁷⁷Lu



Sigmoidal dose-response (variable slope)	
Best-fit values	
Bottom	= 5200
Top	6060
LogEC50	1.199
HillSlope	-1.378
EC50	15.81
Std. Error	
Top	89.6
LogEC50	0.2427
HillSlope	0.8055
95% CI (asymptotic)	
Top	5880 to 6239
LogEC50	0.7136 to 1.684
HillSlope	-2.989 to 0.2323
EC50	5.171 to 48.35
Goodness of Fit	
Degrees of Freedom	61
R square	0.3102
Absolute Sum of Squares	13914379
Sy.x	477.6
Constraints	
Bottom	Bottom = 5200
Number of points	
# of X values	64
# Y values analyzed	64

Abb.28: Versuch N°8 IC₅₀ mit ¹⁷⁷Lu



Simon Osterkamp, 24 Jahre alt. Nach mehrjähriger teils ehrenamtlicher Tätigkeit beim Rettungsdienst habe ich meine Interessen im medizinischen Sektor gefestigt. Studium der Molekularen und Technischen Medizin (B.Sc.) an der Hochschule Furtwangen (HFU), Campus Schwenningen. Praxissemester in der Medizinphysik an der Uniklinik Freiburg, Abteilung Nuklearmedizin. Bachelorarbeit in der Radiopharmazie, Abteilung für Nuklearmedizin unter der Anleitung von Prof. Dr. Eder und mit Unterstützung des DKFZ. Tätigkeit als

Hilfswissenschaftler 2018 an der HFU. Interessen in den Bereichen der Radiopharmazie, Tumorbiologie, Labormedizin & Notfallmedizin als auch der Medizintechnik, speziell der Kardiotechnik. Aktuell Master-Studium zum Technical Physician (M.Sc.) an der HFU, Campus Schwenningen.