

Radiopharmaka zur Tumorbehandlung – Fiktion oder Realität?¹

P. August Schubiger, Zürich/Villigen

Zusammenfassung

Die Chance für eine erfolgreiche Behandlung von Krebspatienten, bei denen zum Zeitpunkt der Diagnose metastasierende Tumoren vorliegen, beträgt heute etwa 12,5%. Dabei kommt primär die Chemotherapie mit all den inhärenten Nebenwirkungen zum Einsatz. Eine Alternative bietet die nebenwirkungsarme gezielte systemische Radionuklidtherapie, wie sie z. B. seit Jahrzehnten mit ¹³¹I bei der Behandlung von Schilddrüsenkarzinomen eingesetzt wird. Nach langen Jahren der radiopharmazeutischen Forschung stehen jetzt die ersten ¹³¹I markierten Antikörper gegen bestimmte Non-Hodgkin's Lymphome vor der klinischen Routineanwendung. Es wird an Beispielen gezeigt, welche neuen Erkenntnisse über metallische therapeutisch einsetzbare Radionuklide, spezifische tumorsuchende Moleküle (von Peptiden bis Antikörpern) und der Synthese der notwendigen Chelatoren und Linkern vorliegen. Der Einfluss der Einzelparameter auf das biologische Gesamtverhalten wird diskutiert und Möglichkeiten für zukünftige verbesserte Radiotherapeutika aufgezeigt.

Radiopharmaceuticals for Tumorthrapy – Fiction or Reality?

The treatment of tumour metastasis is up to now mainly a domain covered by chemotherapy and in special cases only as for instance in some thyroid cancers radionuclide therapy is being used. However only one of eight patients diagnosed with metastatic disease can be cured at the present time and targeted radionuclide therapy has the potential to improve on this number. It took many years of intensive radiopharmaceutical research in the development of radioiodinated antibodies directed against lymphoma, which are now on the step of becoming clinical routine. New interesting therapeutic radionuclides are presented, as well as specific tumourseeking molecules (peptides, antibodies). The influence of the parameter variations to the biological behaviour of the whole radioconjugate is discussed and possibilities of improved radiotherapeutics presented.

1 EINLEITUNG

Jeder dritte Westeuropäer wird im Laufe seines Lebens von einer Krebserkrankung betroffen. Dies ergeht aus einer Studie der Europäischen Union (COMMISSION OF THE EC). Die Prozentanteile der 10 häufigsten Krebserkrankungen sind in Tab. 1 aufgeführt. Wichtiger aber als die Art der Krebserkrankung ist die Frage nach der Chance von der Krebserkrankung wieder zu gesunden. Die erwähnte EU-Studie sagt aus, dass knapp die Hälfte der mit Krebs diagnostizierten Patienten geheilt werden können. Allerdings sind die Heilungschancen sehr unterschiedlich, abhängig von der Art des Tumors und davon, ob zur Zeit der Diagnose ein Primärtumor oder eine

bereits metastasierende Erkrankung vorhanden ist (Tab. 2). Von den 58% Patienten mit Primärtumoren können 40% geheilt werden, während von den andern 42% mit bereits metastasierenden Erkrankung nur noch etwa 5% geholfen werden kann. Diese Heilungschancen zu verbessern ist das Ziel der Radionuklidtherapie mit Radiopharmaka.

Da der Ort eines Primärtumors genau lokalisiert werden kann, kann dessen Behandlung durch lokale Methoden wie Chirurgie oder externe Strahlentherapie erfolgen. Bei der metastasierenden Erkrankung werden die völlig chaotisch wachsenden Tumorzellen über Blut oder andere Körperflüs-

¹ Einführungsvorlesung Professur für Radiopharmazie an der ETH Zürich vom 1. Juli 1998

Tab. 1. Prozentanteile der häufigsten Krebslokalisationen; Neuerkrankungen, alle Alter, 1989–1993.

Tab. 1. Percentage of the most numerous cancer localisations; New diseases, all ages 1989–1993.

Brust	30.7
Prostata	21.6
Darm	12.7
Lungen	11.0
Gebärmutter	8.7
Eierstöcke	4.8
Harnblase	4.2
Melanom der Haut	4.0
Mund, Rachen, Kehlkopf	3.9

Tab. 2. Wirksamkeit von Krebsbehandlungen.

Tab. 2. Effectiveness of tumour treatments.

Behandlung	Zur Zeit der Diagnose:		
	primärer Tumor 58 %	Tumor mit Metastasen 42 %	Total 100 %
<ul style="list-style-type: none"> • Chirurgie allein • Radiotherapie allein • beide kombiniert • Alle anderen Behandlungen und Kombinationen inkl. Chemotherapie 	22 % 12 % 6 %	5 %	
Patienten heilbar	40 %	5 %	45 %

sigkeiten abgeschwemmt und wachsen an neuen Orten weiter. Kleine Tumorzellhaufen können klinisch nicht gefunden werden, erst ab einer bestimmten Grösse (5 mm Durchmesser) werden sie überhaupt erfassbar. Deshalb muss in diesen Fällen die Behandlungsmethode systemisch sein, d. h. die Tumortheraeutika müssen über die Blutbahnen zu den (zum Teil nicht sichtbaren) Metastasen gelangen. Dies ist das Gebiet der Chemotherapie und der gezielten Radionuklidtherapie.

