

Fraktionierte lokoregionale
Radioimmuntherapie mit
 ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk

Silvia Rötzer

**Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München**

Arbeit angefertigt unter der Leitung von

Prof. Dr. med. vet. Eckhard Wolf, Dipl. ECAR, ECLAM

**Angefertigt an der Nuklearmedizinischen Klinik und Poliklinik
des Klinikums Rechts der Isar, Technische Universität München
(Prof. Dr.med. Dr. phil. Reingard Senekowitsch-Schmidtke)**

**FRAKTIONIERTE LOKOREGIONALE RADIOIMMUNTHERAPIE MIT ²¹³Bi-
ANTI-EGFR-MAK**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde

der Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Silvia Rötzer

aus Stockerau / Österreich

München, 2013

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun
Berichtersteller: Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Birgit Viertböck

Tag der Promotion: 20. Juli 2013

Meiner Familie

INHALT

1.	Einleitung.....	1
1.1	Zielsetzung und Fragestellung.....	1
1.2	Pathologie des Harnblasenkarzinoms.....	2
1.2.1	Aufbau des Urothels.....	2
1.2.2	Urotheliale Tumorentstehung.....	4
1.2.3	Die WHO-Klassifikation.....	4
1.2.4	Risikofaktoren für Harnblasenkarzinome.....	6
1.2.5	Klinische Symptome für Harnblasenkarzinome.....	7
1.2.6	Therapie des Harnblasenkarzinoms.....	7
1.2.7	Lokoregionale α -Radioimmuntherapie als neue Therapieform des nicht-muskelinvasiv wachsenden Harnblasenkarzinoms.....	12
2.	Literaturübersicht der Radioimmuntherapie von Tumoren.....	14
2.1	Radioimmuntherapie von Tumoren.....	14
2.1.1	α - und β - Strahler in der Radioimmuntherapie.....	15
2.1.2	Monoklonale Antikörper als Carrier für das Radionuklid.....	17
2.1.3	Der EGF-Rezeptor und spezifische anti-EGFR-Antikörper für die Therapie des Harnblasenkarzinoms.....	17
2.1.4	Antikörperbindung von ^{213}Bi	18
2.2	Modelle für die α -Radioimmuntherapie an der Maus.....	19
2.3	Biolumineszenz Imaging.....	21
3.	Material und Methoden.....	22
3.1	Materialien, Chemikalien und pharmakologische Wirkstoffe.....	22
3.1.1	Zellkulturmedien.....	22
3.1.2	Anästhesie und Analgesie.....	22
3.1.3	Sonstiges.....	22
3.2	Geräte.....	24
3.3	Verwendete Antikörper.....	25

3.3.1	Anti-EGFR Antikörper EMD 72000 (Matuzumab)	25
3.4	$^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ – Generator	25
3.5	Actinium-225 (^{225}Ac - Zerfallsschema)	26
3.6	Zelllinien und Zellkultur	27
3.6.1	Zelllinien des humanen Harnblasenkarzinoms	27
3.6.2	Kultivierung der Zellen	27
3.6.3	Transfektion der EJ28 Zellen	28
3.6.4	Chelatierung der Antikörper	28
3.6.5	Markierung der chelatierten Antikörper mit ^{213}Bi	29
3.6.6	Bindungsstudien	29
3.7	Tierexperimente	30
3.7.1	Haltung der Versuchstiere	30
3.7.2	Methodik der Zellinstillation von EJ 28-luc Harnblasenkarzinomzellen	30
3.7.3	Biolumineszenz Imaging	32
3.7.4	Lokoregionale Alpha-Radioimmuntherapie des Blasenkarzinoms	33
3.7.5	Tötung und Sektion der Tiere	35
3.8	Histologie	35
3.8.1	Anfertigung von Paraffinschnitten	35
3.8.2	Hämatoxilin-Eosin (HE)-Färbung der Paraffinschnitte	36
3.8.3	Autoradiographie der Blasenschnitte mittels Micro-Imager	36
3.8.4	Immunhistochemischer Nachweis des EGF-Rezeptors	36
3.9	Statistik der Überlebensdaten	37
4.	Ergebnisse	39
4.1	Charakterisierung der verwendeten Zelllinien	39
4.1.1	Proliferation der Zellen in vitro	39
4.1.2	Transfektion der EJ28 Zellen	39
4.2	Antikörpermarkierung mit ^{213}Bi	40
4.3	Tierexperimente	41

4.3.1	Tumorangehrate nach Injektion von EJ28-luc Blasenkarzinomzellen.....	41
4.3.2	Biolumineszenz Imaging der Urothelkarzinome.....	41
4.3.3	Therapeutische Effizienz der Radioimmuntherapie beim Harnblasenkarzinom	45
4.4	Histologie.....	52
4.4.1	Histologie des gekauterten, murinen Blasenurothels	52
4.4.2	Histologische Bestätigung der Ausbreitung des Tumors nach Biolumineszenz Imaging	53
4.4.3	Messung der Verteilung von ²¹³ Bi-anti-EGFR-MAk im Blasengewebe mittels Autoradiographie.....	56
4.4.4	EGFR-Expression des etablierten Blasentumors.....	57
4.4.5	Toxizität.....	60
5.	Die Pleurakarzinose	61
5.1	Einleitung.....	61
5.1.1	Pathologie der Pleurakarzinose	61
5.1.2	Therapie der Pleurakarzinose	62
5.2	Material und Methoden.....	64
5.2.1	Zelllinien und Zellkultur.....	64
5.2.2	Verwendete Antikörper	64
5.2.3	Transfektion der A549 Zellen.....	65
5.2.4	Bindungsstudien	65
5.2.5	Scatchard Analyse	66
5.2.6	Tierexperimente.....	67
5.3	Ergebnisse	68
5.3.1	Proliferation der Zellen in vitro.....	68
5.3.2	Transfektion der A549 Zellen.....	68
5.3.3	Bindungsstudien mit A549 und LLC Zellen	70
5.3.4	Scatchard Analyse	70
5.3.5	Antikörpermarkierung mit ²¹³ Bi.....	71

5.3.6	Tierexperimente.....	71
5.3.7	Histologie der Pleurakarzinose.....	72
6.	Diskussion.....	75
6.1	Etablierung des murinen orthotopen Harnblasenkarzinommodells.....	76
6.2	Biolumineszenz Imaging	79
6.3	Therapeutische Effizienz der Radioimmuntherapie bei fortgeschrittenen Tumoren.....	80
6.4	Toxizität des ²¹³ Bi-Radioimmunkonjugats	84
6.5	Die Etablierung des Pleurakarzinosemodells	85
6.6	Ausblick	86
	ANHANG	89
	Zusammenfassung	92
	Summary.....	94
	Literaturverzeichnis	96
	Danksagung	113

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Harnblasenwand.....	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Bindung des ²¹³ Bi markierten anti-EGFR-Antikörpers an den EGF-Rezeptoren von Tumorzellen.....	19
Abbildung 3: Zerfallsschema von ²²⁵ Ac (modifiziert nach Ballangrud et al., 2004)	26
Abbildung 4: Katheterisieren der Tiere (aus Pfof, 2009).....	31
Abbildung 5: Legen der ROIs im Biolumineszenz Imaging.....	33
Abbildung 6: Weibliche swiss nu/nu Mäuse während lokoregionaler Applikation von ²¹³ Bi-anti-EGFR-MAk (aus Pfof, 2009).....	34
Abbildung 7: Pseudocolour-Images der Biolumineszenz von (a) 2x10 ⁶ bzw. (b) 12x10 ⁶ EJ28-luc Harnblasenkarzinomzellen	40
Abbildung 8: Biolumineszenz Imaging von zwei Tieren 30 min nach intravesikaler Zellinstillation.....	42
Abbildung 9: Intensität der Lichtemissionen im Biolumineszenz Imaging 7 Tage nach Zellinstillation.....	43
Abbildung 10: Intensität der Lichtemissionen im Biolumineszenz Imaging 14 Tage nach Zellinstillation.....	44
Abbildung 11: Intensität der Lichtemissionen im Biolumineszenz Imaging 21 Tage nach Zellinstillation.....	44
Abbildung 12: Darstellung der therapeutischen Effizienz nach Therapie mittels Biolumineszenz	45
Abbildung 13: Graphische Darstellung der quantifizierten Lichtsignale der Tumorzellen vor und nach Therapie mit 3x0,46 MBq ²¹³ Bi-anti-EGFR-MAk im Abstand von 4 Tagen (Therapiegruppe 1).....	46
Abbildung 14: Änderung der Lichtemissionen bei den Tieren der Kontrollgruppe nach Zellinstillation während einer Zeitspanne von 3 Wochen.....	47
Abbildung 15: Graphische Darstellung der quantifizierten Lichtsignale der Tumorzellen bei zwei Tieren vor und nach Therapie mit 3x0,46 MBq ²¹³ Bi-anti-EGFR-MAk im Abstand von 4 Tagen	48
Abbildung 16: Graphische Darstellung der quantifizierten Lichtsignale der Tumorzellen bei zwei Tieren vor und nach Therapie mit zweimal 0,93 MBq ²¹³ Bi-anti-EGFR-MAk im Abstand von 7 Tagen.....	48

Abbildung 17: Graphische Darstellung der quantifizierten Lichtsignale der Tumorzellen bei drei Tieren vor und nach Therapie mit $3 \times 0,46 \text{ MBq } ^{213}\text{Bi-anti-EGFR-MAk}$ im Abstand von 4 Tagen mit unterschiedlichem Ansprechen auf die Radioimmuntherapie.....	49
Abbildung 18: Darstellung eines intravesikalen Tumors bei Euthanasie eines nicht therapierten Tieres (79 Tage nach Zellinstillation)	50
Abbildung 19: Vergleich der mittleren Überlebenszeiten der Therapiegruppen mit der Kontrollgruppe und den mit dem unmarkierten Ak behandelten Tieren.....	52
Abbildung 20: Histologische Darstellung des Urothels mit Erythrozyteninfiltration in das umliegende Gewebe nach Kautervorgang.....	53
Abbildung 21: (a) Histologische Darstellung eines geringgradigen, nicht-muskelinvasiven Blasenkarzinoms; (b) Korrespondierendes Signal im Biolumineszenz Imaging	54
Abbildung 22: (a) Histologische Darstellung eines mittelgradigen, nicht-muskelinvasiven Blasenkarzinoms; (b) Korrespondierendes Signal im Biolumineszenz Imaging	55
Abbildung 23: (a) Histologische Darstellung eines hochgradigen, nicht-muskelinvasiven Blasenkarzinoms; (b) Korrespondierendes Signal im Biolumineszenz Imaging	56
Abbildung 24: (a) Autoradiographie eines tumorpositiven Paraffinschnittes der Harnblase; (b) Histologie des korrelierenden Blasentumors	57
Abbildung 25: Immunhistochemische Anfärbung des EGF-Rezeptors.	59
Abbildung 26: Urothel einer tumorfreien Maus 300 Tage nach 3-maliger intravesikaler Therapie mit $0,46 \text{ MBq } ^{213}\text{Bi-anti-EGFR-MAk}$ im Abstand von 4 Tagen	60
Abbildung 27: Setzen der Injektion für die Zellinstillation von A549 und LLC Lungenadenokarzinomzellen (eigene Darstellung).....	68
Abbildung 28: Pseudocolour Images von 1×10^6 A549-luc Zellen nach Transfektion mit dem Firefly Luciferase Gen.....	69
Abbildung 29: Generierung der Pseudocolours im Biolumineszenz Imaging	69
Abbildung 30: Grafische Darstellung des Scatchard-Plots der Zelllinie A549 zur Ermittlung der EGF-Rezeptordichte pro Zelle	71
Abbildung 31: Etablierte murine Pleurakarzinose; Tumorabsiedlungen sind im Bereich des Mediastinums sichtbar	72
Abbildung 32:(a) Solider Tumorherd am Lungengewebe; (B) Solider Tumorherd am Lungengewebe in ca. 50-facher Vergrößerung	73
Abbildung 33: (a) Mittel bis gut differenziertes Adenokarzinom der Lunge; (b) Mittel bis gut differenziertes Adenokarzinom der Lunge in ca. 50-facher Vergrößerung.....	74
Abbildung 34: Tumorwachstum bei dem unter (b) in Abbildung 8 dargestellte Tier.....	78

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: WHO-Klassifikation nicht-muskelinvasiver und muskelinvasiver, urothelialer Karzinome (nach Mostofi et al, 1999).....	6
Tabelle 2: Risikogruppen für Rezidivwahrscheinlichkeit und Progressionsrate von nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen (modifiziert nach Oosterlinck et al., 2002).....	8
Tabelle 3: Chemotherapien und Immuntherapien zur intravesikalen Instillation (modifiziert nach Sexton et al., 2010)	9
Tabelle 4: Komplikationen bei routinemäßig verwendeten intravesikalen Therapien für Urothelkarzinome (modifiziert nach Hall, 2007 und Lamm, 2005).....	12
Tabelle 5: Sonstige verwendete Arbeitsmittel.....	22
Tabelle 6: Verwendete Geräte	24
Tabelle 7: Übersicht der Behandlungsgruppen (Blasenkarzinommodell).....	34
Tabelle 8: Protokoll für die HE-Färbung.....	36
Tabelle 9: Mittlere Überlebenszeiten der tumortragenden Mäuse, der Mäuse der Kontrollgruppe und der Kaltantikörpergruppe nach Therapie	51
Tabelle 10: Detaillierte Übersicht der Ergebnisse zur Tumorgöße und zum Überleben aller verwendeten Tiere	89

Abkürzungen

Ak	Antikörper
AML	Akute Myeloische Leukämie
Anti-EGFR-MAk	Monoklonaler anti-EGFR Antikörper
AUM	Assymmetric Unit Membran
BCG	Bacillus Calmette Guerin
bFGF	Basic fibroblastic growth factor
BLI	Biolumineszenz Imaging
CIS	Carcinoma in Situ
CUP	Carcinoma with unknown primary tumour
d	Tage
dl	Deziliter
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
fg	Femtogramm
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
HRP	Horse Radish Peroxidase
HWZ	Halbwertszeit
IHC	Immunhistochemie
i.p.	Intraperitoneal
kDa	Kilo Dalton
keV	Kilovolt
kg	Kilogramm
LET	Linearer Energietransfer
MBq	Megabequerel
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer

MeV	Megavolt
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MTA	Maximal tolerierte Aktivität
ng	Nanogramm
PDGF	Platelet derived growth factor
pRb	Retinoblastomprotein
PUNLMP	Papilläre urotheliale Neoplasien mit niedrig-malignem Potential
RIK	Radioimmunkonjugat
ROI	Region of Interest
rpm	Rounds per minute
s	Sekunden
s.c.	Subcutan
TUR	Transurethrale Resektion
VEGF	Vaskular endothelial growth factor
W	Watt
ZI	Zellinstillation

1. EINLEITUNG

1.1 Zielsetzung und Fragestellung

Pfost et al. haben 2009 im orthotopen Mausmodell gezeigt, dass der α -Strahler ^{213}Bi , gekoppelt an einen monoklonalen Antikörper gegen den epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR) freiflotierende Harnblasenkarzinomzellen nach Setzen von urothelialen Läsionen, entsprechend den Läsionen nach transurethraler Tumorsektion (TUR) beim Menschen, bei 90% der Versuchsmäuse effizient abtötet, wenn er einmalig eine Stunde nach intravesikaler Instillation der Harnblasenkarzinomzellen verabreicht wird (Pfost et al., 2009). Diese lokoregionale α -Radioimmuntherapie des Harnblasenkarzinoms wurde mit der intravesikalen Chemotherapie mittels Mitomycin C verglichen. Hierbei erwies sich das Radioimmunkonjugat (RIK) bei gleicher therapeutischer Effizienz als nebenwirkungsfreier (Pfost et al., 2009).

Die in dieser Arbeit beschriebene Studie sollte die therapeutische Effizienz einer fraktionierten intravesikalen Therapie mit dem α -Strahler ^{213}Bi , gekoppelt an einen monoklonalen anti-EGFR-Antikörper (^{213}Bi -anti-EGFR-MAk) bei fortgeschrittenem Tumorwachstum im bereits etablierten Mausmodell des humanen Urothelkarzinoms evaluieren. Voraussetzung dafür war die Möglichkeit der Darstellung des Tumorwachstums *in vivo*, was durch die vorherige Transfektion der instillierten Tumorzellen mit Luciferase, und die dadurch ermöglichte Messung der Lichtemissionen im Biolumineszenz Imaging erreicht werden konnte. Die Therapie wurde begonnen, wenn erstmalig ein Signal im Biolumineszenz Imaging wahrgenommen werden konnte, wobei das Vorhandensein maligner Zellen vor Therapie histologisch bestätigt wurde.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die histologische Evaluierung des gesunden Urothels auf Strahlenschäden, um so die ausschließliche zytotoxische Wirkung des ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk auf die Tumorzellen nach Bindung des MAk zu beweisen.

Mit der Etablierung eines Modells der Pleurakarzinose sollte ein weiteres orthotopes xenotransplantiertes Tiermodell zur lokoregionalen Alpha-Radioimmuntherapie entwickelt werden. Dazu musste eine geeignete Zelllinie und ein geeigneter monoklonaler Antikörper, der an diese Zellen bindet eingesetzt werden. Ziel war es auch, nach Etablierung des Modells eine stabile Transfektion von Lungenkarzinomzellen mit dem für Firefly Luciferase kodierenden Gen

vorzunehmen, um für die Zukunft das Tumorwachstum und die Wirkung einer nachfolgenden Therapie mittels Biolumineszenz Imaging in vivo verfolgen zu können. Zur Etablierung des Modells wurden die Zelllinien A549 und LLC in vivo getestet. Parallel dazu wurden Bindungsstudien der Zellen an die verfügbaren Antikörper durchgeführt. Dabei stellte sich nur erstere Zelllinie als geeignet für nachfolgende Therapiestudien heraus. Aus diesem Grund wurden eine Transfektion der Zellen und eine EGF Rezeptorquantifizierung ausschließlich mit der A549 Lungenadenokarzinomzelllinie durchgeführt.

In den folgenden Kapiteln werden zunächst die Pathologie und Therapie des Harnblasenkarzinoms und in Kapitel 5 die Pleurakarzinose beschrieben.

1.2 Pathologie des Harnblasenkarzinoms

Das Harnblasenkarzinom ist der vierthäufigste bösartige Tumor bei Männern und wurde 2012 an die achte Stelle der tumorbedingten Todesfälle gesetzt (American Cancer Society, 2012; Sexton et al., 2010). Es sind viermal mehr Männer als Frauen davon betroffen (Jemal et al., 2005). In Deutschland befindet sich das Harnblasenkarzinom bei Männern an fünfter Stelle, bezogen auf die Gesamtheit der Krebstodesfälle (Sökeland 1993; Saleh-Birjandi, 2007). Primäre, urotheliale Tumoren sind zu 95% innerhalb der Harnblase zu finden. Bei Erstauftreten der Erkrankung sind die Patienten meist zwischen 50 und 70 Jahre alt. (Lynch et al., 1995; Sexton et al., 2010). Wenn Menschen unter 50 Jahren betroffen sind handelt es sich meistens um Tumoren mit besserer Langzeitprognose als bei Patienten über 50 Jahren (Linn et al., 1998; Sexton et al., 2010). 75% der erstmals diagnostizierten Blasenkarzinome sind nicht-muskelinvasiv. Sie infiltrieren die Blase nicht über die Lamina propria hinaus. Bei ungefähr 90% der Patienten mit nicht-muskelinvasiver Krankheit handelt es sich um Karzinome des Übergangsepithels der Harnblase, des Urothels. Die restlichen 25% der erstmals diagnostizierten Blasenkarzinome infiltrieren die Tunica muscularis (Sexton et al. 2010).

1.2.1 Aufbau des Urothels

Einen Überblick über den Aufbau der Harnblasenwand liefert Abbildung 1.

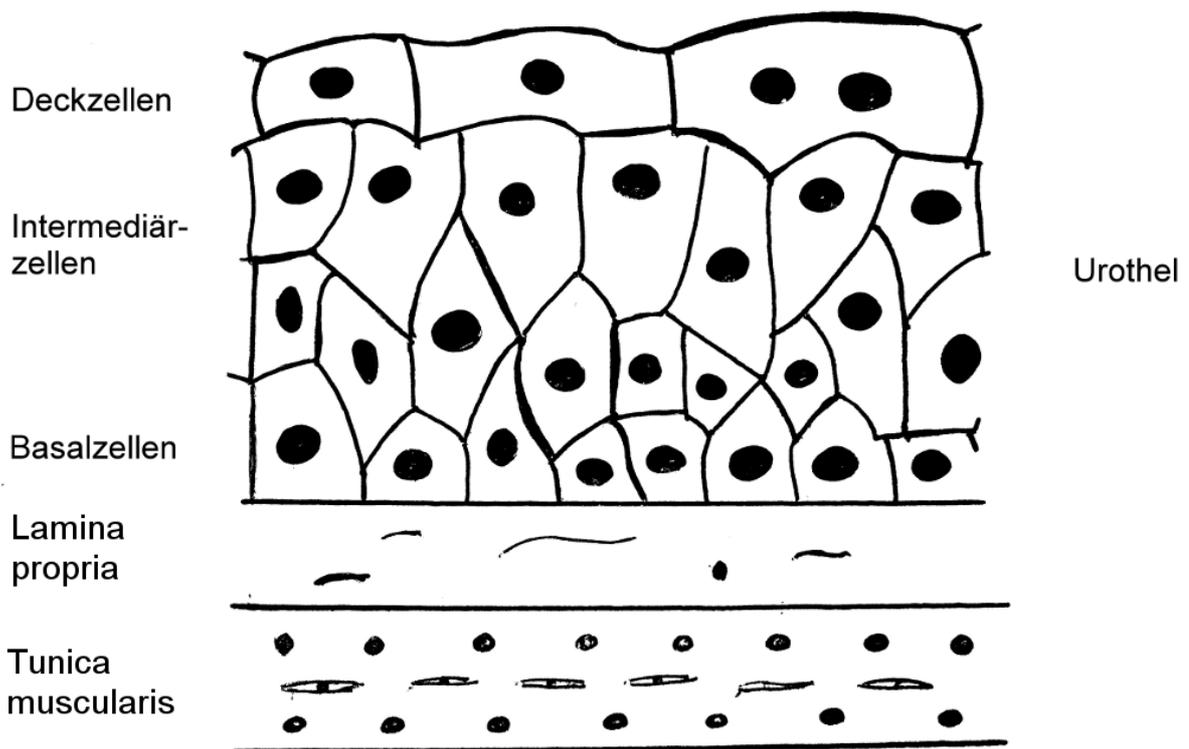


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Harnblasenwand

Das Urothel ist ein höchst spezialisiertes Epithel. Es besteht aus einer Basalzellschicht, einer in der Mitte liegenden Intermediärzellschicht und den Deckzellen. Basalzellen und Intermediärzellen unterscheiden sich im Wesentlichen morphologisch nicht von denen anderer geschichteter Epithelien, die Deckzellen – auch „Umbrella-Zellen“ genannt - sind dagegen sehr unterschiedlich. Sie sind viel­flächig und oft zweikernig, und entstehen wahrscheinlich durch Zellfusion mit den Intermediärzellen. Als einzige Zellen des Körpers sind sie von einer spezifischen Membran, der „asymmetric unit membrane“ (AUM) umgeben. Diese Membran besteht aus fünf Uroplakinen, die ausschließlich auf das Urothel beschränkt sind und die Zellen gegenüber dem ständigen Kontakt mit dem Harn widerstandsfähig machen. Die Umbrella-Zellen sind ausdifferenziert und teilen sich nicht mehr. Das Urothel stellt eine Permeabilitätsbarriere dar, die sowohl das darunterliegende Gewebe vor den toxischen Inhaltsstoffen des Urins schützt, als auch seine Oberfläche aktiv und reversibel während des Blasenentleerungszyklusses anpassen kann. Um diese Stabilität zu gewährleisten, hat das Urothel einen extrem langsamen Zellzyklus. Seine Basalzellschicht, in der die meisten proliferativen Vorgänge vermutet werden, ist die am wenigsten differenzierte Zellschicht. Sie exprimiert als einzige der Schichten eine nennenswerte Menge an epidermale­m Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR), ist aber wegen der Barrierefunktion der Deckzellschicht des Urothels physiologischerweise

unzugänglich für EGF im Urin und auch für eine Rezeptorbindung des anti-EGFR-MAk (Cheng et al., 2002).

Alle Urothelzellen stehen weiters unter dem Einfluss von negativen Zellzyklusregulatoren. Retinoblastom-Proteine (pRb) sind Tumorsuppressorproteine, die das Zellwachstum verlangsamen, indem der Durchlauf des Zellzyklus gebremst wird. Sie sind gleichförmig über alle Zellschichten verteilt, und halten auf diese Weise den Zellzyklus niedrig (Xue-Ru Wu, 2009).

1.2.2 Urotheliale Tumorentstehung

Die Umwandlung von physiologischem zu malignem Urothel wird neuesten Erkenntnissen zufolge immer wahrscheinlicher durch Überaktivierung des HRAS Proto-Oncogens, bzw. durch Mutationen des Proteins p53 und gleichzeitiger aberranter pRb Expression hervorgerufen (Xue-Ru Wu, 2009).