2 TUMORAFFINE RADIOPHARMAKA

Um Tumorzellen auf dem systemischen Weg zu finden, suchen wir Moleküle, die aus physiologischen Gründen in die Nähe der Zellen, an oder in die Zellen gelangen. Zur letzteren Gruppe gehören alle Substanzen, die am Zellmetabolismus

teilnehmen, z. B. Glukose für die Energiegewinnung, Aminosäuren für die Synthese von Proteinen oder Nucleinbasen als Bausteine der DNA². Da sich maligne Tumorzellen viel schneller teilen als «Normalzellen», weisen sie einen hohen Bedarf an solchen biologischen Molekülen auf. Werden diese mit radioaktiven Nukliden beladen oder verändert, können die gefundenen Zellen sichtbar gemacht oder abgetötet werden. Abb. 1 zeigt ein Beispiel mit einer veränderten Glukose, bei der am Kohlenstoff-2 eine natürliche Hydroxidgruppe (OH) durch ein radioaktives Fluorid (¹⁸F) ersetzt wurde. Diese sogenannten FDG-Moleküle werden wie Zucker in die Zellen aufgenommen, allerdings führt der Metabolismus des FDG nur bis zur ersten Phosphorylierung, und der entsprechende Metabolit bleibt dann liegen. Damit werden alle Zellen sichtbar, die FDG aufgenommen haben. In unserem Falle sind es vor allem die Tumorzellen eines Lymphoms (Morbus Hodgkin's IV), aber auch die gesunden Nervenzellen im Gehirn, die natürlicherweise viel Energie verbrauchen. FDG kann also die Metastasen gut sichtbar machen, aber nicht für die gezielte Therapie von Tumoren eingesetzt werden, weil dann auch die gesunden Gehirnzellen getroffen werden. Genau das ist auch das Problem der Chemotherapie, die veränderte Bausteine für die Zerstörung der DNA einsetzt und damit die sich schnell teilenden Tumorzellen erreicht, aber auch alle gesunden Zellen, die sich in der Teilungsphase befinden, was zu den unangenehmen Nebenwirkungen dieser Therapie führt.

Erfolgreich hat sich seit den 50er Jahren die Therapie von bestimmten Schilddrüsenkarzinomen mit dem radioaktiven Iodid ¹³¹I erwiesen. Auf Grund des spezifischen Stoffwechsels wird Iodid nur in der Schilddrüse stark angereichert, weil dort die iodhaltigen Schilddrüsenhormone aufgebaut werden. Das so aufgenommene ¹³¹I zerstört mit seiner therapeutischen β -Strahlung (siehe unten) die entsprechenden Zellen. Seither gab es nur wenig weitere Radiotherapeutika, die erfolgreich in der klinischen Routine eingesetzt werden konnten. So ist Ende der 80er Jahre unter anderen das MIBG (für meta-Iodbenzylguanidin mit ¹³¹I), das speziell von Neuroblastom- und Phäochromozytomtumoren aufgenommen wird, dazugekommen. In den 90er Jahren schliesslich wurden verschiedene Präparate (die Phosponate ¹⁸⁶Re-HEDP und ¹⁵³Sm-EDTMP und das ⁹⁸Sr-chlorid) eingeführt, die auf Grund ihrer Eigenschaften in die Knochen eingebaut werden. Diese werden zur nachhaltigen Schmerzbekämpfung von Knochenmetastasen eingesetzt, können aber keine Heilung bewirken.

² DNA = Desoxyribonukleinsäure in den Zellkernen



Abb. 1. Fluorodeoxyglukose (FDG)-Anreicherung: PET (Positron Emmission Tomography). Bild eines Patienten mit Morbus Hodgkin's IV: Befall der axillären Lymphknoten und Milz (Nuklearmedizin, Universitätsspital Zürich, Prof. Dr. G.K. v. Schulthess).

Fig. 1. FDG-accumulation: PET image of a patient with Morbus Hodgkin's IV: Metastatic disease of the axilliary Lymphodes and the spleen (courtesy nuclear medicine, university hospital Zurich, Prof. Dr. G.K. v. Schulthess).

Die Anzahl der gefundenen Radiotherapeutika blieb also insgesamt enttäuschend klein, obwohl doch das Prinzip der Radionuklidtherapie so bestechend ist (HOEFNAGEL, 1991). Ein Problem war zunächst das Finden von spezifisch tumorfindenden Molekülen. Da schien sich mit der Möglichkeit der Herstellung von murinen Antikörpern, die an bestimmte

Oberflächenproteine sog. Antigene von Zellen andocken, vor etwa zwanzig Jahren das ideale Vehikel zum Transport von therapeutischen Radionukliden gefunden zu haben. Anfangs der 80er Jahre schnellten die publizierten Arbeiten mit radioaktiv markierten Antikörpern in die Höhe, jedermann war überzeugt, das «magic bullet» der Krebstherapie gefunden zu haben. Doch erfüllten sich die Hoffnungen zunächst nicht, viele Forscher wandten sich wieder andern Forschungsthemen zu. Einige Gruppen, wie auch wir selber, sahen das Potential des Radioimmunokongjugats nach wie vor positiv und begannen die Probleme anzugehen. Es ging um höhere Sensitivität und Spezifität, um stabile Markierungsmethoden mit ^{131}I , um Applikationsstrategien, um den Ersatz von murinen Antikörpern durch chimäre³ und humanisierte usw. Endlich vor einigen Monaten konnten für zwei Antikörper klinische Versuche der Phase III in den USA begonnen werden. Versuche der Phase III bedeuten, dass an einer statisch relevanten Zahl von Patienten die Wirksamkeit der neuen Methode gezeigt wird, um dann die Zulassung für die klinische Routine zu beantragen.

Beide Antikörper sind gegen spezifische Blutzellenantigene gerichtet. Der ^{131}I -Anti-B1 (IgG_{2a} murin) Antikörper der Firma Coulter richtet sich gegen das CD-20-B-Zellen-Antigen, welches auf malignen Blutzellen stark überexprimiert ist. Der ^{131}I -Lym 1 (IgG_{2a} murin) Antikörper von Techniclone richtet sich gegen das HLA-DR₁₀-B-Zellen-Antigen, welches nur auf malignen B-Zellen vorkommt. Für letzteren hat unsere Arbeitsgruppe die nötigen Technologien entwickelt, um ein optimal markiertes, stabiles, pharmazeutisch einwandfreies Präparat der Klinik zur Verfügung zu stellen. Mit beiden Antikörpern können bestimmte Non-Hodgkin's Lymphome geheilt werden. Im Moment gibt es z. B. rund 200 000 Patienten mit Non-Hodgkin's Lymphome in den USA, davon 35% in tiefer Malignität und der Rest in mittlerer und hoher Malignität. Von diesen reagieren etwa 20% weder auf Chemo- noch auf Strahlentherapie. Genau diese Patienten sind die Zielgruppe der oben beschriebenen Antikörper. Auf der Tab. 3 sind die Resultate der Phase-II-Studie zusammengestellt. Ein wichtiges Ergebnis zeigt, dass mit einer Radioaktivitätsmenge von 27–37 Gbq/m² knapp 50% der behandelten Lymphomtumoren vollständig verschwunden sind (WILDER et al., 1996). Mit diesen ^{131}I -anti-Lymphom-Antikörpern steht erstmals ein Radioimmunokongjugat und damit nach langen erfolglosen Jahren wieder ein neues Radiotherapeutikum vor der Routine-Einführung. Ist damit der Durchbruch der systemischen Radioimmunotherapie geschafft?