Die Außerkraftsetzung einzelner Proteine der pRb-Familie allein führt nicht zu urothelialer Tumorgenese, sondern bewirkt eine kompensatorische Induktion anderer Tumorsuppressoren, wie eine experimentelle Studie an transgenen Mäusen zeigte (He et al., 2009). Allerdings führte die dauerhafte Aktivierung des mutierten HRAS-Gens in transgenen Mäusen zu niedriggradigen, nicht-muskelinvasiven Blasenkarzinomen. Dabei lag gleichzeitig eine verminderte Expression der Proteine der pRb-Familie vor. Die Aktivierung des HRAS-Gens führte ausschließlich zu nicht-muskelinvasiven Tumoren. Die molekularen Vorgänge, die zu muskelinvasiven Tumoren führten, waren p53 Mutationen in Kombination mit abnormen pRb Expressionen (Xue-Ru Wu, 2009).

1.2.3 Die WHO-Klassifikation

Mostofi et al. haben 1973 die erste WHO-Klassifikation veröffentlicht, die Blasentumore neben der rein histologischen Typisierung genauer charakterisiert. Die aktuelle WHO-Klassifikation der nicht-muskelinvasiven, urothelialen Tumore unterteilt diese in Hyperplasien, flache Läsionen mit Atypien und papilläre Läsionen (Mostofi et al., 1999). Letztere unterteilen sich wiederum in Papillome, papilläre urotheliale Neoplasien mit niedrigmalignem Potential (PUNLMP) und papilläre niedriggradige, bzw. hochgradige Karzinome.

Flache und papilläre urotheliale Hyperplasien stellen sich histologisch als benigne Urothelverdickungen dar. Zu den flachen Läsionen mit Atypien zählen die reaktive Atypie, welche Urothelveränderungen infolge von Entzündungen bezeichnet, sowie die Atypie mit unklarer

Bedeutung und die urothelialen Dysplasien. Als Atypien mit unklarer Bedeutung werden solche bezeichnet, bei denen anfangs nicht zwischen reaktiven Atypien und Dysplasien differenziert werden kann. Eine Reevaluation nach abgelaufener Entzündung sollte durchgeführt werden. Die urotheliale Dysplasie ist per definitionem eine präneoplastische Läsion. Sie ist durch zytologische Veränderungen der basalen und intermediären Schichten und Veränderungen in der Histoarchitektur gekennzeichnet. Das Carcinoma in situ (CIS) wird in der Klassifikation bei den flachen Läsionen mit Atypien aufgeführt, es stellt eine Sonderform der nicht-muskelinvasiven Urothelkarzinome dar. Die urotheliale Dysplasie gilt aufgrund morphologischer Ähnlichkeiten als Vorstufe zum Carcinoma in situ. Das CIS entwickelt sich flächenhaft an der Oberfläche, ohne die Lamina propria mucosae zu infiltrieren. Häufig tritt es gemeinsam mit papillären Läsionen auf (Badalment et al., 1992; Saleh-Birjandi, 2007), und ist durch große, unregelmäßig begrenzte und hyperchromatische Kerne zytologisch als maligne charakterisiert. Die Nukleoli der CIS Tumorzellen sind groß und prominent, Mitosen kommen häufig vor. Das CIS gilt als obligate Vorstufe des invasiven Urothelkarzinoms (Seitz et al., 2004). Die Anaplasie seines Zellkerns ist vergleichbar mit der der hochgradigen, papillären Blasenkarzinome und seine neoplastischen Veränderungen können die gesamte Breite des Urothels involvieren. Das Carcinoma in Situ tritt normalerweise multifokal auf (Sexton et al., 2010). Nach alleiniger Transurethraler Resektion (TUR) beträgt das Rezidiv – und Progressionsrisiko des CIS bis zu 80% (Kemper, 2007).

Ein urotheliales Papillom weist normale Urotheldicke auf, die Zellen zeigen keine Atypien. Es ist charakterisiert durch wenige papilläre Verzweigungen. Papillome rezidivieren sehr selten nach kompletter Resektion. PUNLMP weisen dieselben Eigenschaften wie Papillome auf, jedoch kommt es bei ihnen auch zu vermehrter Zellproliferation, und in der Folge stellt sich das normale Urothel verdickt dar. Die Zellkernveränderungen sind minimal, die Kerne können etwas vergrößert sein, Mitosen sind selten. Die Zellschichten sind regelmäßig angeordnet.

Im Gegensatz zu Papillomen und PUNLMP weisen niedriggradige, papilläre Blasenkarzinome Unterschiede in Form, Größe und Chromatinstruktur der Zellkerne auf.

Die hochgradigen, papillären Blasenkarzinome charakterisieren sich durch eine Unordnung der Zellschichten, mit moderater bis deutlicher Zellatypie. Mitosen sind häufig (Sexton et al., 2010).

Nicht-muskelinvasive Blasen-tumore zeichnen sich generell durch eine hohe Rezidivneigung aus, wobei nur ein Anteil von 10-20% zu einer fortschreitenden Infiltration der Blasenwand übergeht. Im Gegensatz dazu weisen die primär fortgeschrittenen Karzinome, bei denen es bereits zu einer Invasion der Lamina propria gekommen ist, ein hohes Risiko für eine Tumorprogression in Richtung muskelinvasiver Erkrankung auf (Seitz et al., 2004). Dies ist auch der Grund für die reduzierte 5-Jahres-Überlebensrate in letzterer Gruppe, welche trotz radikaler chirurgischer Intervention bei nur 50% liegt (Lerner et al., 1992; Saleh-Birjandi, 2007).

In Tabelle 1 ist die Einteilung der nicht-muskelinvasiven und muskelinvasiven Harnblasenkarzinome zusammengefasst.

Tabelle 1: WHO-Klassifikation nicht-muskelinvasiver und muskelinvasiver, urothelialer Karzinome (nach Mostofi et al, 1999)

Normal Normales Urothel: Als normales Urothel werden auch Urothelia mit diskreten Veränderungen in der Histoarchitektur bezeichnet, verursacht z.B. durch Färbung und Fixierungstechniken.
Nicht-muskelinvasive Neoplasien
Hyperplasie Flache Hyperplasie Papilläre Hyperplasie
Flache Läsionen mit Atypien Reaktive (entzündliche) Atypie Atypie mit unklarer Bedeutung Urotheliale Dysplasie Carcinoma in Situ
Papilläre Läsionen Papillom Invertiertes Papillom Papilläre urotheliale Neoplasie mit geringem malignem Potential (PUNLMP) Papilläres urotheliales Low-grade-Karzinom Papilläres urotheliales High-grade- Karzinom
Invasive Neoplasien Invasion der Lamina propria Invasion der Muscularis propria

1.2.4 Risikofaktoren für Harnblasenkarzinome

Zu den bekannten Risikofaktoren für das Blasenkarzinom gehören Tabakkonsum und die berufliche Belastung mit Aryl-Aminen oder ionisierender Strahlung. Männer entwickeln Harnblasenkarzinome häufiger als Frauen. Auch Cyclophosphamide und Analgetika spielen als Auslöser eine wichtige Rolle (Vlaovic et al., 1999; Sexton et al. 2010). Zwischen Karzinogenexposition und Tumorinzidenz ist mit einer Latenz von 15–40 Jahren zu rechnen (Cohen

et al., 1992). Eine mögliche Rolle bei der Entstehung des Blasenkarzinoms spielen auch diätische Faktoren, wie z.B. Rückstände von Pflanzenschutzmitteln in Lebensmitteln, Chlorierung des Trinkwassers und Belastungen mit Haarfärbemitteln im Beruf. Personen, die mit Leder arbeiten, Maler und Lastwagenfahrer sind ebenfalls prädisponiert. Sie nehmen durch die Farbstoffe im Leder, die Chemikalien der Farben und durch Autoabgase täglich aromatische Amine auf. Tabakkonsum scheint der größte Risikofaktor für die Entwicklung eines Harnblasenkarzinoms zu sein. Starke Raucher, die über 40 Jahre lang 20 Zigaretten täglich geraucht haben, haben ein vierfach höheres Risiko an einem Blasenkarzinom zu erkranken als Nichtraucher (Burch, 1989; Sexton et al. 2010). Daten belegen, dass eine Tabakentwöhnung die Tumorrezidivrate senkt (Fleshner et al., 1999).

1.2.5 Klinische Symptome für Harnblasenkarzinome

Verbreitete Symptome für maligne Veränderungen der Harnblase sind Dysurie und plötzlicher, häufiger Harndrang. Das wichtigste Symptom ist die Hämaturie. Sie kommt bei der Mehrheit der Patienten mit Blasenkarzinom vor. Überwiegend sind diese Symptome bei Patienten mit papillären urothelialen high-grade Karzinomen, mit Carcinoma in Situ (CIS) oder bei muskelinvasiver Erkrankung zu finden. Diese Symptome führen häufig dazu, dass Patienten mit Urothelkarzinomen früh diagnostiziert werden. Die Latenzzeit zwischen der Entwicklung des Karzinoms und dem Auftreten von klinischen Symptomen scheint relativ kurz zu sein (Sexton et al., 2010).

1.2.6 Therapie des Harnblasenkarzinoms

Die Initialtherapie für ein nicht-muskelinvasives Blasenkarzinom ist die transurethrale Resektion (TUR) aller sichtbaren Tumore. Sie wird auch zur Diagnostik herangezogen, und liefert Informationen über das Staging des Tumors (Sexton et al., 2010). Die Kombination der zystoskopischen und pathologischen Befunde setzt fest, ob auch zusätzlich intravesikal behandelt werden soll und bestimmt das Rezidivrisiko der Krankheit, dessen Fortschreiten und die krankheitsbedingte Sterbewahrscheinlichkeit (Millán-Rodríguez et al., 2000; Sexton et al., 2010). Die größte Herausforderung im Management des Harnblasenkarzinoms ist die Prävention des Fortschreitens der Krankheit.

Oosterlinck et al. haben in ihren Guidelines of Bladder Cancer drei Risikogruppen bei nicht-muskelinvasivem Blasenkarzinom folgendermaßen definiert (Oosterlinck et al. 2002, Kemper, 2007):

Tabelle 2: Risikogruppen für Rezidivwahrscheinlichkeit und Progressionsrate von nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen (modifiziert nach Oosterlinck et al., 2002)

Niedriges Risiko (low risk)	Gut differenzierte, einzelne Ta Tumore, kleiner als 3 cm; Die Rezidivwahrscheinlichkeit liegt unter 40% und die Progressionsrate unter 4%.
Mittleres Risiko (intermediate risk)	Multifokale Tumore; papilläre Rezidivtumore; Die Rezidivwahrscheinlichkeit liegt zwischen 50 und 70% und die Progressionsrate beträgt 20%.
Hohes Risiko (high risk)	Carcinoma in situ, schlecht differenzierte Ta und T1 Tumore; Die Rezidivwahrscheinlichkeit liegt bei 80% und die Progressionsrate beträgt mehr als 30%.

Ta: Nichtinvasiver papillärer Tumor, T1: Tumor infiltriert subepitheliales Bindegewebe (nach Edge et al., 2010)

Low-risk Blasenkarzinome ohne Rezidivierung müssen über 5 Jahre regelmäßig kontrolliert werden. Bei intermediate- und high-risk Karzinomen empfiehlt sich eine lebenslange Kontrolle in jährlichen Intervallen (Kemper, 2007).

Trotz vollständiger Entfernung der Tumore durch TUR kommt es bei nahezu 80% der nicht weiter behandelten, nicht-muskelinvasiven high-grade Blasenkarzinome zum Rezidiv und 50-65% der Rezidive entwickeln sich zur muskelinvasiven Krankheit (Soloway et al., 2002, Kemper, 2007). Ein rezidivierender Tumor, der nach der ersten Folgezystoskopie nach 3 Monaten gefunden wird, macht weitere Rezidive sehr wahrscheinlich. Patienten mit schlecht differenzierten Tumoren und CIS, besonders in Verbindung mit einer Invasion der Lamina propria, tragen das größte Risiko für ein Fortschreiten der Krankheit (Babjuk et al., 2008; Sexton et al., 2010).

Eine wichtige Strategie im Management des nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms ist die Anwendung von intravesikalen Therapien nach transurethraler Resektion, um mikroskopisch kleine, verbliebene Tumorreste zu therapieren und einer Tumorreimplantation, einer Tumorneubildung und einem möglichen Fortschreiten des Tumors vorzubeugen. Es wird vermutet, dass die Hälfte aller Tumorrezidive aufgrund der Streuung von einzelnen, verbliebenen Tumorzellen und durch die traumatische Einwirkung auf das Urothel induziert wird. Tiermodelle bekräftigen letztere Theorie, weil sie zeigen, dass Tumorimplantation in vor-traumatisiertes Urothel einfach vonstattengeht (Günther et al., 1999).

Die zur intravesikalen Therapie verwendeten Chemotherapeutika und Immunmodulatoren sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Chemotherapien und Immuntherapien zur intravesikalen Instillation (modifiziert nach Sexton et al., 2010)

Chemotherapien	Wirkstoffgruppen
Mitomycin C	Antibiotikum, DNA Synthese Hemmer
Thiotepa	Alkylierendes Agens
Doxorubicin, Valrubicin	Topoisomeraseinhibitoren, DNA Synthese Hemmer
Immuntherapien	Wirkungsmechanismus
Bacille Calmette-Guérin (BCG)	Typ I Immunantwortinduktion
Interferon (in Kombination mit BCG)	Lymphozytenaktivierung, potenziert die Typ I Immunantwort, antiangiogen, antiproliferativ

1.2.6.1 Intravesikale Tumorthherapie direkt nach Transurethraler Resektion

Eine gängige, unterstützende Therapie für das nicht-muskelinvasive Blasenkarzinom direkt nach transurethraler Resektion ist bis zum heutigen Zeitpunkt Mitomycin C. Es werden 20-40 mg in 20-40 ml sterilem Wasser verabreicht. Einwirkzeit innerhalb der Blase ist zwischen 30 und 60 min. Die beste Zeitspanne um Mitomycin C zu verabreichen ist innerhalb der ersten 2 bis 6 Stunden nach Resektion. Veröffentlichte Studiendaten bekräftigen die Wirksamkeit einer unmittelbar nach TUR instillierten Chemotherapie. Sylvester et al. bearbeiteten Daten von sieben randomisierten Studien bezüglich Tumorrezidivierung an 1476 Patienten. Als intravesikale Therapeutika wurden Mitomycin C, Thiotepa, Epirubicin und Pirarubicin verwendet. Die Instillation erfolgte innerhalb von 24 Stunden nach TUR. Patienten der Behandlungsgruppe hatten um 39% weniger Rezidive als die Patienten, welche nach TUR unbehandelt blieben (Sylvester et al., 2004; Sexton et al., 2010). Die European Association of Urology empfiehlt gegenwärtig eine unmittelbar nach kompletter, komplikationsloser TUR folgende intravesikale Therapie (Babjuk et al., 2008; Sexton et al., 2010).

1.2.6.2 Einleitung einer intravesikalen Tumorthherapie bei nicht-muskelinvasiven high-grade Tumoren, T1 Tumoren, CIS und bei Tumorrezidiven

Immunmodulatorische Lösungen wie Bacillus Calmette-Guerin (BCG) werden nicht unmittelbar nach transurethraler Resektion eingesetzt, sondern im Sinne einer Induktionstherapie wöchentlich für eine Zeitspanne von mindestens 6 Wochen angewandt. Beginn einer solchen Therapie ist 2 bis 4 Wochen nach TUR (Sexton et al., 2010). Per definitionem versteht man

unter Induktionstherapie eine wöchentliche Administration eines intravesikalen Wirkstoffes für 6 aufeinanderfolgende Wochen. Die bevorzugte Therapie ist Bacillus-Calmette-Guérin (BCG). BCG ist eine inaktivierte Form von Mykobakterium tuberculosis, es schafft eine anti-angiogene Umgebung, welche zukünftiges Tumorwachstum und Fortschreitung verhindert (Poppas et al., 1998; Sexton et al., 2010). BCG ist die Grundlage der intravesikalen Therapie für intermedium und high-risk Tumoren (Hall et al., 2007; Sexton et al., 2010).

1.2.6.3 Intravesikale Erhaltungstherapie

Eine Erhaltungstherapie ist eine fortlaufende, periodische Exposition des Urothels mit einem intravesikalen Agens (Chemotherapie oder BCG), nachdem es nach Einleitungstherapie zu einer kompletten Remission gekommen ist. Eine derartige Erhaltungstherapie ist sehr wichtig um die Tumorrezidivierung und-progression zu verringern. Bei 15-50% der high-risk Tumoren kommt es innerhalb von 5 Jahren zum Fortschreiten des Tumors. In dieser Gruppe reduziert intravesikales BCG als Erhaltungstherapie signifikant das Rezidivrisiko und das Risiko einer Progression des Tumors nach TUR bei Patienten mit nicht-muskelinvasivem Blasenkarzinom (Sylvester et al., 2002; Sexton et al., 2010). Bei low-und intermediate risk Tumoren kommt es bei 5 bzw. 15% der Patienten zu einem Fortschreiten der Krankheit innerhalb von 5 Jahren (Babjuk et al., 2008; Sexton et al., 2010). Bis heute hat die Erhaltungstherapie in diesen beiden letzteren Risikogruppen die Progressionsraten nicht beeinflusst, aufgrund der insgesamt niedrigen Anzahl beobachteter Progressionsfälle. Bei Patienten mit low-grade Tumoren dürfte die erhaltende Chemotherapie mit z.B. Mitomycin C (monatlich verabreicht für 3-12 Monate) Tumorrezidive verringern (Sexton et al., 2010).

1.2.6.4 Zystektomie

Um die 20% der Patienten mit Langzeittherapie leiden unter einer BCG Intoleranz und bis zu 40% sprechen auf diese Therapie nicht an (Witjes, 2006). Diesen Patienten sollte eine Zystektomie vorgeschlagen werden (Hall et al., 2007; Sexton et al., 2010). Ebenso wird Patienten mit muskelinvasiven Tumoren zur Zystektomie geraten. Die American Urology Association schlägt eine frühe Zystektomie auch für Patienten mit hochgradigen Ta/T1 Tumoren oder Carcinomae in Situ bei erstmaliger Vorstellung vor, abhängig vom Ausmaß der Erkrankung, der Vollständigkeit der transurethralen Resektion und nach Besprechung der potentiellen Risiken und des Nutzens, die eine intravesikale Therapie mit sich bringen würde (Hall et al., 2007; Sexton et al., 2010). Die Komplikationsrate bei der Zystektomie liegt allerdings bei

30%, die Mortalitätsrate bei 1 bis 4% (Skinner et al., 1991; Hautmann et al., 1999; Jimenez et al., 2002, Kemper, 2007).

Die muskelinvasiven Harnblasenkarzinome haben ihre höchste Progressionsrate innerhalb der ersten 24 Monate nach radikaler Zystektomie, deshalb sollten insbesondere in diesem Zeitrahmen engmaschige Verlaufskontrollen erfolgen (Pagano et al., 1991, Kemper, 2007). Diese Kontrolluntersuchungen sollten die möglichen Lokalrezidive ebenso wie die Lymphknoten- und Fernmetastasen erfassen (Oosterlinck et al., 2000, Kemper, 2007). Das erkrankungsspezifische Überleben ist für Patienten mit organbegrenzten Tumoren ($\leq T2$) bei Zystektomie besser im Vergleich zu Patienten, die an extravasikalen oder Lymphknoten-positiven Erkrankungen leiden ($>T2$ oder N+) (International Bladder Cancer Nomogram Consortium, Sexton et al., 2010).

1.2.6.5 Komplikationen bei der Therapie des Harnblasenkarzinoms

Tabelle 4 zählt die Toxizitäten auf, welche bekanntlich mit dem Einsatz der erwähnten intravesikalen Therapien in Zusammenhang gebracht werden (Hall et al., 2007; Andius et al., 2005; Sexton et al., 2010). Mit BCG in Zusammenhang stehende Nebenwirkungen dominieren das Toxizitätsprofil, aufgrund seiner häufigen Anwendung. BCG Toxizität kann in verschiedene Schweregrade unterteilt werden. Höhere Grade erfordern intensivere Evaluation und Management. Die am meisten berichteten Nebenwirkungen treten im unteren Harntrakt auf und stellen meist entzündliche Zystitiden dar.

Tabelle 4: Komplikationen bei routinemäßig verwendeten intravesikalen Therapien für Urothelkarzinome (modifiziert nach Hall, 2007 und Lamm, 2005)

Wirkstoff	Nebenwirkungen	Betroffene Patienten (%)
Bacillus Calmette-Guérin	Zystitis (nicht infektiös)	>50
	Leichtes Fieber, Schüttelfrost, Unwohlsein	25
	Symptomatische Prostatitis, Epididymitis	<5
	Fieber	<2
	Sepsis	3
Mitomycin C	Chemische Zystitis	<0,5
	Myelosuppression	10
	Hypersensitivitätsdermatitis	<10
	Blasenkontraktur	<2
	Gewebsnekrosen	Rar
Thiotepa	Chemische Zystitis	20
	Myelosuppression	10
Doxorubicin	Chemische Zystitis	25
	Allergische Reaktion	1

Aufgrund der nach wie vor sehr hohen Rezidivraten des Harnblasenkarzinoms, der Komplikationen bei der Therapie und wegen seines häufigen Fortschreitens in ein muskelinvasives Stadium werden dringend neue Therapiestrategien benötigt. Bis zum heutigen Zeitpunkt ist die einzige Therapiemöglichkeit eines muskelinvasiven Tumors die radikale Zystektomie.

In den letzten Jahren wurden zahlreiche neue Möglichkeiten des Managements von nicht-muskelinvasivem Blasenkarzinom entwickelt (Chiong und Esuvaranathan, 2009). Diese Neuerungen richten sich nicht nur gegen BCG Resistenzen, sondern sollen auch neue Wege eröffnen um Blasenkarzinomzellen zu vernichten. Eine vielversprechende Methode um Blasenkarzinomzellen lokoregional, effizient und unter Schonung des umliegenden Gewebes abzutöten, ist die intravesikale Alpha (α)-Radioimmuntherapie.

1.2.7 Lokoregionale α -Radioimmuntherapie als neue Therapieform des nicht-muskelinvasiv wachsenden Harnblasenkarzinoms

Im Gegensatz zu einer systemischen Therapie, bei der alle Zellen, die sich in Teilung befinden geschädigt werden, kann bei lokoregionalen Therapien, d.h. bei Applikation des Therapeutikums direkt in den Tumor oder in Körperhöhlen mit Tumorarealen, ein gezieltes Ankommen der Medikation an die Tumorzellen besser sichergestellt werden. In der Radioimmuntherapie werden Trägermoleküle (Antikörper, Peptide) verwendet, die Strukturen auf

Tumorzellen erkennen und selektiv an diese binden. Schon 1906 sprach der deutsche Chemiker und Arzt Paul Ehrlich über Antigen-Antikörperbindungen, die spezifisch ihr Ziel erreichen können. (Ehrlich, 1906). Durch die Kopplung eines Radionuklids an einen tumorspezifischen Antikörper wird eine wirksame Strahlendosis gezielt im Tumor deponiert und das gesunde umliegende Gewebe bleibt dabei vor etwaigen Strahlenschäden verschont (siehe 4.4.5). α -Strahler eignen sich gut für diese Art der Applikation, da sie auf einer Reichweite von 3-4 Zelldurchmessern ihre gesamte Energie abgeben und somit starke zytotoxische Wirkung zeigen. Sie müssen zwar gezielt an die Tumoren gebracht werden, wirken dann an denen jedoch sehr selektiv. Aufgrund ihrer selektiven Wirkung auf die Tumorzellen ist die lokoregionale α -Radioimmuntherapie einer lokoregionalen Chemotherapie mit Mitomycin C bezüglich etwaiger auftretender Nebenwirkungen überlegen.

Der Epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) ist bei bis zu 80% aller Harnblasenkarzinome überexprimiert, wodurch eine direkte Bindung des an das Radionuklid gekoppelten Anti-EGFR-Antikörpers an eine große Anzahl von Tumorzellen ermöglicht wird (Cheng et al., 2002; Bellmunt et al., 2003; Rotterud et al., 2005).

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass ^{213}Bi , gekoppelt an einen monoklonalen Antikörper gegen den EGFR (^{213}Bi -anti-EGFR-MAk) bei 90% der Versuchstiere einzelne Tumorzellen bzw. Tumorzellaggregate effizient abtöten konnte, wenn das Radioimmunkonjugat eine Stunde nach intravesikaler Tumorzellinstillation verabreicht wurde.

Bei fortgeschrittenen Tumoren sollte nun eine fraktionierte Therapie mit ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk den Tumor aufgrund der hohen Zytotoxizität zwiebelschalenartig abtragen.

Die lokoregionale α -Radioimmuntherapie stellt aus den genannten Gründen eine hoffnungsvolle neue Therapiemethode beim Harnblasenkarzinom dar. Sie gibt eine Aussicht auf eine hochwirksame und gleichzeitig schonende Tumorthherapie, da sie effizient, ohne schwerwiegende Nebenwirkungen selektiv maligne Zellen abtötet.

2. LITERATURÜBERSICHT DER RADIOIMMUNTHERAPIE VON TUMOREN

2.1 Radioimmuntherapie von Tumoren

Ionisierende Strahlung ist ein hochwirksames Tumorthapeutikum wenn die Energieabgabe gezielt am Tumor erfolgt. Dies ist mit radionuklidgekoppelten Trägermolekülen, die gezielt an Tumorzellen binden möglich. Als Radionuklide kommen hierfür α - und β - Strahler in Betracht. Radionuklide gekoppelt an Trägermoleküle verbinden die Eigenschaften eines stark wirksamen, DNA schädigenden Wirkstoffes mit einer gezielten Anreicherung des Radioimmunkonjugats (RIK) im Tumor. Die geringe Reichweite eines α - Strahlers von 3-4 Zelldurchmessern verhindert bei selektiver Bindung des RIK eine Strahlenschädigung des benachbarten gesunden Gewebes. Die Reichweite eines β -Strahlers liegt mit 45 Zelldurchmessern deutlich über der eines α - Strahlers. Deshalb bergen β -Strahler die Gefahr der Schädigung benachbarter gesunder Zellen. Erste klinische Ergebnisse belegen die Wirkungen der an Trägermoleküle gekoppelten, Radionuklide und zeigen ihr großes Potential als hochwirksame und gleichzeitig schonende Tumorthapien (Andersson et al., 2009).

Rezeptoren, welche im Vergleich zu gesundem Gewebe an der Oberfläche von Tumorzellen vermehrt, oder sogar tumorspezifisch exprimiert werden, dienen als Ziele, an die ein Antikörper als Trägermolekül für das Radionuklid andocken kann. Damit soll eine hohe Strahlendosis im Tumorgewebe erzielt werden und die malignen Zellen abgetötet werden. Zur Bindung an die Rezeptoren werden bevorzugt monoklonale Antikörper verwendet, die durch Zellfusion von Lymphozyten mit malignen Tumorzellen gebildet werden (Köhler und Milstein, 1975). Die Herstellung monoklonaler Antikörper stellt die am schnellsten wachsende Produktionsparte der Biopharmazie dar. Mit Hilfe eines chemischen Zwischenmoleküls, dem Chelator, werden metallische Radionuklide an den Antikörper gekoppelt und deren Energie mit dem Grundprinzip des „Targeting“ am Zielort freigesetzt. Nach dem Antigen (=überexprimierter Rezeptor an einer Tumorzelle) –Antikörper (chelatiert und so mit dem Radionuklid verbunden) -Prinzip reichern sich im Tumor Radionuklide an, die den Tumor zerstören.

2.1.1 α - und β - Strahler in der Radioimmuntherapie

Die von α -Strahlern ausgesendeten α -Teilchen entsprechen Heliumkernen, welche aus jeweils zwei Protonen und zwei Neutronen bestehen. Bei der β -Strahlung kommt es zum Aussenden von β^- Teilchen, Elektronen aus dem Atomkern. Bei α - und β -Strahlung handelt es sich um eine Teilchenstrahlung. Wirkt α -Strahlung von außen auf den Körper ein, ist sie relativ ungefährlich, da die α -Teilchen wegen ihrer geringen Reichweite überwiegend nur in die oberen, toten Hautschichten eindringen. Wird ein α -Strahler jedoch im Organismus durch Einatmen oder Aufnahme mit der Nahrung inkorporiert, so können nicht nur die toten Hautschichten, sondern auch lebende Zellen geschädigt werden.

α -Emitter töten durch ihre geringe Reichweite in inneren Organen von 50-90 μm und einem hohen linearen Energietransfer (LET) bei selektiver Bindung Tumorzellen unter Schonung des benachbarten Gewebes wirkungsvoll ab. Aufgrund dieser kurzen Reichweite ist die Anwendung von α -Emittern zur Vernichtung von singulären, verstreuten Tumorzellen, bzw. oberflächlichen Tumorzellhaufen sehr gut geeignet. Für die Eliminierung von Tumorzellen in größeren Zellverbänden sind β -Emitter besser geeignet.

Die pro Wegstrecke abgegebene Energie von Alphastrahlen, deren linearer Energie-Transfer (LET), beträgt ca. 60-150 keV/ μm Gewebe. Somit ist er erheblich höher als z. B. der des Betastrahlers ^{90}Y welcher 0,2 keV/ μm Gewebe ausmacht. Da die gesamte Energie also auf kleinster Wegstrecke abgegeben wird, bewirkt die hohe Ionisationsdichte eine besonders hohe Zytotoxizität. Durch die dicht ionisierende Strahlung werden mehr irreparable DNA-Doppelstrangbrüche verursacht als bei locker ionisierender Strahlung (β -Strahlung) (Couturier et al., 2005).

Um den gleichen zytotoxischen Effekt auf kleinere Tumorzellansammlungen oder verstreute Tumorzellen zu erzielen, der durch den hohen LET der Alphastrahlung erreicht wird, würde man eine weit höhere Zahl an Tumorzell-gekoppelten β^- -Immunkonjugaten an einer einzelnen Zelle benötigen. Die Reichweite von β -Strahlern geht deutlich über den Durchmesser der eigentlichen Zielzelle hinaus. Deshalb können Zellen des Normalgewebes durch die höhere Reichweite der β -Strahlung über das eigentliche Ziel hinaus ebenso geschädigt werden. Macklis et al. haben gezeigt, dass das Überleben von Lymphomzellen mit 25 α -Teilchen, die

den Zellkern treffen, auf 10% reduziert werden konnte. Um den gleichen Effekt zu erzielen, müssten ca. 1200 β -Partikel den Zellkern treffen (Macklis et al., 1992; Humm, 1987).

Bislang wurden vorwiegend Betastrahler in der Radioimmuntherapie eingesetzt. Der Grund dafür lag in der besseren Verfügbarkeit dieser Nuklide im Vergleich zu α -Emittern. ^{67}Cu - und ^{188}Re -gekoppelte Anti-MUC1-Mucin Antikörper zeigten eine gute Anreicherung in Blasen-tumoren (Hughes et al, 2000; Murray et al., 2001). Vergleiche von β -Strahlern mit α -Strahlern wurden an einem Lungenmetastasenmodell an Mäusen durchgeführt. Dabei wurde die Wirkung des β -Strahlers ^{90}Y mit der des α -Emitters ^{213}Bi verglichen: Beide Radionuklide wurden an den gleichen AK gekoppelt und intravenös injiziert. In beiden Fällen verkleinerten sich die Tumore bei Metastasen bis zu einer Größe von 2000 Zellen, bei größeren Metastasen erwies sich ^{90}Y gegenüber dem α -Strahler ^{213}Bi im Therapieergebnis als überlegen. Jedoch mussten die mit ^{90}Y behandelten Tiere abhängig von der applizierten Aktivität innerhalb von 20 Tagen aufgrund von Lungenhämorrhagien euthanasiert werden, oder zeigten 60 Tage post injectionem Langzeitschäden in Form von Lungenfibrosen (Kennel et al., 1999a).

Die physikalischen Eigenschaften der meisten Alphastrahler wie hohe HWZ, deren Tochter-nuklide innerhalb der Zerfallsreihe und deren Verfügbarkeit für die Anwendung in der Medizin (Gewinnung aus radioaktivem Material, Herstellung in Linearbeschleunigern) führen dazu, dass sich die meisten der über 100 vorkommenden Alphastrahler für die praktische Anwendung nicht eignen. ^{225}Ac , ^{211}At und ^{213}Bi haben allerdings Eigenschaften, die für die Therapie in Frage kommen. ^{225}Ac emittiert 4 α -Partikel innerhalb der Zerfallsreihe, allerdings hält keine Chelatbildung der Rückstoßenergie stand und das Radionuklid löst sich wahrscheinlich vom Antikörper ab. Ebenso hat es den Nachteil einer langen HWZ von 10d. Der große Vorteil des ^{225}Ac liegt darin, dass es als ^{213}Bi -Generator verwendet werden kann, mit dem man einen Weg gefunden hat, auf Basis einer ^{225}Ac -Quelle den klinisch nutzbaren Alphastrahler ^{213}Bi mit günstigen Eigenschaften mit geringem Aufwand und mit geringer Gefährdung des Personals zu eluieren (Seidl und Senekowitsch-Schmidtke, 2008).

Das Knochenmark ist für gewöhnlich das dosislimitierende Organ bei der Radioimmuntherapie (Elgqvist et al., 2005). Bei lokoregionaler Verabreichung eines Radioimmunkonjugats ist die Resorption in die systemische Zirkulation gering, die zirkulierende Aktivität wesentlich geringer als nach intravenöser Verabreichung, und somit die Knochenmarkstoxizität reduziert (Elgqvist et al., 2006). Die vom Tumor aufgenommene Aktivität ist dagegen größer als bei systemischer Applikation. Eine Fraktionierung der Therapie kann die Toxizität weiter verrin-

gern, indem sie ein graduelles Abtragen der äußeren Schichten von fortgeschrittenen Tumoren bewirkt. Verringerung der Myelotoxizität bedeutet auch die Möglichkeit einer Steigerung der therapeutischen Effizienz, da dadurch eine größere Gesamtmenge an Aktivität verabreicht werden kann (Elgqvist et al., 2006).

2.1.2 Monoklonale Antikörper als Carrier für das Radionuklid

Ein verbessertes Verstehen der Biologie bösartiger Tumoren trägt dazu bei, neue Ziele für die Therapie zu definieren um die geeignetste Behandlung für eine fortgeschrittene Krankheit zu finden. Viele menschliche Tumoren exprimieren eine große Menge an Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, welche als potentielle therapeutische Ziele verwendet werden können. Tyrosin-Kinase Rezeptoren wie der Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) und der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) sind bei vielen Tumoren regelmäßig überexprimiert. Für viele dieser Wachstumsfaktoren wurde der Grad der Überexpression mit dem Fortschreiten des Tumors und einer schlechten Prognose in Zusammenhang gebracht. Zu den am besten erforschten Wachstumsfaktorrezeptoren gehören die Mitglieder der EGF-Rezeptoren Familie. (Bellmunt et al., 2003).

Wird ein monoklonaler Antikörper in Konzentrationen, wie er als RIK appliziert wird, lokoregional appliziert, so kann er alleine weder das Tumolvolumen verringern, noch die Überlebenszeit verlängern. Vielmehr liefern solche Antikörper bei dieser Art der Applikation die Möglichkeit, ein an den Antikörper gekoppeltes Radionuklid direkt an den Tumor zu bringen, welches lokoregional hohe zytotoxische Wirkung entfalten kann.

2.1.3 Der EGF-Rezeptor und spezifische anti-EGFR-Antikörper für die Therapie des Harnblasenkarzinoms

Bei der Bindung des natürlichen EGF-Liganden an seinen Rezeptor löst dieser intrazelluläre Signalwege aus, welche die Zellproliferation, die Apoptoseprevention, die Angiogenese, die Zellmotilität und die Metastasenausbildung regulieren (Pfof et al., 2009).

Aufgrund der Überexpression des EGFR bei Harnblasenkarzinomzellen (Cheng et al., 2002) sind monoklonale anti-EGFR-Antikörper als Carrier für das Radionuklid geeignet. Viele verschiedene Karzinome exprimieren EGFR in hohem Maße.

2.1.4 Antikörperbindung von ^{213}Bi

Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von 45,6 min erweist sich ^{213}Bi als sehr vorteilhaft für die Therapie von mikrometastatischen Karzinomen, wo ein schnelles Erreichen von neoplastischen Zellen möglich ist (Caron et al., 1994; Nikula et al., 1999). Chelatbildner, welche an Antikörper gebunden werden können und an ^{213}Bi stabil binden, wurden bereits erforscht (Nikula et al., 1999). Diese sind Derivate der Diethylen-Triamin-Pentaessigsäure. Aus ihnen wurden stabile radiometallische chelatierende Konjugate entwickelt, die in vivo angewendet werden können (Junghans et al., 1993).

Als Anforderung an das RIK gilt, dass der monoklonale Antikörper in seiner Pharmakokinetik und Bindung durch das Chelat und das Nuklid nicht beeinflusst werden darf und die Stabilität des RIK in vivo garantiert bleiben muss, welche über mehrere HWZ des eingesetzten Radionuklides hinausgehen soll. Andernfalls würde der Transport des Radionuklids zur Zielstruktur nicht gewährleistet. Wenn der Radioimmunkomplex zu instabil ist, bricht er, und das freie ^{213}Bi akkumuliert in der Niere (Nikula et al., 1999). Man kann daher auch die renale ^{213}Bi -Akkumulation zur Bewertung der Bindungsstabilität des Radioimmunkomplexes nach Applikation von ^{213}Bi -Immunkonjugaten heranziehen. Der bifunktionelle Chelator SCN-CHX-A''-DTPA (2-(4-isothiocyanatobenzyl)-Cyclohexyl-Diethylentriaminpentaessigsäure) wird den hohen Anforderungen an die Belastbarkeit eines solchen Komplexes gerecht. Milenic et al. zeigten in einer Studie, dass sich ^{213}Bi , gebunden an CHX-A und -B Immunkonjugate weniger in der Niere anreichert (%ID/g), als gebunden an Konjugate mit anderen Chelaten. In einer Studie zum Vergleich von CHX-B-DTPA mit CHX-A-DTPA-Konjugaten stellte sich heraus, dass der CHX-A-DTPA-Komplex eine höhere Stabilität aufwies (Kobayashi et al., 1998). Andere Komplexbildner wie zum Beispiel DOTA übertreffen die Stabilität dieses DTPA-Konstruktes zwar (Camera et al., 1994), allerdings erfolgt die Chelatierung durch DOTA erst ab Temperaturen $>60^\circ\text{C}$ mit zufriedenstellenden Ausbeuten. Aus diesem Grund ist DOTA für die Chelatierung von Antikörpern ungeeignet, da die Antikörper temperatursensitiv sind. Mit einer Freisetzung von ^{213}Bi von weniger als 5% ist die CHX-A-DTPA-Stabilität bei der HWZ des ^{213}Bi von 45,6 min über zwei Tage ausreichend (Nikula et al., 1999). Huneke et al. und Fischer haben 1992 bzw. 2001 jeweils bewiesen, dass SCN-CHX-A''-DTPA weder Einfluss auf die Bindungskinetik, noch auf die Biodistribution des jeweils markierten Antikörpers hat (Huneke et al., 1992; Fischer, 2001).

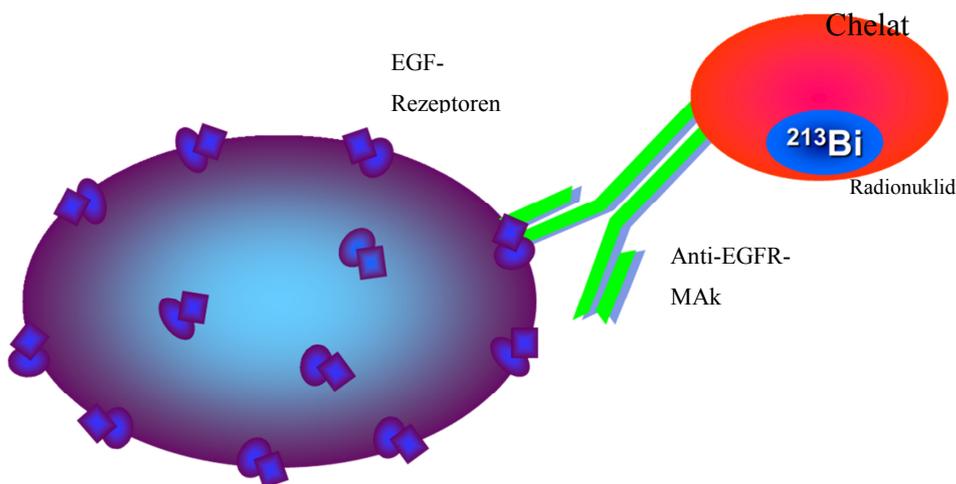


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Bindung des ^{213}Bi markierten anti-EGFR-Antikörpers an den EGF-Rezeptoren von Tumorzellen

Bei dem Markierungsvorgang werden die Chelate an die Antikörper gekoppelt und erst in einem späteren Schritt erfolgt die Kopplung des Isotops an die vorchelatierten Antikörper. Die Zeit für den Kopplungsprozess des Antikörpers mit dem Radionuklid wird dadurch verkürzt und das Nuklid wird nur bei einer der zwei Reaktionen eingesetzt.

Bei ^{213}Bi spielt ein zeitsparender Markierungsprozess bei der Herstellung der RIK aufgrund der geringen HWZ eine große Rolle. Der Kopplungsprozess der Radionuklide an den Antikörper ist bei Brechbiel und Gansow (1991) sowie bei Mirzadeh und Kennel (1996) ausführlich beschrieben.

2.2 Modelle für die α -Radioimmuntherapie an der Maus

Studien mit ^{213}Bi

^{213}Bi -Immunkonjugate wurden im Tiermodell bisher zur Therapie von Leukämie (Bethge et al., 2006), des Melanoms (Rizvi et al., 2005), des Magenkarzinoms (Beck et al., 2007), sowie von Prostata- und Pankreaskarzinom (McDevitt et al., 2000; Qu et al., 2005), sowie des murinen Kolonkarzinoms (Drecoll et al., 2009) verwendet. Huber et al., 2003, Bloechl et al., 2005, Seidl et al., 2005, Beck et al., 2007 und Buchhorn et al., 2007 konnten zeigen, dass mit Hilfe eines an ^{213}Bi -gekoppelten tumorspezifischen Antikörpers gegen mutiertes E-Cadherin diffuse Magenkarzinomzellen im Intraoperitonealraum nach lokoregionaler Applikation im Tiermodell sehr effizient abgetötet wurden. Bloechl et al. zeigten auch, dass bei bereits etwas fortgeschrittenen Tumoren eine 2-malige i.p. Applikation des Radioimmunkonjugats im Abstand

von 7 Tagen effizienter war als die singuläre Applikation. Toxizität konnte dabei nicht nachgewiesen werden. In einem *neu-N* transgenen Mausmodell konnten Song et al. 2006 zeigen, dass ^{213}Bi gekoppelt an Antikörper das Überleben der *neu-N* Mäuse mit Mammakarzinometastasen nach Zellinstillation in den linken Ventrikel verlängern konnte (Song et al., 2006). Drecoll et al. zeigten am Mausmodell der Peritonealkarzinose, dass ^{213}Bi auch an das Peptid F3₂ gekoppelt die Tumormasse deutlich verringert (Drecoll et al., 2009). Dabei wurden menschliche Mammakarzinom- und Pankreaskarzinomzellen, Ovarialkarzinomzellen und murine Kolonkarzinomzellen verwendet. In einem Prostatakarzinommodell wurden die Toxizität und die Wirksamkeit eines mit ^{213}Bi markierten Plasminogenaktivator-Inhibitors Typ 2 (PAI2) getestet (Rizvi et al., 2006). Nach einer einmaligen i.p. Therapie mit Aktivitäten von 947 oder 1,421 MBq/kg 3 Tage nach Tumorzellinokulation konnte das Tumorwachstum verringert werden. Ein vollständiges Stoppen des Tumorwachstums konnte nach einer i.p. Verabreichung von 947 MBq/kg an fünf aufeinanderfolgenden Tagen beobachtet werden. Die Therapien waren bei den Mäusen gut verträglich, mehrere Therapiegaben waren nicht toxischer als die Einzeltherapie.

Dieselbe Forschergruppe testete auch die therapeutische Effizienz von ^{213}Bi C595 anti-MUC1-MAK bei Aszites in einem Ovarialkarzinommodell (Song et al., 2008). Eine einzelne i. p. Gabe von 355 MBq/kg ^{213}Bi C595 anti-MUC1-MAK neun Tage nach Tumorzellinstillation verlängerte die Überlebenszeit der Tiere um 25 Tage. Die maximal tolerierte Aktivität lag bei über 1.180 MBq/kg über einen Beobachtungszeitraum von bis zu 21 Wochen. Auch der monoklonale Antikörper 9.2.27 gekoppelt an ^{213}Bi für die Therapie des Melanoms wurde von der australischen Forschergruppe getestet. Das Tumorwachstum konnte zwei Tage nach Zellinstillation vollständig gestoppt werden. Der Tumor war nach dieser Zeit noch nicht vaskularisiert. Eine fraktionierte Therapie erwies sich als wirksamer als eine Einzelgabe (Rizvi et al., 2005).

In klinischen Phase I Studien wurden ^{213}Bi -Immunkonjugate bisher zur Therapie von Akuter Myeloischer Leukämie (AML) und des Melanoms eingesetzt (Jurcic 2005; Raja et al., 2007).

Studien mit ^{211}At

Dieser α -Emitter wurden im Tiermodell bisher zur Therapie des Ovarialkarzinoms (Elgqvist et al., 2006) und des Mammakarzinoms (Ballangrud et al., 2004), sowie in vitro bei Kolonadenomkarzinomzellen eingesetzt (Langmuir et al., 1990).

Petrich et al. zeigten an einem subkutanen Mausmodell des Schilddrüsenkarzinoms, dass ^{211}At nach 3 Monaten nach fraktionierter Therapie das Schilddrüsenkarzinom erfolgreich zerstört hatte (Petrich et al., 2006). Elgqvist et al. fanden zwar mit ^{211}At gekoppelt an einen tumorspezifischen Antikörper am orthotopen Mausmodell keinen Unterschied in der Wirksamkeit des Radioimmunkonjugats bei gleicher Gesamtaktivität beim Vergleich der i.p. verabreichten, fraktionierten Radioimmuntherapie des Ovarialkarzinoms mit der singulären Gabe, die Myelotoxizität war allerdings bei mehrmaliger Gabe verringert (Elgqvist et al., 2006).

In klinischen Phase I Studien wurden ^{211}At -Immunkonjugate bisher zur Therapie des Ovarialkarzinoms und des Glioblastoms Grad IV eingesetzt (Andersson et al., 2009, Zalutsky und Pozzi, 2004).

2.3 **Biolumineszenz Imaging**

In vivo Bioluminescence Imaging (BLI) ist ein geeignetes Instrument um Tumorwachstum und einen Therapieerfolg in-vivo verfolgen zu können. Es basiert auf der Erkennung von Lichtemissionen von Zellen oder Geweben. Die Biolumineszenz, die in einem lebenden Organismus biochemische Erzeugung von Licht, ist ein natürlich vorkommendes Phänomen. Luciferaseenzyme, wie jene der nordamerikanischen Firefly, katalysieren die Oxidation eines Substrates (Luciferin). Auf diese Weise werden Lichtphotonen produziert. Biolumineszenz Imaging ermöglicht eine kostengünstige, nichtinvasive Echtzeitanalyse von Krankheitsverläufen auf molekularer Ebene bei lebenden Organismen. Biolumineszenz wurde verwendet, um die Entwicklung von Tumorzellen, bakteriellen und viralen Infektionen, Genexpressionen sowie den Behandlungserfolg zu verfolgen. Bioluminescence Imaging in vivo ermöglicht longitudinales Monitoring des Krankheitsverlaufs bei ein und demselben Tier, welches eine gute Alternative zur Analyse vieler Tiere mittels Sektion zu verschiedenen Zeitpunkten des Krankheitsverlaufes darstellt (Sato et al., 2004).

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Materialien, Chemikalien und pharmakologische Wirkstoffe

Im Folgenden werden die verwendeten Materialien aufgeführt.

3.1.1 Zellkulturmedien

EJ 28-luc Blasenkarzinomzellen wurden in RPMI 1640 Medium (Biochrom, Berlin) kultiviert.

Zusätze:

10 % FKS,

1% Nicht-essentielle Aminosäuren

1% Penicillin/Streptomycin

1% Geneticin

Die Zellen wurden mit Phosphatpuffer (PBS, Biochrom, Berlin) mit Zusatz von EDTA 1% in PBS abgelöst.

3.1.2 Anästhesie und Analgesie

Für die Zellinstillationen, die Biolumineszenzaufnahmen und die Therapiestudien erfolgte die Narkose der Mäuse intraperitoneal mittels vollständig antagonisierbarer Injektionsnarkose bzw. einer Xylazin (5mg/kg)/Ketamin (100mg/kg)-Kombination. Medetomidin, Midazolam und Fentanyl wurden in einer Dosierung von 500µg/kg, 5000µg/kg und 50µg/kg eingesetzt.

Zur subkutanen Antagonisierung wurden Atipamezol, Flumazenil und Naloxon in einer Dosierung von 2500µg/kg, 500µg/kg und 1200µg/kg eingesetzt.