³ Weitgehender Ersatz des Mausproteins durch menschliches IgG₁

Tab. 3. ¹³¹I-Lym-1 Phase II klinische Versuche.

Tab. 3. ¹³¹I-Lym 1 Phase II clinical trials.

injizierte Aktivität (mCi/m ²)	Patientenzahl	komplette Remission (%)	Teilremission (%)
10-25	16	2 (13 %)	5 (31 %)
25-40	15	1 (7 %)	9 (60 %)
40-75	10	1 (10 %)	3 (30 %)
75-100	13	6 (46 %)	3 (23 %)
Total von Patienten	54	10 (19 %)	20 (37 %)

3 OFFENE PROBLEME DER RADIOIMMUNOTHERAPIE

Wir haben in den letzten Jahren intensiv mit einem chimären anti-Neuroblastom-Antikörper chCE7 gearbeitet (NOVAK-HOFER et al., 1994, 1995, 1997). Es handelt sich um einen IgG1, gerichtet gegen ein Neuroblastom-assoziiertes Zelloberflächenprotein (MG = 190 000), der mit hoher Aktivität an Neuroblastom Zellen bindet, keine Kreuzreaktionen mit menschlichem Normalgewebe zeigt und in die Neuroblastom Zellen internalisiert. Der murine Antikörper wurde im Labor von Prof. Blaser, SIAF, Davos, entwickelt, und die Chimärisierung wurde von Dr. Amstutz, SRK, Bern, durchgeführt. Das Antigen wurde von uns identifiziert und ist ein Zelloberflächenprotein der L1-CAM-Familie (NOVAK-HOFER et al., 1997).

Das Potential des Antikörpers zeigt sich in der Behandlung von Neuroblastoma-Xenograften in Nacktmäusen (siehe Abb. 2). Im Vergleich zur Behandlung mit dem bereits eingeführten ¹³¹I-MIBG schneidet der ¹³¹I-chCE7 deutlich überlegen ab, da jegliches Tumorwachstum über die ganze Untersuchungszeit verhindert wird. Diese und andere Resultate waren so überzeugend, dass wir klinische Untersuchungen der Phase I mit dem Krebsforschungsinstitut in Amsterdam gestartet haben. Abb. 3 zeigt die Anreicherung des Iodmarkierten Antikörpers in den Neuroblastometastasen (Knochenmarksinfiltrationen) eines Kindes. Die Anreicherung ist sehr ausgeprägt und die andern Gewebe und Organe zeigen wenig unspezifische Aufnahme. Im geplanten nächsten Schritt wird die injizierte Aktivität soweit gesteigert, dass die Tumorzellen abgetötet werden, ohne die gesunden Zellen zu schädigen.

An diesem Beispiel kann auch ein entscheidender Parameter der Radionuklidtherapie klar gemacht werden, nämlich das Radioaktivitätsverhältnis Tumor/Nichttumor und die da-

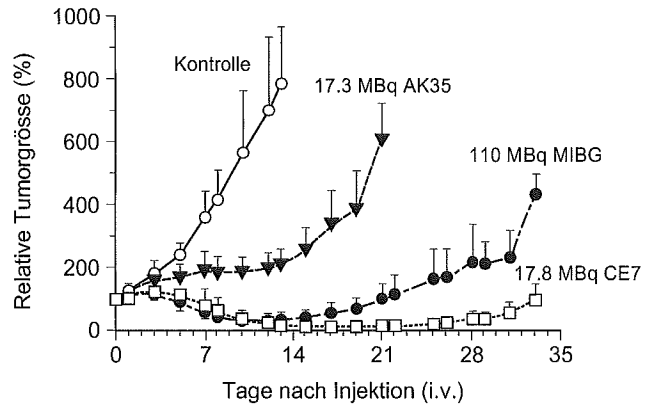


Abb. 2. ¹³¹I MIBG vs ¹³¹I chCE7. Wachsen von SK-N-SH subkutan Xenograften (Krebsforschungsinstitut Amsterdam, Dr. M. Rutgers).

Fig. 2. ¹³¹I MIBG vs ¹³¹I chCE7. Growth of SK-N-SH subcutaneous xenografts (Cancer Research Institute, Amsterdam, Dr. M. Rutgers).