3.1.3 Sonstiges

Tabelle 5: Sonstige verwendete Arbeitsmittel

Arbeitsmittel	Hersteller
Anti-EGFR-Antikörper EMD 72000 (Matuzumab)	Merck, Darmstadt
Anti EpCam-Antikörper CK 931	Wilex, München

Anti-Hsp70-Antikörper	Experimentelle Radioonkologie, TU München
Atipamezol, Antisedan®	Pfizer, Karlsruhe
Augensalbe, Vidisic®	Dr. Mann Pharma, Berlin
Bovines Serum Albumin	Sigma, Steinheim
Carprofen, Rimadyl®	Pfizer, Karlsruhe
Casyton	Schärfe System, Reutlingen
Chelex 100 Sodium	Sigma, Steinheim
EDTA 1% in PBS ohne Ca^{2+} / Mg^{2+}	c.c. pro, Neustadt
Eosin	Chroma-Gesellschaft, Köngen/N.
Ethanol 70%	Merck, Darmstadt
Fentanyl, Fentanyl®	Janssen-Cilag, Neuss
FKS (Fetales Kälberserum)	Life Technologies, Karlsruhe
Flumazenil, Anexate®	Roche Pharma, Schweiz
Formalin 4% (Stammlösung 37%)	Merck, Darmstadt
Geneticin 50mg/ml	Gibco, U.K.
Gentamycin	Biochrom, Berlin
Kaisers Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
Hämalaun, Mayers	Apotheke RDI, München
Hämatoxilin	Merck, Darmstadt
Hygromycin	Invitrogen, Karlsruhe
Ketamin, Ketavet®	Pharmacia & Upjohn, Erlangen
D-Luciferin Sodium 99%	Synchem, Kassel
Medetomidin, Domitor®	Pfizer, Karlsruhe
Midazolam, Dormicum®	Roche Pharma, Schweiz
Natriumchloridlösung, 0,9%	Delta-Pharma, Pfullingen
Naloxon, Narcanti®	Janssen-Cilag, Neuss
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Nichtessentielle Aminosäuren	Biochrom, Berlin
Objektträger Superfrost® Plus	Menzel, Braunschweig
Paraffin	Monoject Scientific Inc., Irland
PBS Dulbecco	Biochrom, Berlin

PD-10 Desalting Columns	GE Healthcare, Freiburg
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Peroxidase Substrat Kit DAB SK-4100	Vector, Burlington, CA, USA
RPMI 1640 Medium	Biochrom, Berlin
Salzsäure 30%	Merck, Darmstadt
Spritze 1ml	B.Braun, Melsungen AG
Sterican Einmalkanüle (Gr. 1; 0,9x40mm)	B.Braun, Melsungen AG
Vitamin C	Sigma, Steinheim
Venenkatheter BD 26 Gauge	Becton Dickinson, Heidelberg
Well Plates	Greiner bio-one, Solingen
Xylazin, Rompun®	Bayer Vital, Leverkusen
Xylol	Merck, Darmstadt
Zellkulturflaschen	Greiner, bio-one, Solingen

3.2 Geräte

Tabelle 6: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Biofuge 13	Heraeus Sepatech, Osterode
Biolumineszenz Imaging CCD-Kamera und Verstärker	Hamamatsu, Herrsching
Brutschrank	Heraeus-Instrumente, Osterode
Cell Counter, CASY®	Schärfe, Reutlingen
Gamma-Counter TYP 1480 Wizard TM 3	Wallac, Finland
HF-Chirurgiegerät Erbotom 70	Erbe, Tübingen
IVC-Käfigsystem	Tecniplast S.P.A., Italien
Kodak Storage Phosphor Screen	Eastman Kodak Company, New York
Laminar-Flow-Arbeitsbank	Heraeus-Instrumente, Osterode
Microtom	Microm Laborgeräte, Heidelberg; Microm, Typ HM 500, Walldorf
Phosphor Imager CR 35 Bio	Dürr Medical, Beitigheim, Bissingen

3.3 Verwendete Antikörper

3.3.1 Anti-EGFR Antikörper EMD 72000 (Matuzumab)

Der Anti-EGFR Antikörper EMD 72000 (Matuzumab) wurde als Carrier bei der Therapie des humanen Harnblasenkarzinoms mit dem Alpha-Strahler ^{213}Bi verwendet. Der humanisierte, murine Antikörper EMD 72000 ist monoklonal und richtet sich gegen den EGF-Rezeptor, der ein transmembranes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 170 kDa darstellt. Dadurch kommt es zur kompetitiven Hemmung der Wachstumsfaktorbindung an EGFR, der von humanen, malignen Zellen überexprimiert wird. Der Antikörper wird bereits in klinischen Studien angewendet und zeigte in vorangegangenen Bindungsstudien das höchste Bindungsverhalten an die Harnblasenkarzinomzelllinie EJ 28 (Kapitel 3.6.1).

3.4 $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ – Generator

Das Institut für Transurane der Europäischen Kommission in Karlsruhe stellte die in der vorliegenden Studie verwendeten $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generatoren zur Verfügung. Dazu wurde ^{225}Ac trägerfrei aus einem $^{229}\text{Th}/^{225}\text{Ac}$ -Generator mit 0,5 M HNO_3 eluiert, in dem ^{229}Th -Oxid an Titanphosphatharz gebunden vorliegt (Mc Devitt et al., 1998). Anschließend wurde ^{225}Ac mittels einer Dowex 50 W x 8 Säule aus dem Gemisch mit ^{225}Ra und ^{224}Ra separiert. Zur Herstellung des $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generators wurden ca. 740 MBq ^{225}Ac -Nitrat an AGMP-50 Kationen-Austauscharz adsorbiert und mit diesem in eine Fluorpolymer Säule (5,5 cm, $r = 3,2$ mm) überführt (McDevitt et al., 1999, Apostolidis et al., 2001 und 2005).

^{213}Bi wird aus dem Generator eluiert, indem über einen Polyethylenschlauch ($r = 0,8$ mm) 600 μl einer 0,1 M $\text{HCl}/0,1$ M NaI -Lösung in den Generator eingeführt und dort während einer zweiminütigen Reaktionszeit durch die Säule vorgedrückt werden. Nach Zugabe des CHX-A''-DTPA -chelatierten anti-EGFR-Antikörpers verdrängt DTPA das Jodid aus den BiI -Komplexen und wird als $^{213}\text{Bi}^{3+}$ -Ion chelatiert. Das radioaktive Gleichgewicht zwischen ^{225}Ac und ^{213}Bi wird fünf Stunden nach dem Eluieren wieder erreicht und der Generator ist für eine erneute Elution bereit. Zur effizienten Nutzung des Generators empfiehlt sich eine ^{213}Bi -Gewinnung im Abstand von etwa 2 bis 2,5h da 90% der maximalen ^{213}Bi -Radioaktivität schon nach 150 min vorliegen. Dieses etablierte Verfahren zur Gewinnung von ^{213}Bi aus $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generatoren wird bisher nur an zwei Einrichtungen weltweit durchgeführt. Eine

ausreichende Verfügbarkeit von ^{213}Bi mittels dieses Generatorsystems ist daher in absehbarer Zeit nicht gegeben.

3.5 Actinium-225 (^{225}Ac - Zerfallsschema)

^{225}Ac entsteht über ^{229}Th aus dem natürlichen Zerfall von ^{233}U (Boll et al., 2005). Es wird weiters durch Neutronenbestrahlung von ^{226}Ra im Hochflussreaktor bzw. durch Protonenbestrahlung von ^{226}Ra im Zyklotron hergestellt. Abbildung 3 stellt das Zerfallsschema des ^{225}Ac über ^{213}Bi zu stabilem ^{209}Bi übersichtlich dar. Die Pfeile zeigen Zerfall via Teilchenemission an, die durchschnittliche Energie der ausgesendeten Partikel wird neben jedem Pfeil angezeigt.

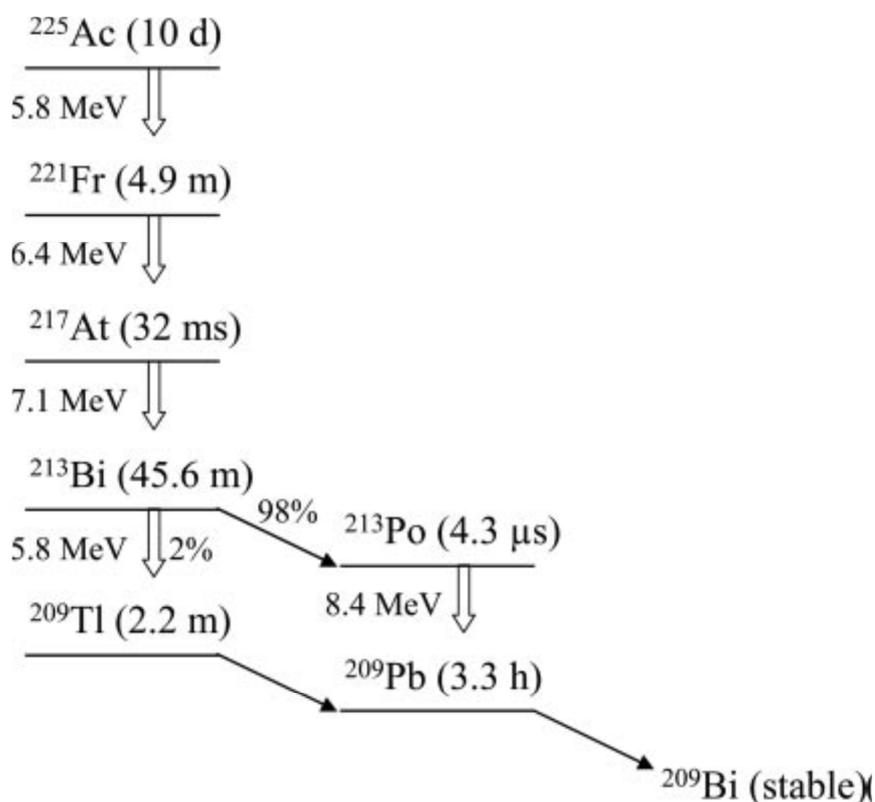


Abbildung 3: Zerfallsschema von ^{225}Ac (modifiziert nach Ballangrud et al., 2004)

^{225}Ac mit einer Halbwertszeit von 10 Tagen zerfällt zunächst unter Aussendung von α -Strahlung zu Francium, welches zu ^{217}At und schließlich zu ^{213}Bi umgewandelt wird. 98% des ^{213}Bi werden unter β^- -Zerfall in ^{213}Po umgewandelt. ^{213}Po wird wiederum mit einer Halbwertszeit von 4,2 μsec unter Aussendung von α -Strahlung in ^{209}Pb umgewandelt. Aufgrund

dieser sehr kurzen Halbwertszeit von ^{213}Po spricht man von ^{213}Bi als einem α -Strahler, obwohl die α -Teilchen mit einer Energie von 8,45 MeV von ^{213}Po emittiert werden.

Die restlichen 2% des ^{213}Bi senden zunächst ein α -Teilchen aus, in der Folge entsteht ^{209}Tl . Mit einer Halbwertszeit von 2,2 min erfolgt der β^- -Zerfall zu ^{209}Pb , welches sich mit einer Halbwertszeit von 3,3h in stabiles ^{209}Bi umwandelt. Beim ^{213}Bi -Zerfall tritt zudem γ -Strahlung mit einem Energiemaximum von 440 keV auf. Diese wird zur Erfassung der Aktivität des ^{213}Bi im Gammacounter genutzt (Pfof, 2009).

3.6 Zelllinien und Zellkultur

3.6.1 Zelllinien des humanen Harnblasenkarzinoms

3.6.1.1 EJ28-luc

Für das Mausmodell des Urothelkarzinoms wurde die humane Zelllinie EJ 28-luc verwendet. Bei dieser Zelllinie handelte es sich um eine etablierte Urothelkarzinomzelllinie, welche adhärenthes Wachstum als Monolayer zeigte. Es zeigte sich, dass die Transfektion der EJ 28-luc Zellen das in vitro-Proliferationsverhalten der Zelllinie nicht veränderte.

Diese Zelllinie wurde verwendet, da der monoklonale anti-EGFR-Antikörper EMD 72000 Matuzumab in Bindungsstudien mit den humanen Blasenkarzinomzelllinien J82, T24, RT112, 647V und EJ28 die beste Bindung an die Zelllinie EJ28 zeigte. Diese betrug 33,83 % (Pfof, 2009).

3.6.2 Kultivierung der Zellen

Die Zelllinie EJ28-luc wurde in RPMI 1640 Medium (Biochrom AG, Berlin) mit 10% FKS, 1% nicht-essentiellen Aminosäuren (NEAS) (Biochrom AG, Berlin), 100 IU/ml Penicillin und 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin kultiviert. Die Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO_2 sowie 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Dem Zellkulturmedium der Harnblasenkarzinomzellen wurde additiv 1% Geneticin (Gibco, UK) zugesetzt. Die Medien waren mit einem pH-abhängigen Indikator versetzt, durch einen Farbumschlag von rot nach gelb wurde die Anreicherung saurer Stoffwechselprodukte angezeigt. Der Wechsel des Zellkulturmediums wurde alle 3-4 Tage durchgeführt. Das Ablösen der Zellen und deren Passagieren wurden unter einer Lamina-Flow-Arbeitsbank durchgeführt. Diese Arbeitsschritte erfolgten unter aseptischen Bedingungen. Wenn die Zelllinien jeweils etwa eine Dichte von 1×10^7 Zellen

(konfluierender Zellrasen) pro Kulturflasche erreicht hatten, wurden sie passagiert. Dies wurde je nach Größe der Zellkulturflasche ca. alle 4-5 Tage durchgeführt.

Die Zelllinien zeigten ein adhärentes epitheliales Wachstum. Um die Zellen zu passagieren wurden sie zunächst mit 8 ml 1mM EDTA in PBS abgelöst. Dazu wurden sie bei 37°C für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die abgelösten Zellen in sterile Zentrifugenröhrchen pipettiert und 3 min bei 1300 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellsediment zur Passagierung oder zur Zellzählung für weitere Versuche mit FKS-haltigem Medium resuspendiert.

3.6.3 Transfektion der EJ28 Zellen

Die Zelllinie EJ 28 wurde unter Kontrolle des Cytomegalovirus Promoters mit dem Expressionsvector pcDNA3.1 stabil mit Firefly Luciferase (*Photinus pyralis*) transfiziert. Dafür wurden konfluierende Zellen in 6-well Platten mit 0.8gpcDNA3.1, 20µl Effectene und 6.4µl Enhancer pro well laut Herstelleranweisung inkubiert (Quiagen, Hilden, Germany). Stabile EJ28-luc Zellklone wurden durch Behandlung mit 800µg/ml Geneticin ausgewählt. Die mit Luciferase transfizierten EJ28-luc Zellen wurden danach in RPMI Zellkulturmedium passagiert, welches mit 10% fetalem Kälberserum, 1% nicht-essentiellen Aminosäuren, 1% Penicillin/Streptomycin (10000IE/10mg/ml) und 1% Geneticin (800µg/ml) supplementiert war. Die Zellen wurden bei 37° C in feuchter Atmosphäre mit 5% CO₂ kultiviert. Die transfizierten Zellen wurden zum Nachweis des Tumorwachstums in vivo mittels Biolumineszenz Imaging verwendet. Durchgeführt wurde die Transfektion dankenswerterweise von Dr. D. Saur, II. Medizinische Klinik und Poliklinik, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München.

3.6.4 Chelatierung der Antikörper

Vor der Kopplung von ^{213}Bi an den Antikörper war die Chelatierung desselben notwendig. Für die Chelatierung metallischer Nuklide wie ^{111}In , ^{90}Y und ^{213}Bi hat sich der Chelator CHX-A''-DTPA bewährt (Brechtel und Gansow 1991, Mirzadeh und Kennel 1996). Die Pufferlösungen, welche für die Bindung von CHX-A''-DTPA an den Antikörper verwendet wurden, wurden vor ihrer Verwendung mittels Chelex 100 bzw. EDTA von Metallionen befreit. Der Chelator wurde kovalent an den Antikörper gebunden. Die kovalente Bindung von CHX-A''-DTPA an den Antikörper erfolgte in NaHCO₃ (50 mM)/NaCl (20 mM) Puffer bei einem pH-Wert von 8,5 nachtsüber bei Raumtemperatur. Pro Antikörper-Molekül wurden 3-5 Chela-

tormoleküle gebunden (Nikula et al., 1999). Danach erfolgte die Kopplung des Isotops an die vorchelatierten Antikörper.

3.6.5 Markierung der chelatierten Antikörper mit ^{213}Bi

Nach dem Eluieren des $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generators wurde der zuvor chelatierte anti-EGFR-MAb mit ^{213}Bi markiert. Dazu wurde das Eluat (600 μl einer 0,1M HCl/0,1M NaI-Lösung) mit 100 μl Vitamin C (Strahlenschutz für den Antikörper), und mit 100 μl 3M Ammoniumacetat ($\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$) versetzt um das gewonnene ^{213}Bi auf einen pH-Wert von 5,5 zu bringen. Dazu wurden 100 μg des Antikörpers gegeben. Nach guter Durchmischung wurde das Gemisch bei Raumtemperatur für 7 Minuten inkubiert.

Mittels Gelfiltration (PD10 Säule, GE Healthcare, Freiburg) wurde freies ^{213}Bi , das nicht an den Antikörper gekoppelt wurde, abgetrennt. Das Volumen der RIK-Lösung wurde dazu zunächst auf 2,5 ml mit PBS aufgefüllt und auf die Säule aufgetragen. Die ^{213}Bi -Immunkonjugate wurden dann durch Elution mit 2 ml PBS aus der Säule ausgespült. Vor und nach der Gelfiltration wurde der Anteil des an den Antikörper gekoppelten ^{213}Bi mittels Instant Thin Layer Chromatographie geprüft (ITLCTM, Pall Corp.). Dazu wurden 2 μl des 1:100 in PBS verdünnten Radioimmunkonjugats 5 mm oberhalb des Endes eines ITLC-Papierstreifens (5x70 mm) pipettiert. 0,05M Tri-Natrium-Citrat (pH 5,5) dienten als Laufmittel. Durch die Kapillarwirkung des ILTC-Streifens stieg das Laufmittel nach oben und transportierte dabei freie ^{213}Bi -Ionen. Bei Erreichen des oberen Endes des Papierstreifens wurde dieser mittig in zwei Teile geschnitten und die ^{213}Bi -Aktivität beider Teile im Gamma-Counter gemessen. Im unteren Teil wurde der Anteil des ^{213}Bi -Immunkonjugates, im oberen Teil des Papierstreifens der des freien ^{213}Bi gemessen.

3.6.6 Bindungsstudien

Bindungsstudien (modifiziert nach Nikula et al., 1999) mit den Zellen der Harnblasenkarzinomzelllinie EJ 28 wurden von Pfof (2009) durchgeführt (siehe Kapitel 3.6.1). Die Bindung des ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk an seinen Rezeptor wurde durch die Transfektion nicht beeinträchtigt (Pfof, 2009).

3.7 Tierexperimente

3.7.1 Haltung der Versuchstiere

Die Versuchstiere (weibliche Swiss nu/nu und Balb/c nu/nu Mäuse) wurden in einem Tierstall mit speziellem Lichtprogramm in eigens dafür vorgesehenen IVC-Käfigen bei 26°C und 50-60% Luftfeuchtigkeit gehalten. Bei Ankunft waren sie zwischen 4 und 8 Wochen alt und hatten 2 Wochen Akklimatisationszeit vor Versuchsbeginn. Es wurden jeweils 5 Tiere gemäß ihrem Sozialverhalten in einem Käfig gehalten. Autoklavierter Zellstoff und Papierrollen sorgten für eine tiergerechte Ausstattung der Käfige. Bezogen wurden die Tiere aus spezifiziert pathogenfreier Zucht (Charles River, Frankreich). Die Mäuse erhielten Mäusestandardfutter (Altromin 1314) und Leitungswasser ad-libitum. Die Käfige wurden zweimal wöchentlich gereinigt und desinfiziert, als Einstreu wurde Altromin Faser-Einstreu verwendet. Die Tierversuche wurden mit Genehmigung der Regierung von Oberbayern mit dem AZ 55.2-1-54-2531-50-2008 durchgeführt.

3.7.2 Methodik der Zellinstillation von EJ 28-luc Harnblasenkarzinomzellen

Durch orthotope Xenotransplantation der Luciferase-transfizierten Zelllinie EJ 28-luc wurde eine Induktion des humanen Harnblasenkarzinoms in der Maus erreicht. Günther et al (1999) beschrieb ausführlich die Methodik der intravesikalen Tumorzellimplantation und sie wurde in dieser Arbeit modifiziert nach Pfof, 2009 angewandt.

Für die Zellinstillation wurden die weiblichen Swiss nu/nu Mäuse mit einer intraperitoneal verabreichten und voll antagonistischen Narkosekombination aus einem α_2 -Agonisten (Medetomidin), einem Benzodiazepin (Midazolam), sowie einem Opioid (Fentanyl) anästhesiert. Unter lokaler Applikation von Gleitgel (Vidisc®, Dr. Mann Pharma, Berlin) wurde in Narkose ein 26-gauge Venenverweilkatheter (Becton Dickinson, Heidelberg) ohne Mandrin transurethral in die Harnblase vorgeführt und verbliebener Urin abgelassen. Danach wurden mit einer Kautereinheit im monophasischen Koagulationsmodus (Hochfrequenz-Chirurgiegerät Erbotom T 71 D, ERBE, Tübingen) mehrere kleine Läsionen in das Blasenurothel der Mäuse gesetzt, indem ein Metalldraht durch den Katheter bis an die Blasenwand vorgeschoben wurde. Die Mäuse wurden in Rückenlage auf die Neutralisierielektrode der Kautereinheit gelegt. Bei jedem Tier wurde zwölfmal ein Kontakt zum Metalldraht für je 1 sec bei 7 W hergestellt. Die entstandenen Läsionen imitierten die Situation nach TUR beim Patienten. Danach wurde der Metalldraht entfernt, und 2×10^6 EJ 28-luc Zellen wurden in 50µl sterilem RPMI-Medium

intravesikal instilliert. Nach der Instillation blieben die Tiere noch für weitere 3 Stunden in Narkose und die Katheter wurden mit aufgesetzter Spritze in der Harnblase belassen um ein Festsetzen der Tumorzellen an die Läsionen in der Blase zu garantieren. Danach wurden die Tiere mittels der jeweiligen Antagonisten Atipamezol, Flumazenil und Naloxon antagonistisiert und bis zum Aufwachen beobachtet.

Insgesamt wurden zehn Tiere als untherapierte Kontrollgruppe zur Ermittlung der Überlebenszeit nach Zellinstillation verwendet. Eine Gruppe (n=6) blieb wie die Kontrollgruppe unbehandelt und diente zur Bestätigung des Vorhandenseins eines Tumors nach Signal im Biolumineszenz Imaging bzw. zur Korrelierung einer bestimmten Intensität eines Biolumineszenzsignals mit der tatsächlichen Ausbreitung des Tumors mittels histologischer Untersuchung: Verschieden starke Signale im Biolumineszenz Imaging wurden mit dem pathohistologischen Befund der Blase verglichen. Dadurch sollte bewiesen werden, dass ein kleines Signal einem histologisch kleinen Tumor entsprach und eine Blase mit großem Signal dementsprechend hochgradiges tumoröses Gewebe aufwies. Dazu wurden jeweils 2 Tiere mit negativem bzw. kleinem Signal und jeweils ein Tier mit mittlerem bzw. großem Biolumineszenzsignal direkt nach der Messung euthanasiert. Die Blasen wurden sofort danach entnommen, in Paraffin gebettet und mittels Hämatoxylin-Eosin Färbung befundet.



Abbildung 4: Katheterisieren der Tiere (aus Pfof, 2009)

3.7.3 Biolumineszenz Imaging

Für das Biolumineszenz Imaging wurden die Tiere intraperitoneal mit einer Kombination aus 300 μl D-Luciferin (15 mg/ml) und 190 μl Anästhetikum bestehend aus 82% NaCl, 10% Ketamin (Ketavet®, Pharmacia&Upjohn, Erlangen) und 8% Xylazin (Rompun®, Bayer, Leverkusen) injiziert. Eine Woche nach Zellinokulation wurde mit dem Biolumineszenz Imaging begonnen. Nach der Einwirkzeit des Luciferins von 15 min wurden die Mäuse für die Aufnahme auf einem Gelkissen zur Erhaltung der Körpertemperatur in der Dunkelkammer der CCD-Kamera gelagert. Die Aufnahmen erfolgten in Rückenlage. Zuerst wurden von jedem Tier zur Identifikation und Darstellung der Lagerung Hellfeld-Aufnahmen angefertigt, sofort im Anschluss daran erfolgten die Biolumineszenz Aufnahmen zur Erfassung des Biolumineszenz-Signals der Tumorzellen mit einer Belichtungszeit von 180- und 280 sec. Zur Auswertung der Bilder wurde die Hellfeld-Aufnahme mit dem Biolumineszenz-Signal überlagert (Pseudocolour Image) und das Lichtsignal mit dem Programm Simple PCI (Hamamatsu, Herrsching) quantifiziert.

Bei der Quantifizierung der Lichtsignale wurden die Lichtemissionen der transfizierten Tumorzellen innerhalb einer definierten „Region of Interest“ (ROI) durch Subtraktion des Hintergrundsignals als „Total dose of light emissions“ bestimmt. Abbildung 5 zeigt zwei „Regions of Interest“. Die erste wurde über den Lichtemissionen der Tumorzellen gesetzt, die zweite „Region of Interest“ über dem Hintergrund. Subtraktion des Hintergrundsignals vom Signal des Vordergrunds ergibt die Lichtemissionen der Tumorzellen, ausgedrückt in Zahlen.



Abbildung 5: Legen der ROIs im Biolumineszenz Imaging

3.7.4 Lokoregionale Alpha-Radioimmuntherapie des Blasenkarzinoms

Nach Erfassung der Tumorangehrate über Biolumineszenz Imaging wurden die Tiere in den Therapiegruppen mit 0,46 und 0,93 MBq ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk behandelt. Eine Gruppe (n=10) wurde mit 1 μg des unmarkierten anti-EGFR-Antikörpers behandelt. Für die Applikation des ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk in die Mäuseblase wurden die Tiere anästhesiert. Ein 26-gauge Venenverweilkatheter (Becton Dickinson, Heidelberg) ohne Mandrin wurde unter lokaler Applikation von Gleitgel (Vidisic®, Dr. Mann Pharma, Berlin) transurethral in die Harnblase vorgeführt und verbliebener Urin abgelassen. Die Aktivität gekoppelt an den Antikörper wurde danach in einem Volumen von 50 μl pro Maus wiederum mittels Katheter und aufgesetzter Spritze in die Blase instilliert und darin für 90 min (entsprechend zwei Halbwertszeiten des ^{213}Bi) belassen. Nach dieser Zeit wurde die Narkose antagonisiert und die Tiere bis zur vollständigen Erholung beobachtet.

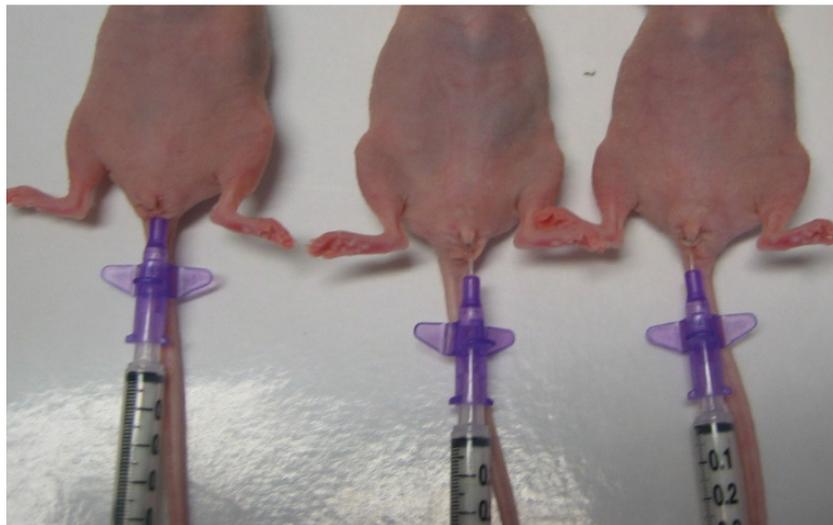


Abbildung 6: Weibliche swiss nu/nu Mäuse während lokoregionaler Applikation von ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk (aus Pfst, 2009)

Die Therapiegruppen, die mit dem Radioimmunkonjugat bzw. mit $1\mu\text{g}$ eines unmarkierten anti-EGFR-MAk behandelt wurden (Kaltantikörpergruppe), zeigt Tabelle 7.

Tabelle 7: Übersicht der Behandlungsgruppen (Blasenkarzinommodell)

<u>Behandlungsgruppen</u>	<u>Zeitpunkt zwischen Zellinstillation und Therapie</u>	<u>Intravesikal instillierte Aktivität</u>	<u>Therapie mit unmarkiertem anti-EGFR-MAk</u>
Kontrollgruppe (n=10)	-	-	-
Kaltantikörpergruppe (n=10)	14-36d	-	$1\mu\text{g}$ (3x im Abstand von 4d)
Therapiegruppe 1 (n=9)	14-36d	0,46 MBq (3x im Abstand von 4d)	-
Therapiegruppe 2 (n=15)	23-44d	0,93 MBq (2x im Abstand von 7d)	-
Therapiegruppe 1a (n=11)	24d	0,46 MBq (3x im Abstand von 4d)	-
Therapiegruppe 2a (n=9)	24d	0,93 MBq (2x im Abstand von 7d)	-
Histologiegruppe 1 (n=6)	-	-	-
Histologiegruppe 2 (n=5)	Keine ZI	0,46 MBq (3x im Abstand von 4d)	-
Toxizitätsgruppe 1 (n=5)	Keine ZI	1,85 MBq (2x im Abstand von 7d)	-
Toxizitätsgruppe 2 (n=5)	Keine ZI	3,7 MBq (2x im Abstand von 7d)	-

Die Therapiegruppen (Therapiegruppe 1, 2, 1a, 2a), die mit 0,46 MBq-anti-EGFR-MAk bzw. mit 0,93 MBq-anti-EGFR-MAk behandelt wurden, sollten jeweils miteinander verglichen werden. Zur Prüfung auf Gewebeschäden an gesundem Urothel wurden zwei tumorfreien Gruppen (Toxizitätsgruppen 1 und 2) je zweimal im Abstand von 7 Tagen 1,85 bzw. 3,7 MBq ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAk verabreicht und eine tumorfreie Gruppe (Histologie Gruppe 2) dreimal im Abstand von 4 Tagen mit 0,46 MBq ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAk mitbehandelt. Die Kontrollgruppen erhielten keine Therapie.

3.7.5 Tötung und Sektion der Tiere

Die Euthanasie der Tiere erfolgte durch Betäubung mit CO_2 und nachfolgendem Atemstillstand. Die Tiere wurden unmittelbar nach Eintritt des Todes seziiert um pathologische Vorgänge und morphologische Veränderungen zu dokumentieren. Die Sektionen wurden in dieser Studie vorwiegend zur Organgewinnung durchgeführt, um vor allem Nieren, Harnblase und Lunge auf makroskopisch erkennbare Schädigungen zu untersuchen und sie für die histologische Untersuchung bereitstellen zu können.

3.8 Histologie

Die Histologiepräparate wurden dankenswerterweise von Herrn PD Dr. Gregor Weirich vom Institut für Pathologie der Technischen Universität München befundet. Auch die immunhistochemische Färbung wurde vom Institut für Pathologie der TUM durchgeführt.

3.8.1 Anfertigung von Paraffinschnitten

Die Gewebseinbettung in Paraffin wurde für die Hämatoxylin-Eosin-Anfärbung der Mäuseblasen verwendet. Die Gewebe wurden unmittelbar nach der Entnahme aus dem Tier entwässert und in diesem Zustand in Paraffin eingebettet. Nach einer Abkühlzeit von ca. 4 Stunden im -20°C Gefrierschrank konnten die Organe geschnitten werden (Microm Laborgeräte, Heidelberg). Die Dicke der Schnitte betrug $4\mu\text{m}$. Danach wurden sie direkt mit gereinigten Objektträgern (Superfrost® Plus, Menzel, Braunschweig) aufgenommen und getrocknet.

3.8.2 Hämatoxilin-Eosin (HE)-Färbung der Paraffinschnitte

Für die HE-Färbung wurden die Schnitte zunächst mit einer absteigenden Alkoholreihe fixiert, und danach laut folgendem Protokoll gefärbt.

Tabelle 8: Protokoll für die HE-Färbung

Saures Hämalaun (nach Mayer)	1 min
Wässern in Leitungswasser (Bläuen)	5 min
Eosin wässrig (1 %)	30 s
Aqua dest.	1 min
Lufttrocknen	20 min
Glyceringelatine	Je 5 min

3.8.3 Autoradiographie der Blasenschnitte mittels Micro-Imager

Der Mikro-Imager diente für autoradiographische Untersuchungen der Blasenschnitte. Mit Hilfe dieses Verfahrens lässt sich die Bindung von ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk in Gewebeschnitten lokalisieren. Der μ -IMAGERTM (CR 35 Bio, Dürr Medical Company) analysierte und erfasste als hochauflösendes digitales Messgerät Radionuklid-markierte Moleküle in den histologischen Gewebeschnitten. Die Lokalisation des ^{213}Bi in der Blase wurde mittels der autoradiographischen Technik dargestellt:

10 μm dicke Paraffinschnitte wurden mit 37 kBq ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk versetzt. Nach 30 min Inkubationszeit wurden die Schnitte 3x mit PBS gewaschen und ein Screen (Kodak Storage Phosphor Screen, Eastman Kodak Company, NY) aufgelegt. Die Darstellung der ^{213}Bi -markierten Moleküle erfolgte nach 30 min bis 1 h (Raytest, Software Aida Image Analyzer).

3.8.4 Immunhistochemischer Nachweis des EGF-Rezeptors

Bei der indirekten, immunhistochemischen Färbung des EGF-Rezeptors wird ein spezifischer Antikörper (Primärantikörper) gegen den EGFR auf die zu untersuchenden Gefrierschnitte der Mäuseblasen aufgebracht. Danach wird ein enzym-gekoppelter Sekundär-Antikörper, gerich-

tet gegen den Primärantikörper, aufgetragen. Nach Zugabe eines geeigneten Substrats induziert das Enzym die Farbentstehung.

Als Primärantikörper wurde der humanisierte murine anti-EGFR-MAk EMD 72000 und als Sekundärantikörper ein polyklonaler Kaninchen anti-human IgG Ak, mit Horse Radish Peroxidase (HRP) konjugiert, verwendet. HRP vermittelt die Umsetzung des Substratchromogens DAB (3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid) und dadurch entsteht eine bräunliche Färbung.

Die Gefrierschnitte (4 µm) wurden mit dem Kryostat (Microm, Typ HM 500, Walldorf) angefertigt, auf Objektträger (Superfrost® Plus, Menzel, Braunschweig) aufgenommen und anschließend an der Luft getrocknet (30 min). Im nächsten Schritt folgte das Fixieren der Kryoschnitte für 10 min in -20°C kaltem Aceton und eine 2-malige Waschung der Schnitte (3 min) in PBS. Die Schnitte wurden mit 5% Mausserum in PBS-BSA mit 0,1% Triton-X-100 und 0,05% Tween 20 für 30 min inkubiert um Kreuzreaktionen mit endogenem IgG zu verhindern. Der Primärantikörper wurde nach Entfernen der Lösung mit PBS-BSA auf die Gewebeschnitte aufgebracht (Verdünnung 1:40) und für eine Stunde inkubiert. Nach 2-maliger Waschung in PBS (2 min) wurde die endogene Peroxidase in einer Methanol-H₂O₂-Aqua dest.-Lösung (200:5:45) für 10 min blockiert. Die Schnitte wurden 3-malig in PBS gewaschen (2 min), der Sekundär-Antikörper in einer 1:80 Verdünnung mit PBS auf die Schnitte inklusive der Negativkontrollen aufgebracht und 30 min inkubiert. Nach 3-maligem Waschen (2 min) in PBS wurde die DAB Peroxidase Substrat-Lösung aufgetragen, 10 min inkubiert und anschließend 5 min in Leitungswasser gewaschen. Hämatoxylin diente zur Gegenfärbung für 45 sec. Danach erfolgte das Bläuen in Leitungswasser für 5 min. Anschließend wurden die Schnitte getrocknet und mit Kayser's Glycerin-Gelatine eingedeckt.

3.9 Statistik der Überlebensdaten

Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe des SigmaPlot-Programms (Systat, Erkrath) und SPSS-Software (SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt. Die Überlebensdaten aus den Therapiestudien wurden über einen Zeitraum von 300 Tagen nach erfolgter Therapie erfasst und der Mittelwert der Überlebenszeiten der Tiere im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe in Tagen ermittelt. Die gewonnenen Daten wurden unter anderem in Kaplan-Meier-Überlebenskurven dargestellt.

Der Beobachtungszeitraum der Mäuse betrug jeweils 300 Tage. Tiere, die länger überlebten, wurden zensiert und in der statistischen Analyse mit „>300“ angegeben.

Erst bei extrem großem Umfang der „Stichproben“, näherte sich der erhaltene Mittelwert auch dem tatsächlichen statistischen Wert an. Da unsere unterschiedlichen Versuche jedoch mit relativ kleinen Mäusezahlen durchgeführt wurden, somit die Stichprobe relativ klein war, schien es sinnvoll, ein Konfidenzintervall anzugeben, der die genaue Lageschätzung des Mittelwertes präziserte. Das Vertrauensintervall gab einen Bereich um den geschätzten Wert des Parameters an, der mit einer zuvor festgelegten Wahrscheinlichkeit die wahre Lage des Parameters beschrieb. Daher konnte man die Signifikanz des Konfidenzintervalls direkt ablesen.

Somit gab das 95 % - Konfidenzintervall an, dass der wahre Wert mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % in dem berechneten Intervall lag.

Die Vergleiche der Überlebenskurven und die Berechnung der statistischen Signifikanzen wurde mittels des log-rank-test durchgeführt. Als hochsignifikant wurden Werte mit Signifikanzniveau $p < 0,01$, als signifikant Werte mit $p < 0,05$ definiert.

4. ERGEBNISSE

4.1 Charakterisierung der verwendeten Zelllinien

Die Eigenschaften der verwendeten Zelllinien sind in den folgenden Kapiteln beschrieben.

4.1.1 Proliferation der Zellen in vitro

Die EJ28-luc Harnblasenkarzinomzellen zeigten kurz nachdem sie in Kultur genommen wurden zunächst ein verzögertes Wachstum, die sogenannte lag-phase, die zwischen einigen Stunden und einigen Tagen andauern konnte. Die logarithmische Wachstumsphase der Zellen, die danach einsetzte, führte dazu, dass ein Aufteilen in neue Kulturflaschen alle 2-3 Tage notwendig wurde, da nach jeweils dieser Zeit der Zellrasen konfluierend war.

4.1.2 Transfektion der EJ28 Zellen

Zur Bestätigung der stabilen Transfektion der EJ28-luc Harnblasenkarzinomzellen mit Firefly Luciferase (*Photinus pyralis*) – dankenswerterweise durchgeführt von Dr. Dieter Saur, II. Medizinische Klinik und Poliklinik, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München - wurden 2×10^6 bzw. 12×10^6 Zellen in einem 1,5 ml Eppendorf Gefäß aufgenommen, diese mit 100 μl Luziferin (15mg/ml) versetzt und 15 Minuten später wurde das Biolumineszenzsignal mittels Biolumineszenz Imaging überprüft. Von den Zellen ausgehende Lichtemissionen konnten schon bei einer Belichtungszeit von 60s und einem Verstärkungsgrad von 900 dargestellt werden. Die Tatsache, dass 12 Millionen Zellen (Abbildung 7, unten im Bild) stärkere Lichtemissionen aussenden konnten als eine 6-mal geringere Zellzahl (Abbildung 7, oben im Bild) wurde bewiesen.

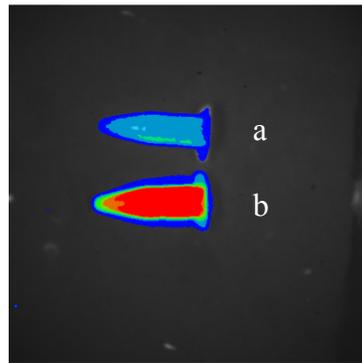


Abbildung 7: Pseudocolour-Images der Biolumineszenz von (a) 2×10^6 bzw. (b) 12×10^6 EJ28-luc Harnblasenkarzinomzellen

4.2 Antikörpermarkierung mit ^{213}Bi

Die Markierung des Anti-EGFR-Antikörpers EMD 72000 (Matuzumab) mit ^{213}Bi erfolgte nach der unter 3.6.5 beschriebenen Methode. Dabei wurden jeweils $100 \mu\text{g}$ des chelatierten Antikörpers in das ^{213}Bi -Eluat mit Aktivitäten von $20,52 \text{ MBq} - 200,89 \text{ MBq}$ pipettiert. Nach 7 Minuten Inkubation bei RT wurden dabei im Mittel 84% (Bereich $71\% - 95 \%$) des ^{213}Bi gebunden. Nach Abtrennung von nicht gebundenem ^{213}Bi mittels Gelfiltration über eine PD-10 Säule lagen im Mittel $94,5\%$ (Bereich $78\% - 100\%$) des ^{213}Bi gebunden am Antikörper vor. Es ergaben sich spezifische Aktivitäten der ^{213}Bi -markierten Antikörper von $0,22 \text{ MBq}/\mu\text{g}$ bis $1,98 \text{ MBq}/\mu\text{g}$ Antikörper.

Bei einem durchschnittlichen Molekulargewicht eines Antikörpers von 150 kDa entspricht $1 \mu\text{g}$ Antikörper etwa 4×10^{12} Molekülen. $1 \text{ MBq } ^{213}\text{Bi}$ sind 4×10^9 ^{213}Bi -Atome. Über die spezifische Aktivität lässt sich somit berechnen, wie viele der Antikörpermoleküle mit ^{213}Bi markiert sind. So entspricht eine spezifische Aktivität von $0,22 \text{ MBq}/\mu\text{g}$ AK einer Markierung von einem von 4546 anti-EGFR-MAK Molekülen; eine spezifische Aktivität von $1,98 \text{ MBq}/\mu\text{g}$ AK von einem von 505 Molekülen. Die Immunreaktivität der verwendeten Antikörper wird durch die ^{213}Bi -Markierung nicht beeinträchtigt, falls die Anzahl der pro Antikörper gekoppelten CHX-A'-DTPA Chelate 3-5 nicht übersteigt (Milenic et al., 2001).

4.3 Tierexperimente

4.3.1 Tumorangehrate nach Injektion von EJ28-luc Blasenkarzinomzellen

Nach Instillation einer Zellzahl von 2×10^6 EJ28-luc Harnblasenkarzinomzellen betrug die Tumorangehrate bei unseren Tieren 61,5%.

Direkt nach Zellinstillation konnte bei den meisten Tieren eine Makrohämaturie gesehen werden, welche nach 2 Tagen völlig sistierte und erst wieder in Anwesenheit eines hochgradigen Blasentumors auftrat. Bei Präsentwerden von tumorbedingten Krankheitssymptomen wie deutlichem Gewichtsverlust und vermindertem Allgemeinbefinden wurden die Tiere euthanasiert.

In der Sektion, welche jedes Mal unmittelbar nach der Euthanasie durchgeführt wurde, wurde das massive Tumorwachstum mit Gefäßeinsprossungen in der Blase deutlich.

Die Darstellung der Entwicklung des Tumors bis hin zu dessen hochgradiger Ausbildung wurde in vivo mittels Biolumineszenz Imaging gezeigt.

4.3.2 Biolumineszenz Imaging der Urothelkarzinome

Das Biolumineszenz Imaging ermöglichte die in vivo Darstellung der Tumorausbildung.

4.3.2.1 Kontrolle der Tumorangehrate

Die in vivo-Darstellung des sich etablierenden Tumors im Biolumineszenz Imaging aus verschiedenen Aufnahmepositionen ergab aufgrund der anatomischen Lage der murinen Harnblase eine deutlich bessere Darstellung von ventral als von lateral bzw. von dorsal. Aus diesem Grund wurden die folgenden Aufnahmen von ventral, in Rückenlage der Maus angefertigt.

30 min nach Zellinstillation konnte man das Vorhandensein der EJ28-luc Harnblasenkarzinomzellen in der Harnblase im Biolumineszenz Imaging sehr deutlich darstellen, wie Abbildung 8 zeigt. Die intravesikalen Katheter befanden sich noch in der Blase.

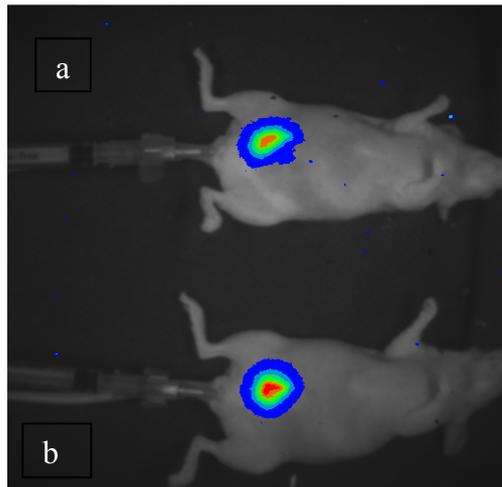


Abbildung 8: Biolumineszenz Imaging von zwei Tieren 30 min nach intravesikaler Zellinstillation

(a): Maus nicht im Anhang vorhanden, da sich kein Tumor entwickelte, (b): Maus Nr. 39, siehe Anhang

Sieben Tage nach Zellinstillation wurde ein Vorhandensein eines Blasentumors das erste Mal überprüft. Nach dieser Zeit konnte bei 17% der Tiere, die im Laufe der Beobachtungszeit einen Tumor entwickelten, ein Signal im Biolumineszenz Imaging erkannt werden, welches aber noch nicht in Pseudo Colours dargestellt werden konnte: Es soll erwähnt werden, dass bei geringgradigen Signalen die Sensitivität der CCD Kamera nicht ausreichte, um die Daten in Pseudocolour Images umzusetzen, das Vorhandensein einer Biolumineszenz konnte aber dennoch gezeigt werden. In Abbildung 9 kann man bereits ein kleines Biolumineszenz Signal bei dem Tier unten im Bild erkennen (Belichtungszeit 280s, Verstärkungsgrad 900), bei dem Tier oben im Bild ist noch kein Signal zu erkennen.

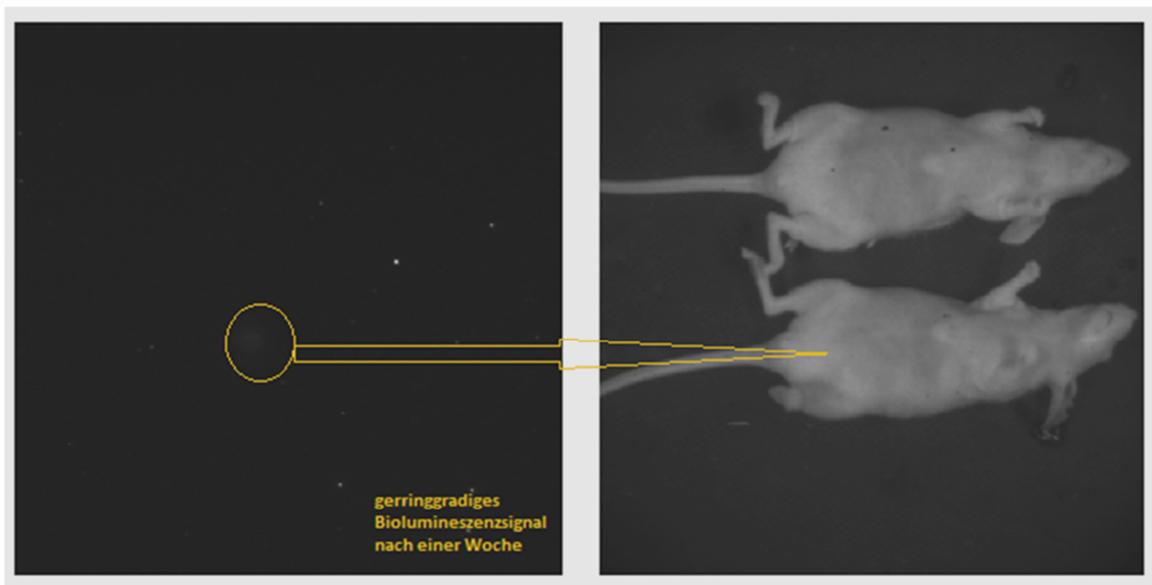


Abbildung 9: Intensität der Lichtemissionen im Biolumineszenz Imaging 7 Tage nach Zellinstillation

(Maus Nr. 19, siehe Anhang)

Ein deutliches Signal von transfizierten EJ28-luc Zellen konnte im Biolumineszenz Imaging 14 Tage nach Zellinstillation erkannt werden (Abbildung 10). 58% der Tiere, die im Laufe der Beobachtungszeit einen Tumor entwickelten, zeigten zu diesem Zeitpunkt ein Signal. Bei dem Tier in Abbildung 10 konnte man ein deutlich größeres Biolumineszenzsignal als an Tag 7 nach Zellinstillation (Abbildung 9) erkennen (Belichtungszeit 280 s, Verstärkungsgrad 900). Die beiden anderen Tiere zeigten kein Signal.

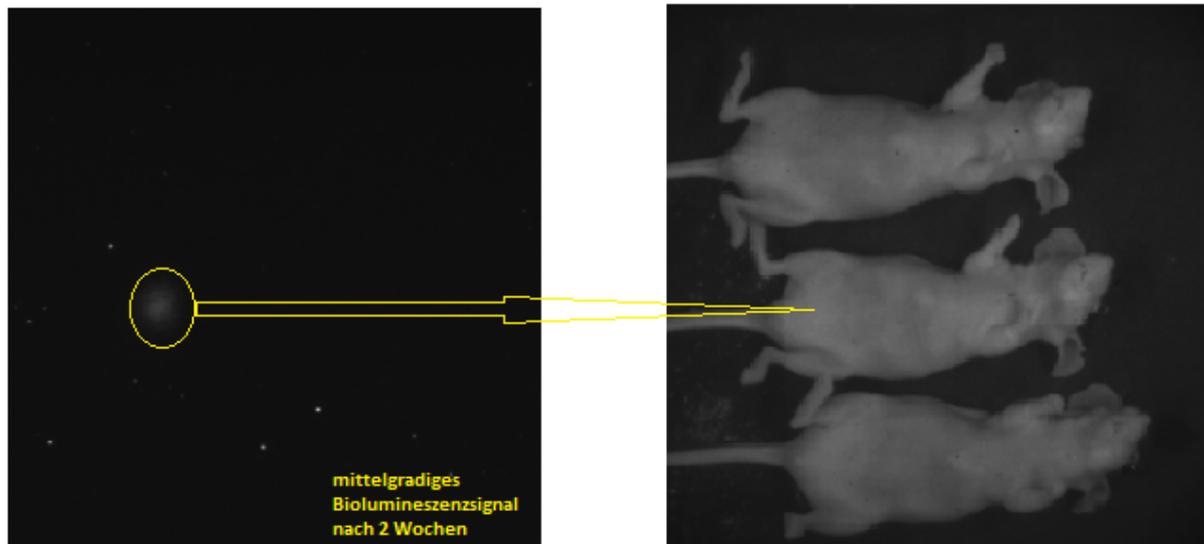


Abbildung 10: Intensität der Lichtemissionen im Biolumineszenz Imaging 14 Tage nach Zellinstillation

(Maus Nr. 19, siehe Anhang)

Schließlich zeigten 85% der tumortragenden Mäuse drei Wochen nach intravesikaler Zellinstillation ein Signal im Biolumineszenz Imaging (Abbildung 11), welches auch in Pseudocolors dargestellt werden konnte. Das Biolumineszenzsignal war bei dem Tier nun bereits sehr stark (Belichtungszeit 280 s, Verstärkungsgrad 900). Bei dem anderen Tier konnte man kein Signal erkennen.