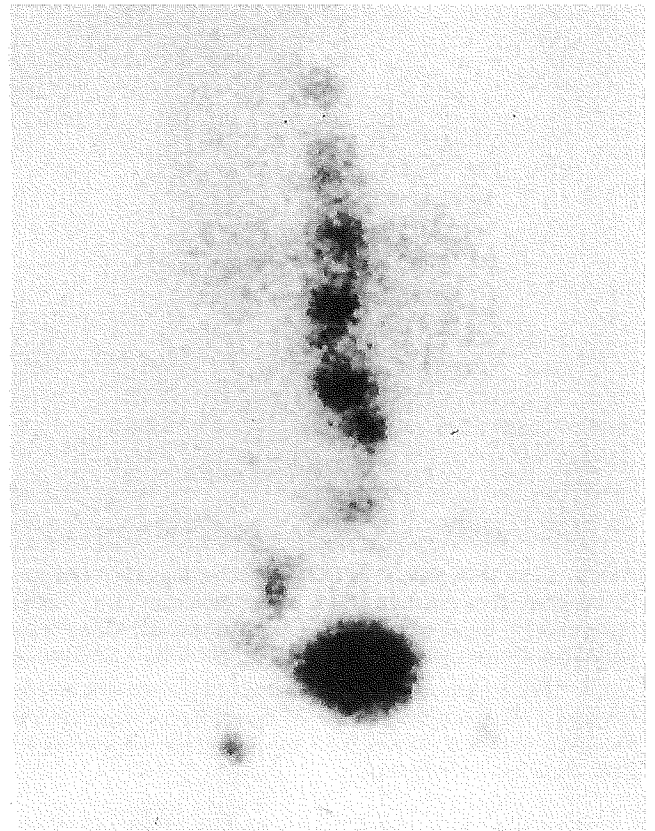


Abb. 3. ¹³¹I-chCE7: SPET (Single Photon Emission Tomography)-Aufnahme eines Kindes mit Neuroblastoma-Infiltrationen im Knochenmark (Katharinenhospital, Stuttgart, PD Dr. H. Bihl).

Fig. 3. ¹³¹I-chCE7: SPET-image of a child with Neuroblastoma infiltration in bone marrow (Katharinenhospital, Stuttgart, PD Dr. H. Bihl).

mit erreichbare Tumordosis bzw. die damit verbundene kritische (noch unschädliche) Dosis für die gesunden Organe. Heute reicht dieses Verhältnis nur unter guten Umständen für eine Tumorthherapie, das heisst z. B. bei sehr affinen und spezifischen Antikörpern gegen gut durchblutete Tumoren wie im Fall der geschilderten Lymphome oder Neuroblastome. Weitere z. T. offene Fragen betreffen die Immunogenizität des verwendeten Vehikels oder die physikalischen Charakteristika des Radionuklides. Was ist aber zu tun, um diese Probleme zu lösen und auch andere Tumore erfolgreich zu behandeln?

4 KONZEPT DER RADIONUKLIDTHERAPIE FORSCHUNG

Um die angesprochenen Probleme anzugehen, ist es vielleicht vorteilhaft, das Gesamtvorhaben Radiotherapeutika forschungsmässig in drei Teilvorhaben zu zerlegen und einzeln zu betrachten (SCHUBIGER et al., 1996). Es sind dies erstens die Fragen um das Therapienuklid und die eventuell dazu nötigen Chelatoren, zweitens die Frage des richtigen Vehikels und schliesslich drittens die geeignete Verbindung zwischen Radionuklid und Vehikel (siehe Abb. 4). Bei jeder Änderung eines Teilaspektes müssen wieder die Auswirkungen auf das Verhalten des Gesamtmoleküls geprüft werden. Das «optimale» Radiotherapeutikum ist ein zwischen biologischen und physikalischen Ansprüchen sorgfältig austarierendes und richtig verbundenes Paar Radionuklid-Vehikel. In der Abb. 4 sind stichwortartig angegeben, welche Fragen unsere Forschung zu beantworten sucht. In den folgenden Kapiteln werden einige etwas detaillierter diskutiert.

4.1 Therapeutisch wirksame Radionuklide

Die therapeutisch wirksame Strahlung ist durch einen hohen LET⁴ gekennzeichnet. Die Energie der Strahlung und der LET bestimmen deren Reichweite im Gewebe. Mögliche Strahlenarten für therapeutische Zwecke sind β⁻, Auger-, Konversionselektronen und α-Strahlen. γ-Strahlung andererseits hat einen sehr kleinen LET, d. h. grosse Reichweite und ist damit für diagnostische Zwecke geeignet, therapeutisch trägt sie nichts zur Tumordosis, aber erheblich zur Gesamtkörperdosis bei. In Tab. 4 ist eine Auswahl von möglichen Therapienukliden zusammengestellt. Die Reichweite des Augerelektronenemitters ⁷⁶Ga beträgt gerade den Durchmesser eines Zellkerns. Dieses Therapienuklid wird also nur

⁴ LET = Linearer Energie-Transfer

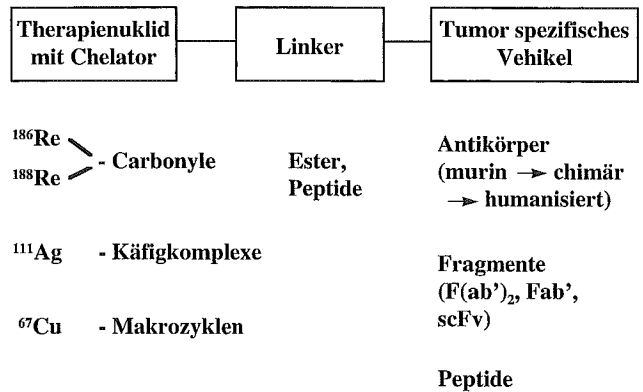


Abb. 4. Konzept Radionuklidtherapie Forschung.

Fig. 4. Concept of radionuclide therapy research.

wirksam, wenn es durch ein entsprechendes Vehikel bis in die Zelle an den Zellkern transportiert wird. Dies genau nur für die Tumorzellen zu erreichen, ist nicht ganz trivial. Bei dem α-Emmitter ²¹¹At beträgt die Reichweite eine oder wenige Zelldurchmesser. In dem Fall müsste also garantiert sein, dass die Vehikel jede Tumorzelloberfläche erreichen, um eine sichere Sterilisation des Tumors zu erreichen. Auch das ist, insbesondere bei soliden Tumoren, nicht ganz einfach zu bewerkstelligen.

Aus diesen Gründen ziehen wir im Moment β⁻-emittierende Radionuklide vor, die 10 bis 100 Zellagen erreichen können und durch sogenanntes Kreuzfeuer damit auch von den Vehikeln unerreichte Tumorzellen zerstören können. In dieser Gruppe befindet sich auch das schon erfolgreich eingesetzte ¹³¹I, sein Nachteil ist der hohe Anteil an γ-Strahlen (82%). Als Alternativen bieten sich unter andern die metallischen Radionuklide ¹⁸⁶Re, ⁶⁷Cu, ⁹⁰Y oder ¹¹¹Ag an. Ihre Reichweiten und physikalischen Halbwertszeiten sind verschie-

Tab. 4. Auswahl von Radionukliden mit therapeutischem Potential.