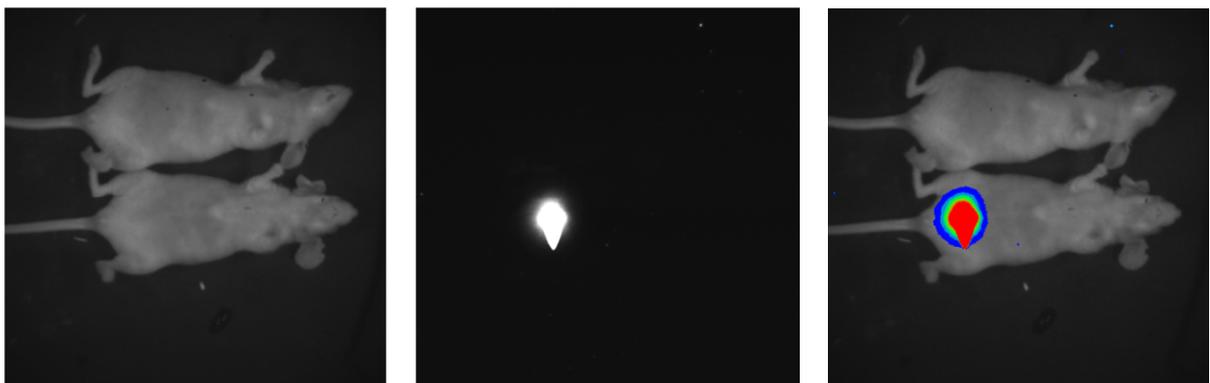


Abbildung 11: Intensität der Lichtemissionen im Biolumineszenz Imaging 21 Tage nach Zellinstillation

(Maus Nr. 19, siehe Anhang)

Bei 15% der Tiere, die im Laufe der Beobachtungszeit einen Tumor entwickelten, kam es zu einem späten Tumorwachstum zwischen dem 31. und 43. Tag nach Zellinstillation.

4.3.2.2 Kontrolle der therapeutischen Effizienz nach Therapie

Nachdem die Mäuse mit 0,46 bzw. 0,93 MBq ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk therapiert wurden, wurde das Tumorwachstum 4 Tage nach der letzten Therapie mittels Biolumineszenz Imaging kontrolliert. Aus in- vitro Studien geht hervor, dass nach dieser Zeitspanne der Zelltod bei HSC45-M2 Magenkarzinomzelllinien eingetreten ist (unveröffentlichte Daten, Seidl, 2010). Abbildung 12 zeigt Maus 30 (siehe Anhang) 33 Tage nach Zellinstillation und vier Tage nach letzter Therapie mit dreimalig 0,46 MBq ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk im Abstand von vier Tagen. Nach der Therapie konnten keine Lichtemissionen mehr detektiert werden.

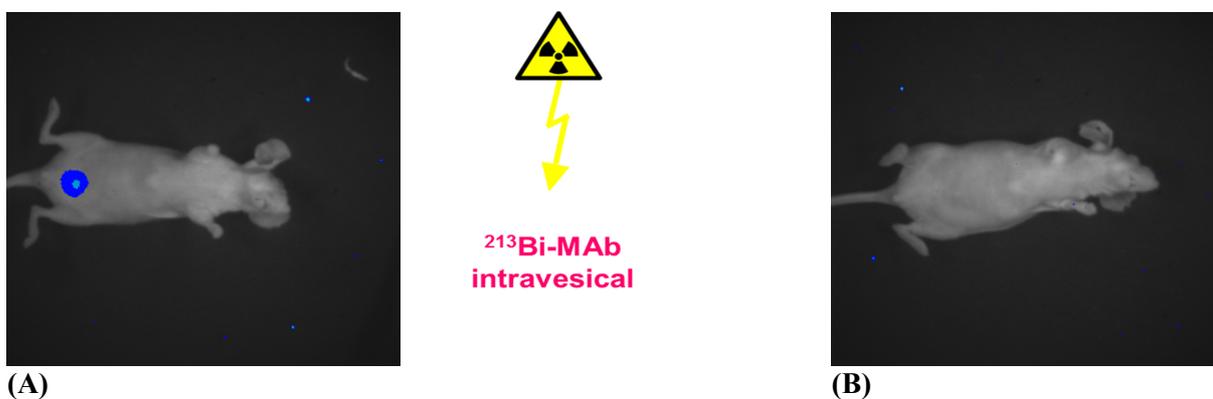


Abbildung 12: Darstellung der therapeutischen Effizienz nach Therapie mittels Biolumineszenz

(A) Biolumineszenzsignal 33 Tage nach ZI; (B) 4 Tage nach letzter Therapie mit 0,46 MBq ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk, dreimalig im Abstand von 4 Tagen (Maus Nr. 30, siehe Anhang)

4.3.3 Therapeutische Effizienz der Radioimmuntherapie beim Harnblasenkarzinom

Veränderung der Lichtemission nach Therapie

Um die Lichtemissionen der transfizierten Zellen zu quantifizieren, und so eine Verkleinerung oder Vergrößerung des Tumors nach Therapie über die Intensität der Lichtemissionen verglichen mit dem Wert vor der Therapie darzulegen, wurden jeweils Regions Of Interest (ROI) über die Signale der Tumorzellen gelegt und von diesen die Signale des Hintergrunds subtrahiert. Mit der Therapie wurde begonnen, wenn zumindest ein geringgradiges Signal im Biolumineszenz Imaging zu sehen war. Das Vorhandensein eines Tumors bei Vorliegen eines Biolumineszenzsignals und seine Größe vor Therapie wurden im Vorfeld bei einer Gruppe von 6 Tieren histologisch bestätigt.

Therapiegruppe 1, welche zwischen dem 14. und dem 36. Tag nach Zellinstillation 3x im Abstand von 4 Tagen mit 0,46 MBq ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk therapiert worden war bestand aus 9

Tieren. Vier Tage nach Therapie zeigten 5 der 9 Tiere ein kleineres Biolumineszenz Signal als vor Therapie. Die Tumorgröße vor Therapiebeginn war bei allen Therapiegruppen als zumindest geringgradig bewiesen.

Abbildung 13 stellt die Lichtemissionen der intravesikalen Tumoren der Therapiegruppe 1 über den Regions Of Interest vor und nach der fraktionierten Radioimmuntherapie pro Tier dar. Bei 5 der 9 Tiere war das Lichtsignal nach der Therapie schwächer als vor Therapiebeginn (schwarze Markierungen). Bei 4 Tieren war der Tumor nicht mehr zu detektieren. Diese Tiere hatten auf die lokoregionale Alpha-Radioimmuntherapie angesprochen.

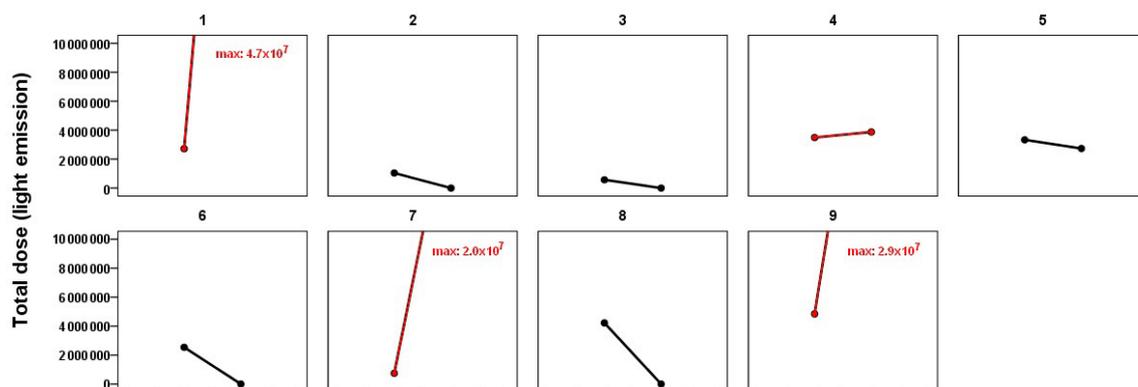


Abbildung 13: Graphische Darstellung der quantifizierten Lichtsignale der Tumorzellen vor und nach Therapie mit 3x0,46 MBq ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk im Abstand von 4 Tagen (Therapiegruppe 1)

Die Lichtemissionen der Harnblasenkarzinome stiegen bei Tieren der Kontrollgruppe nach Zellinstillation zum Vergleich deutlich an. Abbildung 14 zeigt die Erstsingale jeder Kontrollmaus nach Zellinstillation verglichen mit denen, welche 21 Tage nach Erstaufnahme ausgesendet wurden.

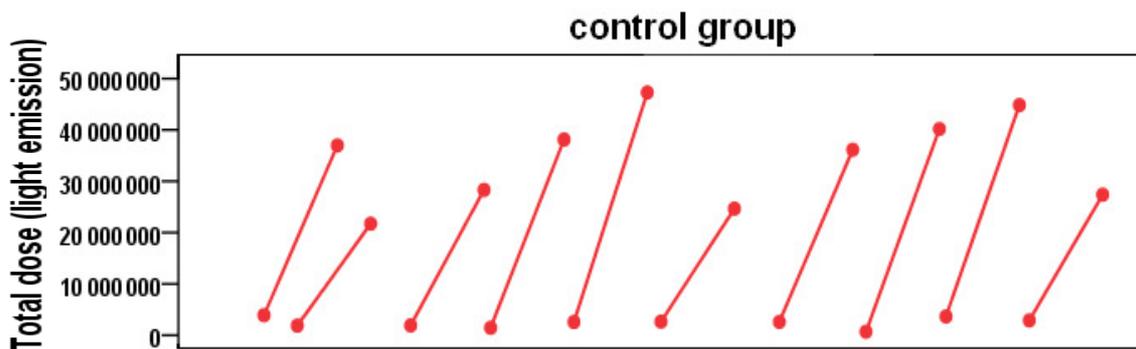


Abbildung 14: Änderung der Lichtemissionen bei den Tieren der Kontrollgruppe nach Zellinstillation während einer Zeitspanne von 3 Wochen

Therapiegruppe 2, welche zwischen dem 23. und dem 44. Tag nach Zellinstillation 2-malig im Abstand von 7 Tagen mit $0,93 \text{ MBq } ^{213}\text{Bi}$ -anti-EGFR-MAK therapiert worden war, bestand aus 15 Tieren. Bei 8 Tieren konnte 4 Tage nach Therapie eine Verkleinerung des Biolumineszenzsignals festgestellt werden, davon war bei 6 Tieren der Tumor nicht mehr zu detektieren.

Um die Ergebnisse zu verifizieren wurde Therapiegruppe 1a bestehend aus 11 tumortragenden Tieren dreimalig mit $0,46 \text{ MBq } ^{213}\text{Bi}$ -anti-EGFR-MAK im Abstand von 4 Tagen behandelt. Danach zeigten 8 der 11 Tiere ein kleineres Biolumineszenzsignal als vor der Therapie, davon war bei 7 Tieren der Tumor nicht mehr zu detektieren. Die erste Therapie erfolgte 24 Tage nach Zellinstillation.

Ebenso wurde die 2-malige Therapie mit $0,93 \text{ MBq } ^{213}\text{Bi}$ -anti-EGFR-MAK im Abstand von 7 Tagen wiederholt (Therapiegruppe 2a). Der Therapiebeginn war 24 Tage nach Zellinstillation. Bei 7 der 9 Tiere in dieser Gruppe konnte vier Tage nach Therapie eine Verkleinerung des Biolumineszenzsignals festgestellt werden. Davon war bei 6 Tieren der Tumor nicht mehr zu detektieren.

Die Veränderungen der Lichtemissionen vor und nach der Therapie, ausgehend von der transfizierten Harnblasenkarzinomzelllinie EJ 28-luc sind in Balkendiagrammen bei ausgewählten Tieren dargestellt. Abbildung 15 und Abbildung 16 zeigen die Verringerung des Lichtsignals nach dreimaliger (Therapiegruppe 1a) bzw. nach zweimaliger Therapie (Therapiegruppen 2 und 2a). Abbildung 17 zeigt das unterschiedliche Ansprechen der Tiere auf die Therapien: Maus 35 zeigt eine Verkleinerung des Signals nach Therapie, während sich das Lichtsignal in seiner Größe bei Maus 40 kaum veränderte. Bei Maus 39 war eine Vergrößerung des Signals zu erkennen (alle Tiere Therapiegruppe 1a).

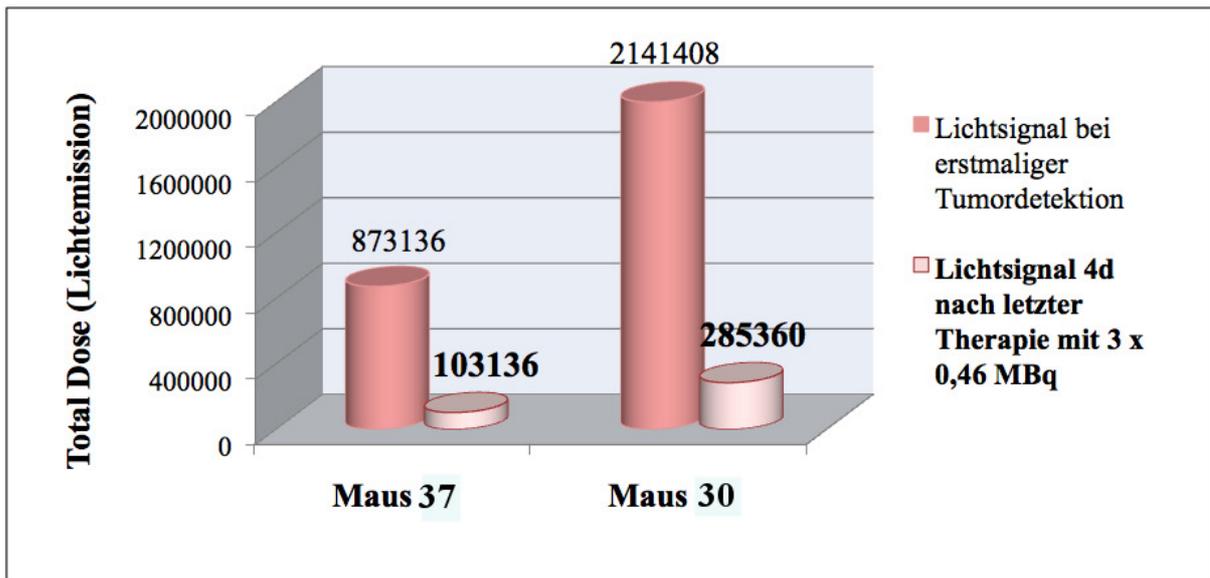


Abbildung 15: Graphische Darstellung der quantifizierten Lichtsignale der Tumorzellen bei zwei Tieren vor und nach Therapie mit $3 \times 0,46 \text{ MBq } ^{213}\text{Bi}$ -anti-EGFR-MAK im Abstand von 4 Tagen

(Maus 37, 30; siehe Anhang)

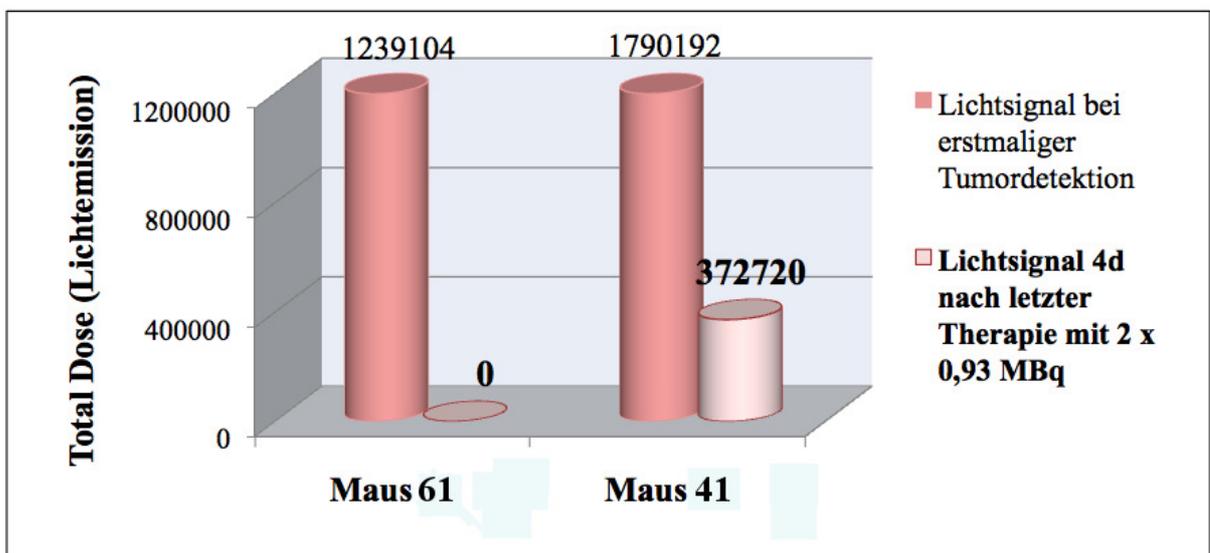


Abbildung 16: Graphische Darstellung der quantifizierten Lichtsignale der Tumorzellen bei zwei Tieren vor und nach Therapie mit zweimal $0,93 \text{ MBq } ^{213}\text{Bi}$ -anti-EGFR-MAK im Abstand von 7 Tagen

(Maus 61, 41; siehe Anhang)

□

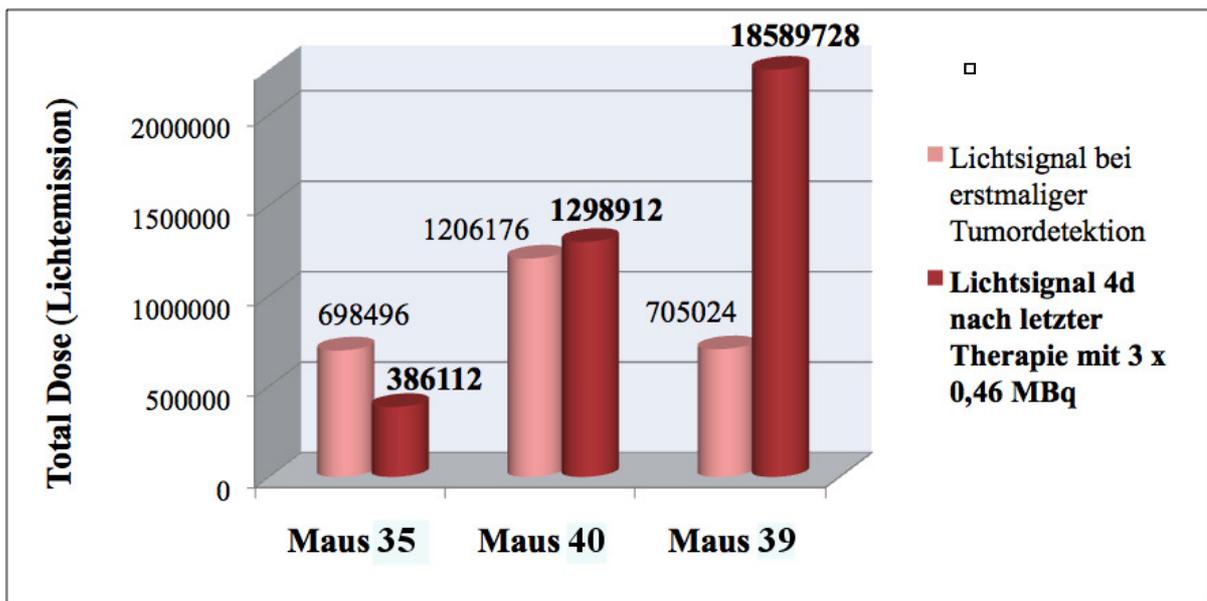


Abbildung 17: Graphische Darstellung der quantifizierten Lichtsignale der Tumorzellen bei drei Tieren vor und nach Therapie mit $3 \times 0,46 \text{ MBq } ^{213}\text{Bi}$ -anti-EGFR-MAK im Abstand von 4 Tagen mit unterschiedlichem Ansprechen auf die Radioimmuntherapie

(Maus 35, 40, 39; siehe Anhang)

Die Ergebnisse machen deutlich, dass die fraktionierte, lokoregionale α -Radioimmuntherapie mit ^{213}Bi -anti-EGFR-MAK das Potential hat, bereits etablierte Harnblasenkarzinome zu eliminieren bzw. sie in ihrer Größe zu verringern. Zwischen den beiden Therapieschemata konnte kein Unterschied in der Verringerung der Tumorgöße festgestellt werden.

Überleben der Tiere

Die Tiere wurden über einen Zeitraum von 300 Tagen nach Zellinstillation beobachtet. Die Entscheidung zur Euthanasie wurde getroffen wenn Symptome wie Tumorkachexie, reduziertes Allgemeinbefinden und/oder Aszites vorlagen. Nach der Euthanasie wurden die Mäuse umgehend obduziert. Die Überlebensdaten der Tiere wurden in Kaplan-Meier-Diagrammen dokumentiert und die statistischen Signifikanzen mit dem log-rank-test ermittelt.

4.3.3.1 Überleben nach EJ28 Zellinstillation (Kontrollgruppen)

Die mittlere Überlebenszeit der nicht therapierten Kontrollgruppe betrug nach intravesikaler Zellinstillation mit 2×10^6 Zellen der Harnblasenkarzinomzelllinie EJ28-luc 65 Tage (Range 28–116 Tage).

Die Mäuse, welche mit dem unmarkierten anti-EGFR-MAk behandelt wurden, erreichten ein mittleres Überleben von 57,5 Tagen (Range 35-99 Tage) nach intravesikaler Zellinstillation.

Bei der Sektion zeigte sich deutliches intravesikales Tumorwachstum, wie Abbildung 18 zeigt:



Abbildung 18: Darstellung eines intravesikalen Tumors bei Euthanasie eines nicht therapierten Tieres (79 Tage nach Zellinstillation)

(Maus Nr. 9, siehe Anhang)

4.3.3.2 Überleben der Tiere nach lokoregionaler Therapie

Die mittleren Überlebenszeiten der Therapiegruppen, welche mit 0,46 MBq bzw. mit 0,93 MBq des Radioimmunkonjugats behandelt worden waren verglichen mit den mittleren Überlebenszeiten der Kontroll- und der mit dem unmarkierten Antikörper therapierten Gruppen sind in Tabelle 9 aufgeführt:

Tabelle 9: Mittlere Überlebenszeiten der tumortragenden Mäuse, der Mäuse der Kontrollgruppe und der Kaltantikörpergruppe nach Therapie

Gruppe (Zeit nach Zelinokulation)	Mittel der Überlebenszeiten in Tagen nach intravesikaler Instillation von ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk		
	3x0.46 MBq/4d	2x0.925 MBq/7d	
Therapiegruppe 1 (14-36d)	124d	n/a	
Therapiegruppe 2 (23-44d)	n/a	127d	
Therapiegruppe 1a (24d)	138d	n/a	
Therapiegruppe 2a (24d)	n/a	165d	
Kaltantikörpergruppe	57,5d		
Kontrollgruppe	65d		

Die Überlebenszeiten der therapierten Tiere und der Kontrolltiere sind in einem Kaplan-Meier Diagramm zusammengefasst.

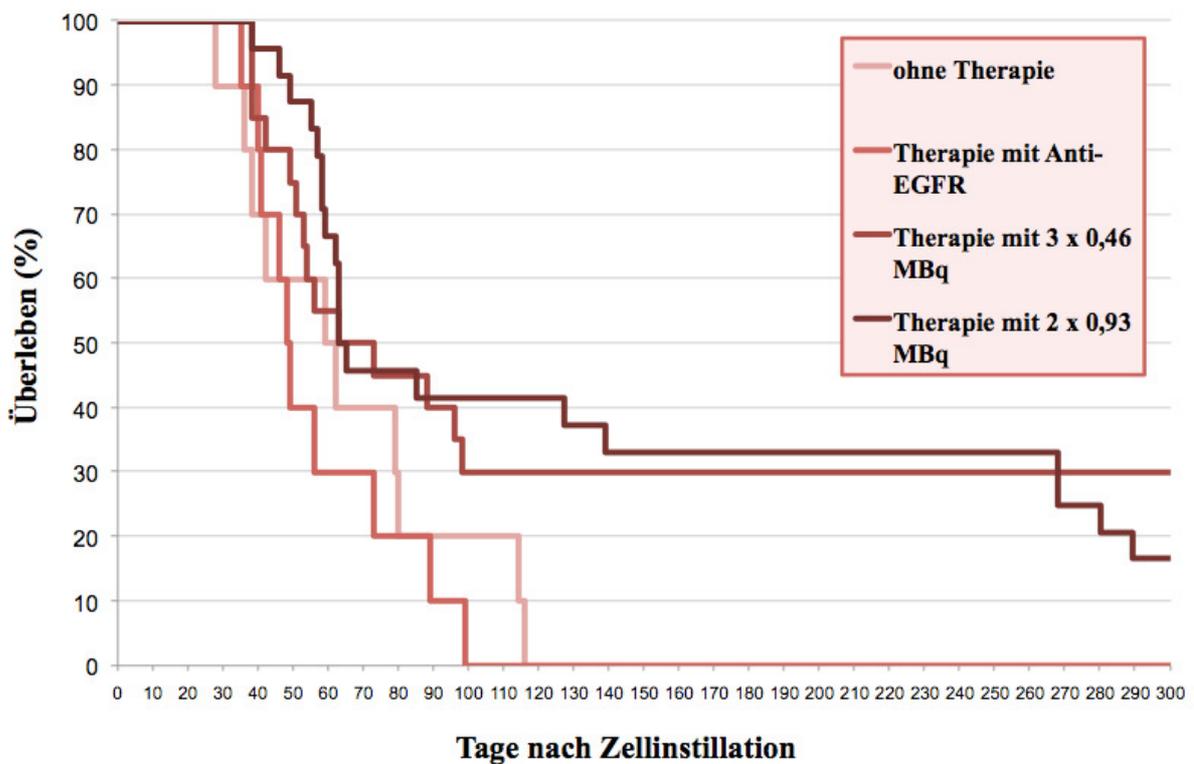


Abbildung 19: Vergleich der mittleren Überlebenszeiten der Therapiegruppen mit der Kontrollgruppe und den mit dem unmarkierten Ak behandelten Tieren

Der log-rank Test ergab einen signifikanten Unterschied im 95% Konfidenzintervall in der Überlebenszeit zwischen den Therapiegruppen und den mit dem unmarkierten Antikörper behandelten Tieren bzw. den Kontrolltieren ($p < 0,05$). Zwischen den Tieren, welche mit $3 \times 0,46 \text{ MBq}$ anti-EGFR-MAK und $2 \times 0,925 \text{ MBq}$ anti-EGFR-MAK behandelt worden waren, konnte kein signifikanter Unterschied in der Überlebenszeit festgestellt werden (Fisher's Exact Test).

4.4 Histologie

4.4.1 Histologie des gekauterten, murinen Blasenurothels

Vor der intravesikalen Zellinstillation mit 2×10^6 EJ28-luc Harnblasenkarzinomzellen wurden mehrere kleine Läsionen mittels Kautereinheit im monophasischen Koagulationsmodus in die Urothelia der Mäuse gesetzt, um die Situation nach TUR beim Patienten zu imitieren. Histologisch stellten sich diese Läsionen im Urothel mit deutlicher Erythrozyteninfiltration in das Gewebe dar (Abbildung 20).

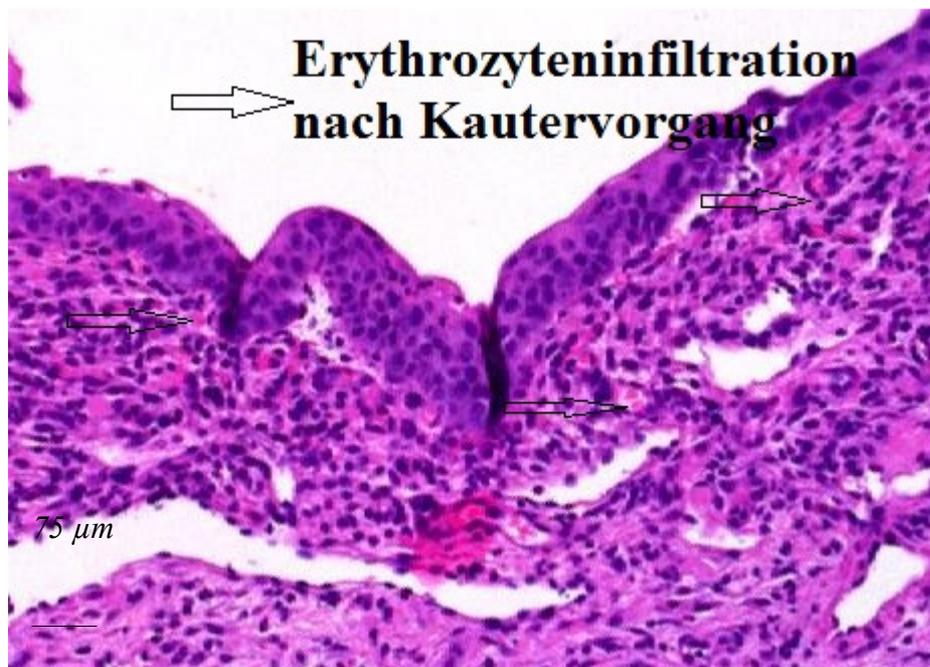


Abbildung 20: Histologische Darstellung des Urothels mit Erythrozyteninfiltration in das umliegende Gewebe nach Kautervorgang

4.4.2 Histologische Bestätigung der Ausbreitung des Tumors nach Biolumineszenz Imaging

Signale im Biolumineszenz Imaging konnten mit dem histologischen Ergebnis korreliert werden, welches die Größe des Signals bestätigte. So konnte gezeigt werden, dass bei einer Blase, bei der histologisch nur wenige Tumorzellen gefunden werden konnten, auch das Biolumineszenzsignal entsprechend klein war. Ebenso wies eine Blase mit hochgradigen tumorösen Veränderungen ein großes Biolumineszenzsignal auf. Die Befunde wurden zur Verfügung gestellt von PD Dr. Gregor Weirich, Institut für Pathologie, Klinikum rechts der Isar, München.

Abbildung 21, Abbildung 22 und Abbildung 23 zeigen Blasen mit geringgradigen, mittelgradigen bzw. hochgradigen Signalen im Biolumineszenz Imaging. Abbildung 21 zeigt ein geringgradiges, nicht-muskelinvasives Harnblasenkarzinom. Das Chromatin der oberflächlichen Zellen des Urothels ist verdickt, es bestehen einige Tumorzellverbände und geringe Zell- und Kernatypien sind sichtbar. Das dazu korrespondierende Bild im Biolumineszenz Imaging ist ebenfalls dargestellt. Es sind darauf erst sehr schwache Lichtemissionen zu erkennen.

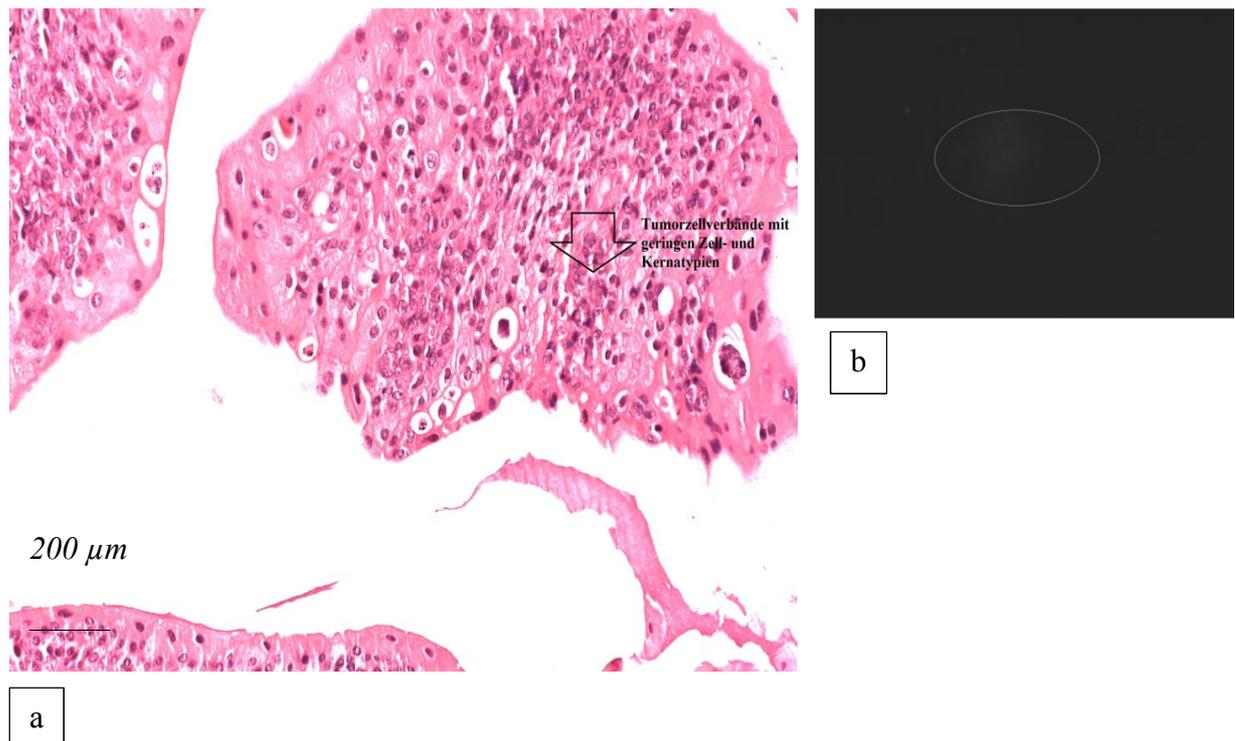


Abbildung 21: (a) Histologische Darstellung eines geringgradigen, nicht-muskelinvasiven Blasenkarzinoms; (b) Korrespondierendes Signal im Biolumineszenz Imaging

(Total Dose of Light Emmissions $\sim 2 \times 10^6$)

(Maus Nr. 65, siehe Anhang)

Abbildung 22 zeigt ein mittelgradiges, nicht-muskelinvasives Blasenkarzinom. Hier ist ein eindeutiger Tumor sichtbar. Große Tumorzellverbände von hochgradig proliferierenden Tumorzellen sind erkennbar. Das dazu korrespondierende Bild im Biolumineszenz Imaging ist ebenfalls dargestellt. Das Signal ist erkennbar stärker als das Signal, das bei Vorhandensein eines geringgradigen Blasenkarzinoms erkennbar war (Abbildung 21).

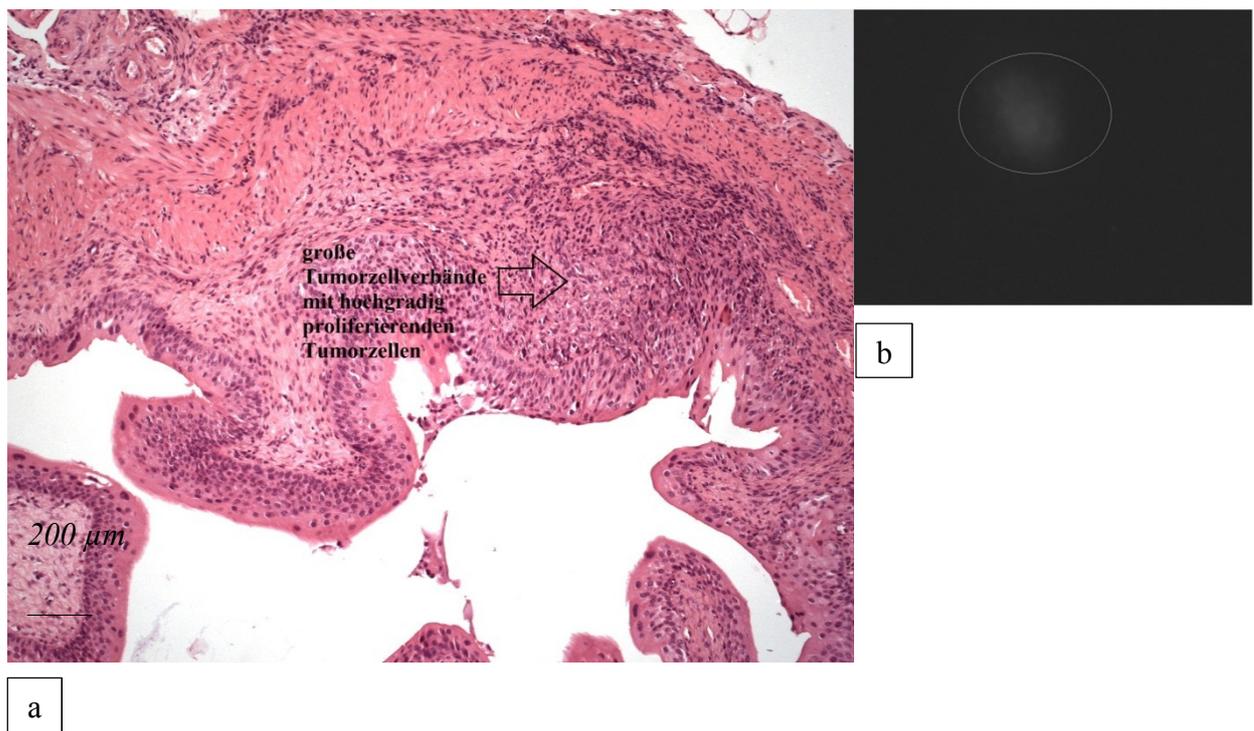


Abbildung 22: (a) Histologische Darstellung eines mittelgradigen, nicht-muskelinvasiven Blasenkarzinoms; (b) Korrespondierendes Signal im Biolumineszenz Imaging

(Total Dose of light emissions $\sim 2 \times 10^7$)

(Maus Nr. 66, siehe Anhang)

Abbildung 23 zeigt große Tumorzellverbände mit unzähligen Zell-, Kern- und Mitoseatypien. Die Tumorzellen reichen bis zur Submukosa, nicht aber bis in die Muskularis, es handelt sich also um ein nicht-muskelinvasives Carcinoma in situ. Auch ein Ulcus mit Leukozyteninfiltration ist in der Submukosa zu erkennen. Das dazu korrespondierende Bild im Biolumineszenz Imaging ist ebenfalls dargestellt. Darauf ist erstmalig ein starkes Signal zu erkennen.

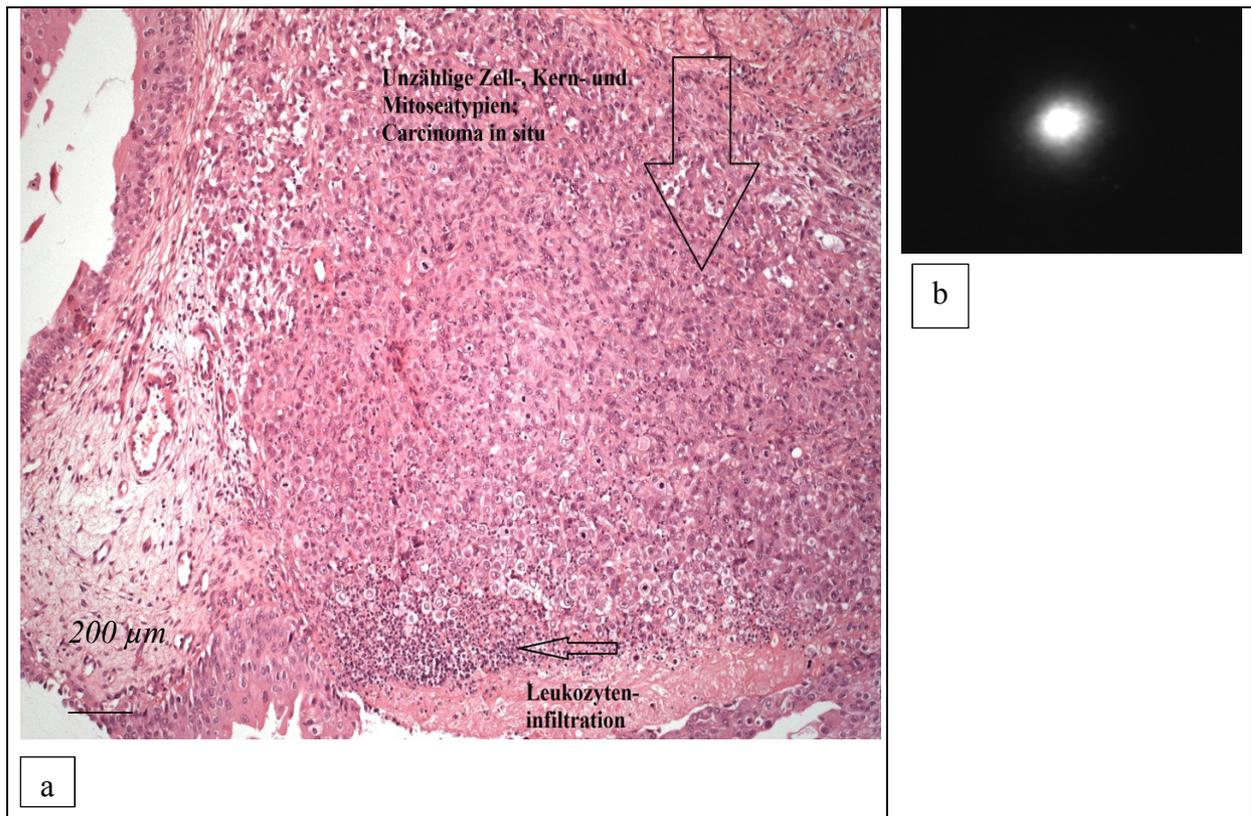


Abbildung 23: (a) Histologische Darstellung eines hochgradigen, nicht-muskelinvasiven Blasenkarzinoms; (b) Korrespondierendes Signal im Biolumineszenz Imaging

(Total Dose of Light Emissions $\sim 4 \times 10^7$)

(Maus Nr. 68, siehe Anhang)

4.4.3 Messung der Verteilung von ^{213}Bi -anti-EGFR-MAK im Blasengewebe mittels Autoradiographie

Mit Hilfe dieses Verfahrens lassen sich Radionuklide in den Gewebeschnitten lokalisieren. Der μ -IMAGER analysierte und erfasste als hochauflösendes digitales Messgerät Radionuklid-markierte Moleküle in histologischen Gewebeschnitten. Die vesikale Lokalisation des ^{213}Bi wurde mittels Autoradiographie mit dem digitalen Micro-Imager bestimmt.

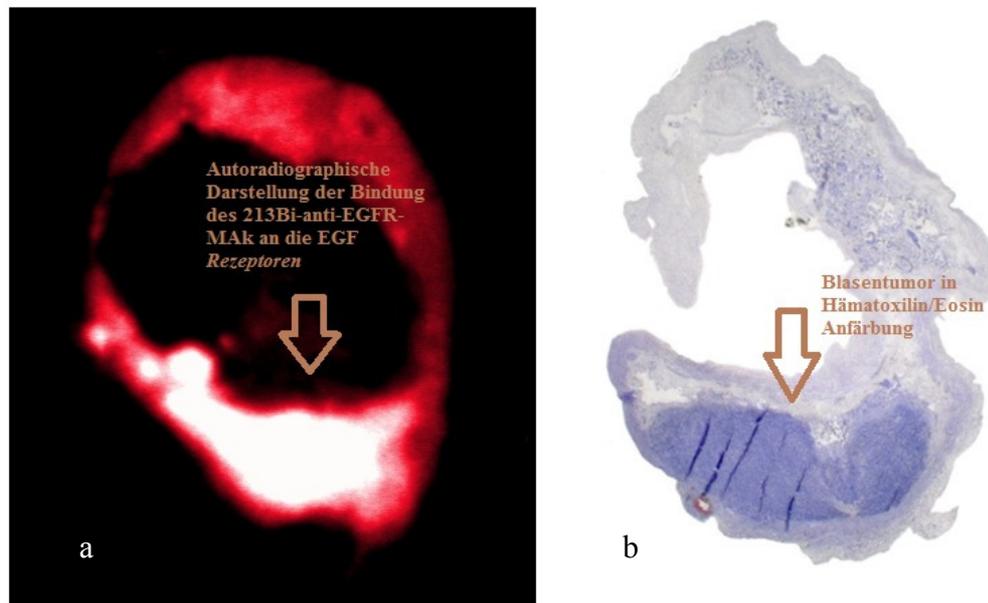


Abbildung 24: (a) Autoradiographie eines tumorpositiven Paraffinschnittes der Harnblase; (b) Histologie des korrelierenden Blasentumors

Abbildung 24 zeigt die Histologie eines Blasentumors (b) und dessen autoradiographische Darstellung (a) im Vergleich. Die Anreicherung des ^{213}Bi -anti-EGFR-MAK an die EGF-Rezeptoren stellt sich in der autoradiographischen Darstellung nur im Bereich des Tumors deutlich dar. Dieser Bereich entsprach der Stelle, an der auch histopathologisch ein Tumor diagnostiziert werden konnte.

4.4.4 EGFR-Expression des etablierten Blasentumors

Mittels Immunhistochemie (IHC) ließ sich die EGFR-Überexpression der Blasentumore nachweisen. Das Verfahren wurde durchgeführt vom Institut für Pathologie des Klinikums Rechts der Isar, Herrn PD Dr. Gregor Weirich. Von den tumortragenden murinen Blasen wurden $4\mu\text{m}$ dicke Kryoschnitte angefertigt. Die Einfärbung erfolgte nach dem unter 3.8.4 beschriebenen IHC-Protokoll. Die Horse Radish Peroxidase (HRP) reagierte mit Diaminobenzidin (DAB) und stellte den EGF-Rezeptor an der Oberfläche der Tumorzellen als braun

gefärbtes Präzipitat dar. Die unveränderten Anteile des Urothels und die Schichten der Blasenwand stellten sich aufgrund der Gegenfärbung mit Hämatoxin und sofortigem Bläuen in Leitungswasser bläulich dar und konnten dadurch von den Tumorzellen gut abgegrenzt werden. Abbildung 25 zeigt das Urothel einer Mäuseblase. EJ28-luc Harnblasenkarzinomzellen sind zwischen den physiologischen Urothelzellen zu erkennen. Erkennbar sind die Tumorzellen am braun gefärbten Präzipitat, welches sie umgibt. Das humane Urothelkarzinom stellte sich so histologisch als Xenotransplantat in der Mäuseblase dar.

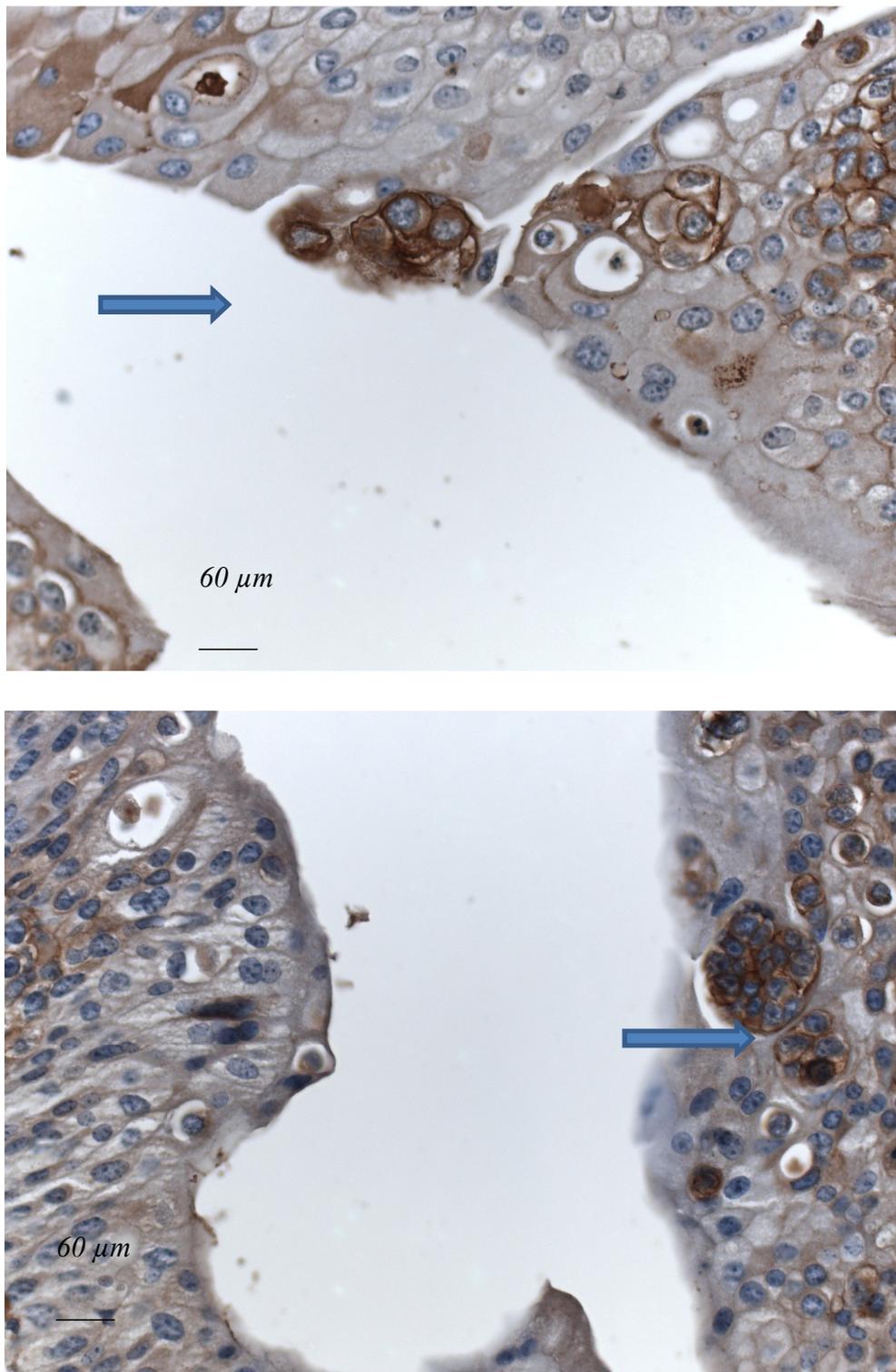


Abbildung 25: Immunhistochemische Anfärbung des EGF-Rezeptors.

Die bräunliche Färbung zeigt die Bindung des monoklonalen anti-EGFR-MAk an die EGF-Rezeptoren der Tumorzellen an (Pfeil). Das an den Antikörper gebundene ^{213}Bi bindet somit nur an die Tumorzellen.

4.4.5 Toxizität

Zum Ausschluss etwaiger toxischer Strahlenschäden am Urothel wurden 5 tumorfreie swiss nu/nu Mäuse 3x im Abstand von 4 Tagen mit 0,46 MBq ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk behandelt. 300 Tage nach Instillation der Aktivität konnte bei dieser Gruppe histologisch keine Schädigung des Urothels nachgewiesen werden. Abbildung 26 zeigt das Urothel eines dieser Versuchstiere mit regelmäßig geschichtetem, mehrreihigem Urothel, ohne Zellatypien.