Tab. 4. Selection of radionuclides with therapeutic potential.

Strahlen-typ	Nuklid (T 1/2)	Energie mittlere [keV]	Reichweite mittlere	Eγ (%) [keV]
Auger	⁶⁷ Ga (3.26 d)	< 10	< 10 nm	185 (24)
β ⁻	¹⁸⁶ Re (3.77 d)	350	1 mm	137 (21)
	¹³¹ I (8.04 d)	180	0.3 mm	364 (82)
	¹¹¹ Ag (7.47 d)	350	1 mm	342 (6)
	⁹⁰ Y (2.67 d)	930	4 mm	-
	⁶⁷ Cu (2.58 d)	141	0.2 mm	185 (45)
α	²¹¹ At (7.2 d)	5900 7500	≈ 65 μm	n.d.

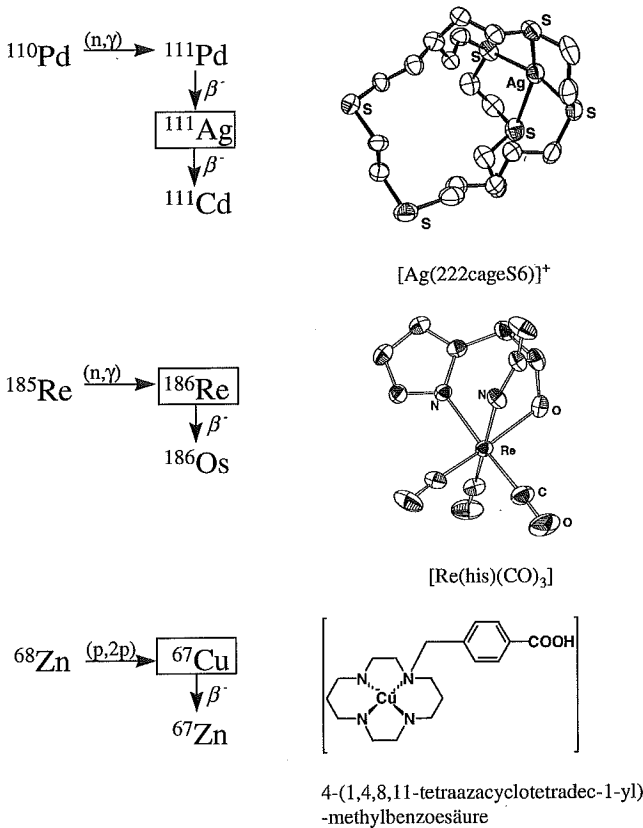


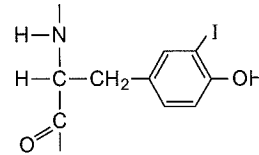
Abb. 5. Herstellung von ausgewählten Radionukliden und mögliche Chelatoren.

Fig. 5. Production of selected radionuclides and possible chelators.

den, je nach den biologischen Eigenschaften des Vehikels ist das eine oder andere vorzuziehen.

Die Herstellung dieser Radionuklide erfolgt durch die Bestrahlung geeigneter inaktiver Nuklide (sogenannte Targets) mit Protonen oder Neutronen (siehe Abb. 5). Dazu sind entsprechende Grossmaschinen wie Protonenbeschleuniger und Neutronenquelle nötig, die am Paul Scherrer Institut in Villigen vorhanden sind. Die in den Targets produzierten Radionuklide müssen durch geeignete Verfahren isoliert werden. Mit einer Extraktionsmethode wird z. B. Ag aus dem Pd abgetrennt (ALBERTO et al., 1992), während das Cu aus dem Zn mit Ionenaustauschersäulen isoliert wird (SCHWARZBACH et al., 1995). Schwieriger ist der Fall, wenn wie beim ¹⁸⁵Re das Targetmaterial chemisch mit dem produzierten Radionuklid ¹⁸⁶Re identisch ist. In diesem Falle kann nur über Umwege versucht werden (BLAEUENSTEIN et al., 1993), wenigstens das Verhältnis radioaktiv/inaktiv zu verbessern. Dieses Verhältnis bezeichnet man als spezifische Radioaktivität, sie sollte möglichst hoch sein, um die Menge Vehikel möglichst

Iodierung: Tyrosinreste werden mit ¹³¹I iodiert



Kupfer-Markierung: Lysinreste werden mit einem 14N4 makrozyklischen Chelator derivatisiert und mit ⁶⁷Cu markiert

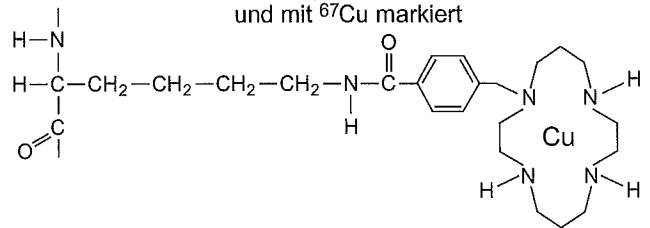


Abb. 6. Markierung des Antikörpers chCE7.

Fig. 6. Labelling of antibody chCE7.

klein zu halten. Metallische Radionuklide können nicht direkt kovalent an Proteine gebunden werden, deshalb werden geeignete Chelatoren gebraucht, um sie zu komplexieren, Beispiele sind in der Abb. 5 gegeben (SCHUBIGER et al., 1996). Schliesslich können die Radionuklidkomplexe über funktionelle Gruppen an das gewünschte Vehikel gekoppelt werden. In der Abb. 6 ist die direkte Markierung mit ¹³¹I und dazu im Vergleich jene mit ⁶⁷Cu über Chelator und funktionelle Gruppe dargestellt. Hinzuweisen ist noch, dass I über einen Tyrosinrest und das Cu-Konjugat über einen Lysinrest an das Protein-Vehikel gebunden wird. Ein Vergleich dieser Markierungsmethoden ist mit dem chCE7-Antikörper durchgeführt worden. Die Anwendung an Nacktmäusen mit entsprechenden Xenograften⁵ ergibt sehr interessante Resultate (Abb. 7A). Einerseits ist die Anreicherung des Cu-markierten Antikörpers im Vergleich zum I-markierten im Tumor höher und im Blut tiefer (viel besseres Tumor-Nichttumor-Verhältnis!), andererseits ist aber auch die unerwünschte Anreicherung in Leber, Milz und Niere klar erhöht. Damit stellte sich die Frage, wie die gewonnenen Verbesserungen beibehalten und die Verschlechterungen korrigiert werden können?

4.2 Einfluss von Chelatoren, Linkern und Vehikeln

Eine der Möglichkeiten, das biokinetische Verhalten zu beeinflussen, liegt bei der Änderung des Vehikels. Im Experiment oben wurden intakte Antikörper eingesetzt. Diese haben

⁵ Mäuse mit subkutanen Tumoren aus menschlichen Tumorzellen

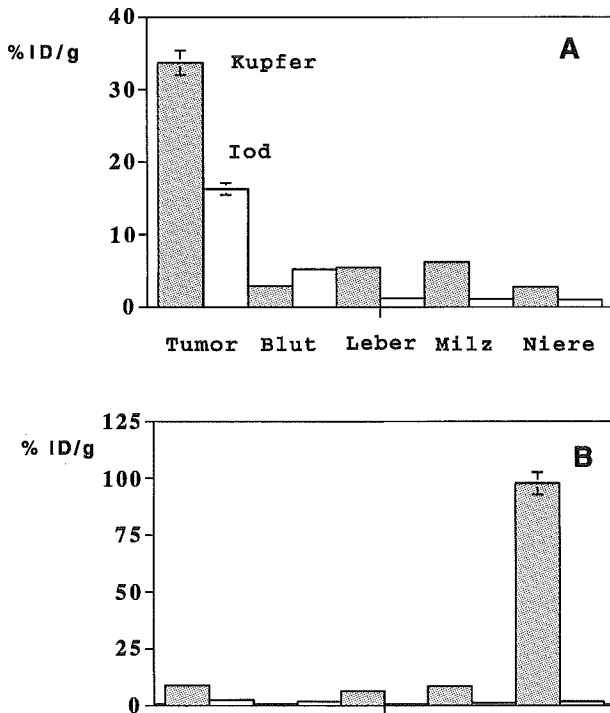


Abb. 7. Bioverteilung in Nacktmäusen mit Neuroblastoma Xenograften:

- A) intakter Antikörper chCE7: 4 Tage p.i.
- B) F(ab')₂-Fragment chCE7: 8h p.i.

Fig. 7. Biodistribution in nude mice with neuroblastoma xenografts:

- A) intact antibody chCE7: 4 days p.i.
- B) F(ab')₂-fragments chCE7: 8 days p.i.

ein Molekulargewicht von ca. 150 000 und eine biologische Halbwertszeit von einigen Tagen, während Antikörperfragmente⁶ (ca. MG 100 000) schneller ausgeschieden werden. Der Vergleich wurde mit I- und Cu-markierten Antikörperfragmenten von chCE7 wiederholt. Die Abb. 7B zeigt die Resultate. Verglichen mit den intakten Antikörpern zeigen die Cu-Fragmente wegen der schnelleren Kinetik eine tiefere Tumoranreicherung, da aber (wie erwartet) auch die Blutaktivität tiefer liegt, bleibt das Verhältnis Tumor/Blut hoch. Andererseits sind aber die Aktivitätsanreicherung in Leber und Milz leicht und jene in der Niere dramatisch angestiegen. Um die Ursache zu ergründen, sind auch Fragmente von anderen Antikörpern geprüft worden; sie zeigten ähnlich schlechte Nierenwerte (RUTHERFORD et al., 1997). In welcher Form bleiben Radioimmunkonjugate in der Niere stecken?

Die Autografie von Nierenschnitten von Ratten, denen ein ⁶⁷Cu-markiertes Antikörperfragment injiziert worden war, zeigte eine Anreicherung der Radioaktivität in den kortikalen Bereichen der Niere. Nun wurde versucht mit einer HPLC⁷ Analyse die radioaktiven Metaboliten in den Homogenaten aus Nierenzellen, Leberzellen, Tumorzellen und Tumorxenograften zu identifizieren. Im Vergleich mit synthetisierten Standards zeigte sich, dass die Hauptaktivität in allen Fällen von dem Cu-Komplex (Cu-CPTA) gebunden an die Aminosäure Lysin stammt (siehe auch Abb. 6). Dieser Metabolit ist das Endabbauprodukt, welches beim proteolytischen Abbau des Cu-markierten Antikörpers übrigbleibt. Der relativ lipophile und durch den Lysinrest positiv geladene Metabolit wird in (den Glomäruli und proximalen Tubuli) der Niere zurückgehalten. Um diese Akkumulation zu vermindern, ergaben sich zwei Möglichkeiten die Ausscheidung positiv zu beeinflussen. Einerseits kann versucht werden den Cu-Komplex hydrophiler zu machen und andererseits einen Peptidlinker zwischen Chelator und Antikörper einzuführen, der zu einem anderen Cu-Komplex – Aminosäurekonjugat als Endprodukt führt.

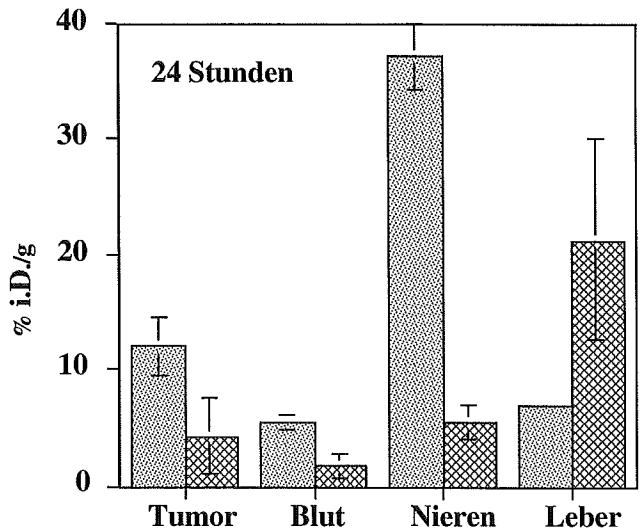


Abb. 8. Bioverteilung in Nacktmäusen mit Colon Carcinom Xenograften:

- ⁶⁷Cu-CPTA-mAK35-F(ab')₂
- ⁶⁷Cu-D03A-mAK35-F(ab')₂

Fig. 8. Biodistribution in nude mice with colon carcinoma xenografts:

- ⁶⁷Cu-CTPA-mAB35 F(ab')₂
- ⁶⁷Cu-DO3A-mAB35 F(ab')₂

⁶ Fragment = F(ab')₂-Fragment (intakter Antikörper ohne den konstanten Fc-Teil)
⁷ HPLC = High Performance Liquid Chromatography

Im ersten Schritt haben wir den Makrozyklus des Cu-Komplexes verändert. An den drei freien N-Atomen wurde je eine Carboxylgruppe eingeführt. Dieser DO3A genannte Komplex hat eine negative Gesamtladung, wird sich also hydrophiler verhalten. Wir haben den Vergleich von ^{67}Cu -CPTA und ^{67}Cu -DO3A mit einem Fragment eines anti-Coloncarcinom-Antikörpers (anti-CEA) an entsprechenden Xenograften in Nacktmäusen durchgeführt. In Abb. 8 sind die wichtigsten Resultate dargestellt. Positiv zeigt sich ganz klar die erwartete Abnahme der Nierenanreicherung. Negativ andererseits ist aber auch die Tumoranreicherung erniedrigt und

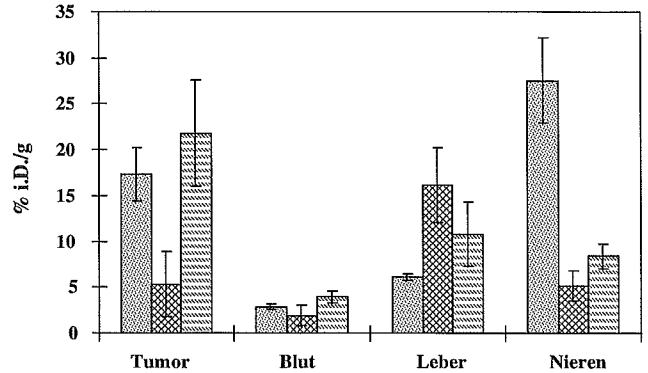


Abb. 10. Bioverteilung in Nacktmäusen mit Colon Carcinom Xenographen:

- ^{67}Cu -CPTA-mAK35-F(ab')₂
- ^{67}Cu -DO3A-mAK35-F(ab')₂
- ^{67}Cu -DO3A-R1-F(ab')₂

Fig. 10. Biodistribution in nude mice with colon carcinoma xenografts:

- ^{67}Cu -CTPA-mAB35 F(ab')₂
- ^{67}Cu -DO3A-mAB35 F(ab')₂
- ^{67}Cu -DO3A-R1-F(ab')₂

die Leberanreicherung erhöht, beides eine weitere Verschlechterung.

Im zweiten Schritt haben wir einen zusätzlichen Peptidlinker zwischen Chelator und Antikörper eingeführt. Auf Grund von Erkenntnissen aus der Literatur haben wir uns für die Kombinationen Gly-Gly-Gly, Gly-Phe-Gly und Gly-Pro-Gly entschieden (siehe Abb. 9). Die Biodistributionen der verschiedenen ^{67}Cu -DO3A-Peptid-anti-CEA-Fragmente sind unterschiedlich ausgefallen. Als bester Peptidlinker erwies sich die Gly-Gly-Gly-Kombination. In der Abb. 10 sind diese Resultate im Vergleich zu den oben dargestellten (Abb. 8) zusammengefasst. Jetzt bewegen sich die Resultate in der erwünschten Richtung: Tumoranreicherung wieder hoch, Blutwerte tief, Leberaktivität wieder deutlich tiefer und Nierenaktivität bleibt tief.

Die beschriebenen Experimente und Resultate zeigen die Komplexität des Bioverhaltens von Radioimmunokonjugaten. Die Änderungen an einem Teil des gesamten Radioimmunokonjugates führen durch die Beeinflussung der andern Teile zu manchmal unerwarteten und überraschenden Ergebnissen. Die hier beschriebenen Forschungsarbeiten sind exemplarisch auch für die andern in Abb. 4 aufgezeigten Variationen und Möglichkeiten an neuartigen Radioimmunokonjugaten für die Radionuklidtherapie.

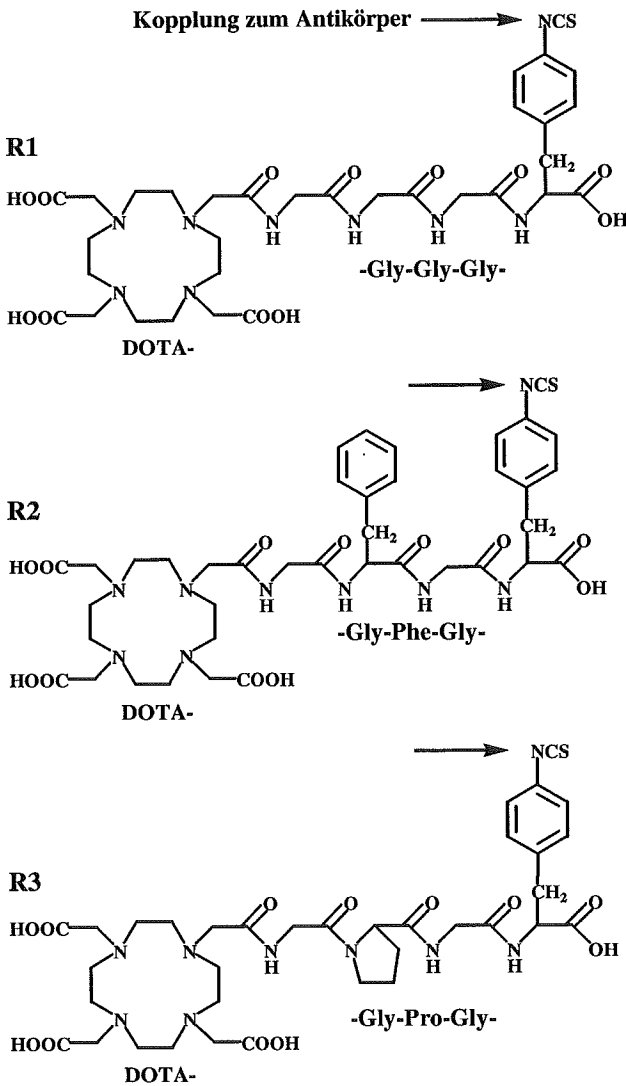


Abb. 9. Chelatoren gekoppelt an Peptid Linkern zur Markierung von Antikörpern.

Fig. 9. Chelators coupled with peptide linkers for the labelling of antibodies.

5 AUSSICHTEN

Der Einsatz neuer Radiotherapeutika zur Behandlung von Tumoren hat in diesem Jahr mit der Einführung von ^{131}I -Antikörpern zur erfolgreichen Bekämpfung von Lymphomen einen entscheidenden Fortschritt gebracht. Es ist dies das erste klinisch relevante Ergebnis nach Jahren intensiver Forschung auf dem Gebiet der therapeutischen Radioimmunkonjugate. Weitere Fortschritte mit optimaleren Radionuklid-Linkern und massgeschneiderten Vehikeln sind zu erwarten, erste Präparate mit verbesserten Eigenschaften stehen in Phase I/II-Versuchen. Für die Zukunft kann erwartet werden, dass die nebenwirkungsarme Radionuklidtherapie häufiger in der systemischen Behandlung von Tumoren erfolgreich eingesetzt werden kann.

6 VERDANKUNG

Ich danke all meinen MitarbeiterInnen für ihre sorgfältige und effiziente Forschungsarbeit. Frau Dr. I. Novak danke ich für kritische Durchsicht und Frau E. Tendon für das Schreiben des Manuskriptes.

7 LITERATUR

ALBERTO, R., BLAEUENSTEIN, P., NOVAK-HOFER, I., SMITH, A. & SCHUBIGER, P.A. 1992. An improved method for the separation of ^{111}Ag from irradiated natural palladium. – *Appl. Radiat. Isot.* 43 (7), 869–872.

BLAEUENSTEIN, P., CAHN, R.M., ALBERTO, R. & SCHUBIGER, P.A. 1993. The Szillard-Chalmers effect as a means to improve the specific activity of Rhenium-186. – *Abstr. Nucl.*, 33, 205th Amer. Chem. Soc. Natl. Meeting, Denver.

COMMISSION OF THE EC. European strategy for cancer research. – XII/F-6/AV/NV/90001 Publ., 1–16.

HOEFNAGEL, C.A. 1991. Radionuclidetherapy revisited. – *Eur. J. Nucl. Med.* 18, 408–431.

NOVAK-HOFER, I., AMSTUTZ, H.P., MORGENTHALER, J.-J. & SCHUBIGER, P.A. 1994. Internalisation and degradation of monoclonal antibody chCE7 by human neuroblastoma cells. – *Int. J. Cancer* 57, 427–432.

NOVAK-HOFER, I., AMSTUTZ, H.P., MAECKE, H.R., SCHWARZBACH, R., ZIMMERMANN, K., MORGENTHALER, J.J. & SCHUBIGER, P.A. 1995. Cellular processing of copper-67-labelled monoclonal antibody chCE7 by human neuroblastoma cells. – *Canc. Res.* 55, 46–50.

NOVAK-HOFER, I., ZIMMERMANN, K., MAECKE, H.R., AMSTUTZ, H.P., CARREL, F. & SCHUBIGER, P.A. 1997. Tumor uptake and metabolism of copper-67-labelled monoclonal antibody chCE7 in nude mice bearing neuroblastoma xenografts. – *JNM* 38 (4), 536–544.

NOVAK-HOFER, I., MELI, M., CARREL, F., WAIBEL, R., AMSTUTZ, H. & SCHUBIGER, P.A. 19.–24. September 1997. The cell surface phosphoprotein recognised by anti-neuroblastoma antibody chCE7 is related to L1 cell adhesion molecules. – 25th Meeting of the international society for oncogene development biology and medicine, Montreux.

RUTHERFORD, R.A.D., SMITH, A., WAIBEL, R. & SCHUBIGER, P.A. 1997. Differential inhibitory effect of L-lysine on renal accumulation of ^{67}Cu -labelled F(ab')₂ fragments in mice. – *Int. J. Cancer* 72, 522–529.

SCHUBIGER, P.A., ALBERTO, R. & SMITH, A. 1996. Vehicles, chelators and radionuclides: Choosing the «building blocks» of an effective radioimmunoconjugate. *Bioconjugate Chem.* 7, 165–179.

SCHWARZBACH, R., ZIMMERMANN, K., BLAEUENSTEIN, P., SMITH, A. & SCHUBIGER, P.A. 1995. Development of a simple and selective separation of ^{67}Cu from irradiated zinc for use in antibody labelling: a comparison of methods. – *J. Appl. Rad. and Isot.* 46, 329–336.

WILDER, R.B., DENARDO, G.L. & DENARDO, S.J. 1996. Radioimmunotherapy – Recent Results and Future Directions. – *J. Chem. Onc.* 14 (4), 1383–1400.

Prof. Dr. phil. II P. August Schubiger, Center for Radiopharmaceutical Science, ETH, PSI und USZ, Paul Scherrer Institut, CH-5232 Villigen PSI