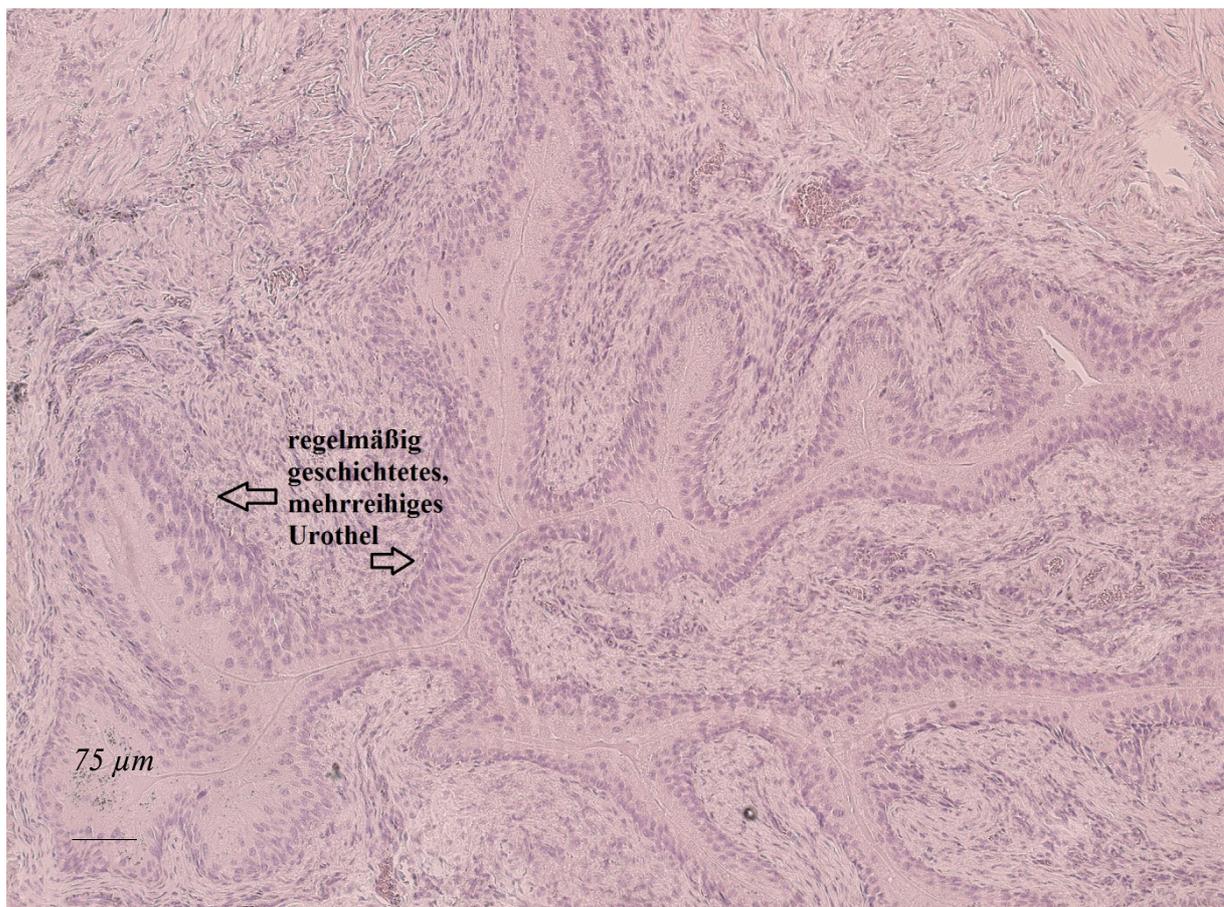


Abbildung 26: Urothel einer tumorfreien Maus 300 Tage nach 3-maliger intravesikaler Therapie mit 0,46 MBq ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk im Abstand von 4 Tagen

(Maus Nr. 71, siehe Anhang)

Ebenso wurden jeweils 5 primär tumorfreie Tiere mit 2x 1,85 bzw. 2x 3,7 MBq ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk im Abstand von 7 Tagen behandelt. Diese Tiere erhielten also eine bis zu 5-mal höhere Aktivität als die Therapietiere. Die Euthanasie dieser Tiere erfolgte 146 Tage nach der zweiten Behandlung mit 2x 1,85 bzw. 2x 3,7 MBq ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk. Bei diesen Tieren konnten ebenso histologisch keine Läsionen am Urothel gesehen werden.

5. DIE PLEURAKARZINOSE

Die Entwicklung eines Mausmodells der Pleurakarzinose sollte die Möglichkeit bieten, eine weitere Therapieoption für die lokoregionale α -Radioimmuntherapie zu evaluieren. Die Schritte die zusätzlich in dieser Arbeit für die Entwicklung dieses Modells eingeleitet wurden sollen im Folgenden beschrieben werden.

5.1 Einleitung

5.1.1 Pathologie der Pleurakarzinose

Eine Pleurakarzinose ist der Befall des Brustfells mit Metastasen eines bösartigen Tumors. Die Lunge steht bezüglich des Befalls mit Metastasen bei allen Tumortypen vor dem Skelett und nach der Leber an 2. Stelle (Willis, 1973). Bei metastasierenden Tumorleiden ohne bekannten Primärtumor (CUP) ist die Lunge bei 40% der Fälle mitbetroffen (Lamm et al., 1995). Als führende Metastasenmanifestation findet sie sich mit parenchymatösen Metastasen oder als Pleurakarzinose bei 10–30% der Patienten (Osteen et al., 1978; Stewart et al., 1979). Ebenso kann sich eine Pleurakarzinose aufgrund eines bekannten Primärtumors in der Lunge bei fortgeschrittenen Stadien entwickeln.

Ungefähr 22% aller Pleuraerkrankungen sind maligner Genese, die sich in Form von malignen Pleuraergüssen manifestieren (Davis et al., 2008). Es sind allein in Deutschland jährlich etwa 53.000 Neuerkrankungen zu erwarten (Loddenkemper, 2008). Das Bronchialkarzinom und das Mammakarzinom sind mit 50–65% aller auftretenden malignen Pleuraergüsse die häufigste Ursache für die Entstehung dieser Erkrankung (Bennet et al., 2005; Barbetakis et al., 2004). In selteneren Fällen können maligne Pleuraergüsse auch bei gastrointestinalen Erkrankungen, dem Ovarialkarzinom und dem Blasenkarzinom nachgewiesen werden (Heffner et al., 2008).

Die Pleuraflüssigkeit ist ein Ultrafiltrat des Plasmas und gelangt über die parietale und viszerale Pleura sowie das Zwerchfell in die Pleurahöhle (Antony, 2003). Bei einem gesunden Menschen findet sich im Pleuraspalt zwischen der Pleura parietalis und viszeralis normalerweise eine konstante Flüssigkeitsmenge (zwischen 0,5 und 1 ml), ein gleitender Flüssigkeitsfilm, der kontinuierlich gebildet und wieder resorbiert wird. Der Proteingehalt der Flüssigkeit beträgt weniger als 1,5 g/dl und die Pleuraflüssigkeit enthält 1500–4500 Zellen pro ml (Mak-

rophagen, Mesothelzellen, Lymphozyten und Granulozyten) (Lai-Fook, 2004; Antony, 2003; Agostini, 1972). Die Definition eines Pleuraergusses wird verwendet, wenn die Bildung der Pleuraflüssigkeit erhöht und/oder ihre Absorption vermindert ist und die Flüssigkeitsmenge in der Pleurahöhle das Volumen von 20 ml übersteigt. Bei den proteinärmeren gutartigen (<30 g/dl) Transsudaten kann die Erhöhung des hydrostatischen Drucks im Kapillargebiet (Herzinsuffizienz) oder die Verminderung des kolloidosmotischen Drucks (Leberzirrhose, nephrotisches Syndrom) einen Pleuraerguss bedingen. Bei den proteinhaltigen Exsudaten ist dagegen die Pleura bedingt durch Entzündungen oder Neoplasien pathologisch verändert, was zu einer erhöhten Kapillarpermeabilität und/oder zu einem gestörten Lymphabfluss führen kann (Antunes et al., 2003). Maligne Pleuraergüsse beim Mammakarzinom entstehen über die Lymphbahnen der Thoraxwand oder über den hämatogenen Weg durch Metastasen. Beim Adenokarzinom der Lunge wandern die Tumorzellen entweder direkt über die Thoraxwand oder indirekt über den hämatogenen Weg d.h. zum Beispiel über pulmonale Kapillaren in die Pleura ein (Antunes et al., 2003; Lynch, 1993).

5.1.2 Therapie der Pleurakarzinose

Das langfristige Ziel einer Therapie der Pleurakarzinose ist die Verlängerung der Überlebenszeit der Patienten und die Verbesserung der Lebensqualität. Die häufigsten Therapiemethoden stellen lokale invasive Eingriffe dar, wie z.B. die Drainage des malignen Pleuraergusses und die intrapleurale Instillation von sklerosierenden Substanzen, um ein Wiederauftreten längerfristig zu verhindern (Chen et al., 2008; Lee et al., 2004). Eine Erweiterung des Therapiespektrums wird auch in der palliativen Therapie angestrebt, um die Sicherung oder Wiederherstellung einer möglichst umfassenden Lebensqualität des Patienten zu gewährleisten. Eine Voraussetzung dafür ist die Überprüfung neuer Therapiekonzepte, um effizientere Therapiestrategien zu entwickeln.

Primäre Behandlungsziele der Pleurakarzinose sind die Linderung der Symptome wie z.B. thorakale, atemabhängige Schmerzen und Dyspnoe, sowie die Verhinderung des Wiederauftretens des Ergusses. Es wird eine wirksame symptomatische Behandlung mit geringer therapiebedingter Morbidität und Letalität angestrebt. An erster Stelle steht die Entlastungspunktion, bei der der Erguss möglichst vollständig drainiert wird. Therapie der Wahl bei rezidivierenden Ergüssen ist die chemische Pleurodese (Neragi et al., 2008; Tan et al., 2006; Rodriguez-Panadero et al., 2006; Antony, 1999), bei der durch eine sklerosierende Substanz die Pleurablätter verklebt werden. Im Vergleich mit Tetrazyklinen und Zytostatika (z.B. Bleomy-

cin, Mitoxantron, 5-Fluorouracil), die mit dem Ziel eine Sklerosierung der Pleura zu erreichen auch verwendet werden, hat sich Talkum am Effizientesten erwiesen (Manegold, 1997).

Die Instillation von Talkum führt durch die Mesothelzellen der Pleura zu einer Ausschüttung von verschiedenen Wachstumsfaktoren wie z.B. dem basic fibroblast growth factor (bFGF), und dem platelet derived growth factor (PDGF). Die inflammatorische Antwort der Pleura und die dadurch bedingte Fibroblastenproliferation führen zu einer Fibrose (Antony et al., 2004). Die Pleurodese kann mittels einer Thoraxdrainage oder thorakoskopisch durchgeführt werden. Voraussetzung für eine erfolgreiche Pleurodese ist die vollständige Entleerung des Ergusses (Heffner et al., 2008). Die Erfolgsrate der Pleurodese mit Talkum (Verhinderung der Reakkumulation maligner Ergüsse innerhalb von 30 Tagen) unterschiedlicher Studien lag bei 50–93% (Yildirim et al., 2008; Steger et al., 2007; Walker-Renard et al., 1994).

Weitere Therapiemöglichkeiten sind die intrapleurale Instillation von Interleukin-2 (IL-2), Interferon- α und β (Serman et al., 2007; Lissoni et al., 2001; Astoul et al., 1993), die Immuntherapie mit OK-432 (Yoshida et al., 2007), sowie Vakzinierungsstrategien zur Aktivierung des lokalen Immunsystems (Chang et al., 2005). Therapien, die das lokale Immunsystem mit Hilfe von z.B. IL-2 oder OK-432 aktivieren, dienen im Vergleich zur Talkum-Pleurodese nicht nur der Symptombekämpfung, sondern führen auch zu einem längeren Gesamtüberleben (Yoshida et al., 2007; Astoul et al., 1993). Einen stark invasiven Eingriff stellt die Pleurektomie dar, bei der die Pleura vollständig entfernt wird, wenn durch die Verklebung der Pleura die Lungenfunktion irreparabel geschädigt ist (Neragi, 2008; Sahn, 2001). Bei der Pleurektomie wird jedoch eine hohe perioperative Mortalität (10%) und hohe Morbidität (23%) beobachtet (Rodriguez-Panadero et al., 1997).

All diese Therapien erscheinen unzureichend um die Pleurakarzinose erfolgreich zu behandeln. Deshalb stellt die lokoregionale α -Radioimmuntherapie für diese Erkrankung eine vielversprechende Therapiestrategie dar.

5.2 Material und Methoden

5.2.1 Zelllinien und Zellkultur

5.2.1.1 LLC und A549

Für die Etablierung des Tumormodells der Pleurakarzinose wurden die humane Lungenkarzinomzelllinie A549 und die murine Lewis-Lung-Carcinoma (LLC) Zelllinie verwendet. Beide Zelllinien zeigen adhärentes Wachstum als Monolayer, die Zelllinie A549 zeigt zudem während des Wachstums eine leichte Aggregation zu Zellclustern. A549 überexprimiert den EGF Rezeptor deutlich, wie die durchgeführten Bindungsstudien zeigen (5.3.3).

5.2.1.2 Kultivierung der Zellen

Für die A549 und LLC Lungenkarzinomzellen wurde Dulbecco's MEM Medium (Biochrom AG, Berlin) mit 10% FKS, 100 IU/ml Penicillin und 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin (Biochrom AG, Berlin) verwendet.

5.2.2 Verwendete Antikörper

Der monoklonale Antikörper EMD 72000 (Matuzumab, siehe 3.3.1) sowie die beiden im Folgenden beschriebenen Antikörper wurden zur Ermittlung der höchsten Bindung an die humane Lungenkarzinomzelllinie A549 und die murine Zelllinie LLC eingesetzt.

5.2.2.1 Anti-EpCam Antikörper cK 931

Dieser Antikörper wurde auf seine Bindungsfähigkeit mit den Lungenadenokarzinomzelllinien A549 und LLC geprüft, und somit seine Eignung für eine nachfolgende experimentelle Therapiestudie getestet.

Das EpCAM-Antigen wird vorwiegend von soliden Magen-, Darm-, Prostata-, Brust- und Lungentumoren exprimiert und von dem monoklonalen Antikörper cK 931 erkannt. Auch bei fortgeschrittenen Urothelkarzinomen wurde eine Überexpression von EpCAM nachgewiesen (Brunner et al., 2008). Der EpCAM-Rezeptor ist ein 40 kDa schweres, transmembranes Glycoprotein und treibt die Ca^{2+} -unabhängige Zelladhäsion und -proliferation voran (Hussain et al., 2007). In präklinischen Studien zeigte der Antikörper cK 931 ein sehr hohes Bindungsverhalten an EpCAM exprimierende Tumorzellen (Wilex AG, München 2003).

5.2.2.2 Anti-Hsp70-Antikörper

Der anti-Hsp70-Antikörper wurde entwickelt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Multhoff Gabriele, Experimentelle Radioonkologie, TU München. In allen Tumorzellen ist die Expression von Hsp70 stark erhöht. Eine Überexpression von Hsp70 erhöht das Tumorstadium, wie an Nagern bereits gezeigt werden konnte (Kojro, 2012). Dieses Protein wird von dem monoklonalen anti-Hsp70-Antikörper erkannt.

5.2.3 Transfektion der A549 Zellen

Zur Transfektion der A549 Lungenadenokarzinomzelllinie wurden auf einer 6-well-Platte je 2 Wells mit je 100.000, 200.000 und 300.000 A549 Zellen zur Vorbereitung für die Transfektion ausgesät. Am nächsten Tag wurden die beiden Wells, in welchen 300.000 Zellen ausgesät waren für die Transfektion verwendet, da die Konfluenz zu diesem Zeitpunkt ca 60% betrug.

Zunächst wurden 4µg pGL4.14–CMV Plasmid DNA, die das Gen für Firefly Luciferase enthält, in 400 µl jetPrime Puffer (jetPrime, Polypus/Peqlab) pipettiert und gevortext. Die DNA wurde freundlicherweise von Dr. Mario Vallon (Nuklearmedizinische Klinik, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München) zur Verfügung gestellt. Nach Zugabe von 4 µl jetPrime Transfektionsreagens wurde der Ansatz gevortext und kurz abzentrifugiert. Nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden je 200 µl aus dem Transfektionsansatz pro Well tropfenweise zu den Zellen in je 2 ml DMEM + 10% FKS zugegeben. Zur Mischung wurden die Platten hin-und hergeschwenkt und danach für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Zellen mit PBS/EDTA abgelöst, in DMEM + 10% FKS Zellkulturmedium aufgenommen und in insgesamt 8 Petrischalen aufgeteilt. Den Medien von sechs Schalen (3x1000 Zellen, 3x2000 Zellen) wurde Hygromycin in einer Konzentration von 200 µg/ml zugesetzt, 2 Schalen blieben ohne Antibiotikum zur Kontrolle. Sobald sich nach 2 bis 4 Wochen Klone gebildet hatten wurden diese gepickt und einzelne Klone in einzelne Zellkulturflaschen verbracht und kultiviert. Nach 2-maligem Passagieren wurde die Expression von Firefly Luciferase schließlich mittels Biolumineszenz Imaging getestet.

5.2.4 Bindungsstudien

A549 Lungenkarzinomzellen wurden auf Bindung mit dem Anti-EGFR-MAk, dem Anti-Epcam-MAk und dem Hsp70-MAk getestet. Die murinen Lewis Lung Carcinoma Zellen

wurden auf ihre Bindungskapazität mit dem Anti-EGFR-MAk und dem Anti-Epcam-MAk geprüft.

Für die Bindungsstudien wurden jeweils 3×10^6 Zellen in jeweils 0,5 ml Dulbecco's MEM Zellkulturmedium in 6 Zentrifugenröhrchen verbracht. Die Zellen erhielten jeweils 0,06 MBq des Radioimmunkonjugats und wurden danach bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Danach wurden jeweils 500 μl PBS zugegeben, die Zellpellets gewaschen und bei 1300 rpm für 3 min abzentrifugiert. Der erste Überstand wurde in ein separates Röhrchen übergeführt. Die Zellen wurden nochmals in jeweils 500 μl PBS gewaschen und dasselbe Procedere wiederholt, um einen zweiten Überstand zu gewinnen. Die Zellpellets und die Überstände wurden separat im Gamma-Counter Typ 1480 Wizard TM 3 (Wallac, Finnland) gemessen und die an den Zellen verbliebene Aktivität in Prozent der zugegebenen Gesamtaktivität berechnet.

5.2.5 Scatchard Analyse

Mittels Scatchard Analyse wurden die Antigendichte der Zelllinie A549 und die Affinität der ^{213}Bi -anti-EGFR-Konjugate zu den Zellen bestimmt. 1×10^6 Zellen in 100 μl PBS / 1% BSA mit unterschiedlichen Konzentrationen von ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk (50 - 800 ng/ml) wurden in 3-fach Ansätzen für 20 min bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Zellen bei 1300 rpm für 3 min abzentrifugiert und dreimal mit je 1 ml PBS gewaschen. Die Überstände wurden jeweils in ein Röhrchen pipettiert und die Aktivität der Zellpellets und der Überstände separat im Gamma-Counter gemessen. Abhängig von der Antikörperkonzentration konnte die gebundene Antikörpermenge bestimmt werden. Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurde auf der x-Achse die Masse (ng) des gebundenen Antikörpers (B) und auf der y-Achse der Quotient aus gebundenem und freiem Antikörper (B/F – Bound/Free) aufgetragen. Bei linearem Verlauf ließen sich über die resultierende Regressionsgerade ($y = m \cdot x + b$) die Anzahl der gebundenen Antikörper (B_{max}) bestimmen. B_{max} ergab sich aus dem Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der x-Achse. Aus dem Wert für B_{max} ließ sich die Anzahl der Antigenbindungsstellen mit Hilfe folgender Gleichungen berechnen:

$$m = M_m * n = \frac{M_m * Z * A}{N_A}$$

$$A = \frac{m * N_A}{M_m * Z}$$

m = Masse des maximal gebundenen AK (g)

M_m = Molekulargewicht eines AK (IgG) 150.000 g

n = Stoffmenge (mol)

Z = Zellanzahl

A = Anzahl der maximal gebundenen AK (= Anzahl der Antigene)

$N_A = 6,02 * 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ (Avogadro-Konstante)

Der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der y-Achse ergab $\frac{B_{max}}{K_d}$

5.2.6 Tierexperimente

5.2.6.1 Methodik der Zellinstillation von A549 und LLC Lungenadenokarzinomzellen

Die Induktion der Pleurakarzinose in der Maus wurde durch orthotope Xenotransplantation der Lungenkarzinomzelllinien A549 (1×10^6 bzw. 5×10^6) und LLC (5×10^5) erreicht. Dazu wurde weiblichen Balb/c nu/nu Mäusen gemäß ihrem Körpergewicht eine voll antagonistische Narkosekombination aus Medetomidin, Midazolam und Fentanyl als i.p.-Injektion verabreicht. Nach Eintritt des chirurgischen Toleranzstadiums wurde die Haut der linken lateralen Brustwand desinfiziert und auf Höhe des Xiphoids ein 5mm langer, transversaler Hautschnitt gesetzt. Faszien und Muskeln wurden zur Seite präpariert, die Zellen wurden in 100µl PBS aufgenommen und durch einen Interkostalraum direkt in den Pleuralspalt injiziert (nach Stathopoulos et al., 2005). Die Hautinzision wurde mit Hautkleber verschlossen und die Tiere wachten unter Beobachtung auf. Vor der Narkose erhielten die Tiere 300 µl eines Infusionsgemisches aus Ringer-Lactat und Glucose 5% s.c. zur Kreislaufstabilisierung. Post instillationem wurde täglich das Allgemeinbefinden der Tiere überprüft.

Insgesamt zwei Versuchsgruppen á 10 Tiere wurden zur Ermittlung der Überlebenszeiten nach Zellinstillation verwendet. Die Lungen der Tiere mit A549 Zellinstillation wurden nach der Euthanasie histologisch untersucht (siehe 5.3.7).

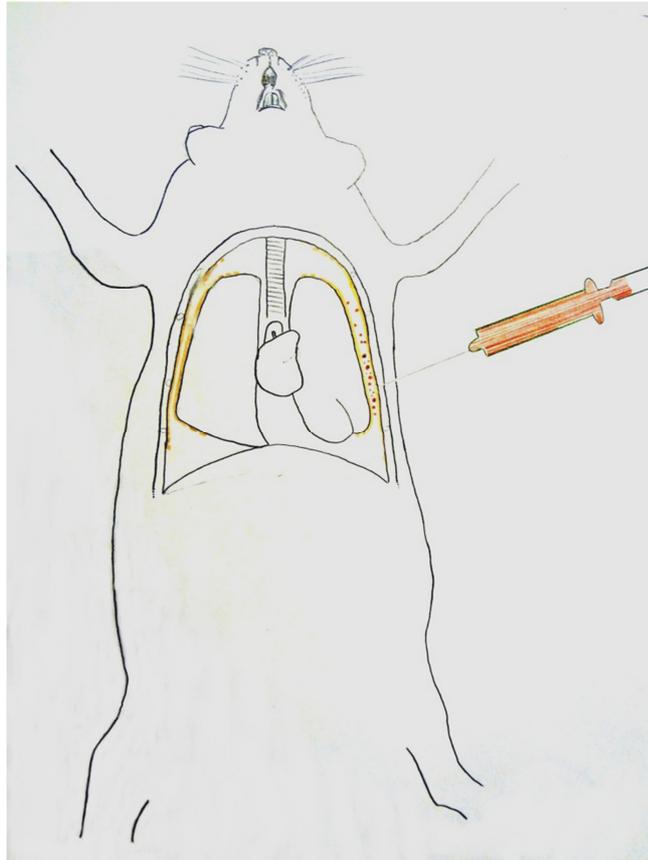


Abbildung 27: Setzen der Injektion für die Zellinstillation von A549 und LLC Lungenadenokarzinomzellen (eigene Darstellung)

5.3 Ergebnisse

5.3.1 Proliferation der Zellen in vitro

Die A549- und die LLC Lungenadenokarzinomzellen zeigten kurz nachdem sie in Kultur genommen wurden zunächst ein verzögertes Wachstum, die sogenannte lag-phase, die zwischen einigen Stunden und einigen Tagen andauern konnte. Die logarithmische Wachstumsphase der Zellen, die danach einsetzte, führte dazu, dass ein Aufteilen in neue Kulturflaschen alle 2-3 Tage notwendig wurde, da nach jeweils dieser Zeit der Zellrasen konfluierend war.

5.3.2 Transfektion der A549 Zellen

Aufgrund der deutlich besseren Bindungskapazität des anti-EGFR-MAk an die A549 Lungenadenokarzinomzelllinie (siehe 5.3.3) im Vergleich zur Bindungskapazität an die LLC Zellen wurde die erstere Zelllinie für die Transfektion ausgewählt. Drei der insgesamt sieben transfizierten Klone der A549 Lungenadenokarzinomzellen erwiesen sich als Luciferase-positiv (A549-luc) im Biolumineszenz Imaging. Pro Messung wurden 1×10^6 Zellen in 1,7 ml

Zellkulturmedium mit 10% FKS verbracht, mit 300 μl Luziferin (15 mg/ml) versetzt und nach 15 min erstmalig gemessen. Nach dieser Zeit war ein deutliches Signal wahrzunehmen (Abbildung 28). Auch nach 30 min zeigte sich noch ein deutliches Signal. Die Zellen werden in Zukunft in den weiteren experimentellen Studien zum Pleurakarzinosemodell eingesetzt, um das Tumorwachstum im Biolumineszenz Imaging verfolgen zu können.

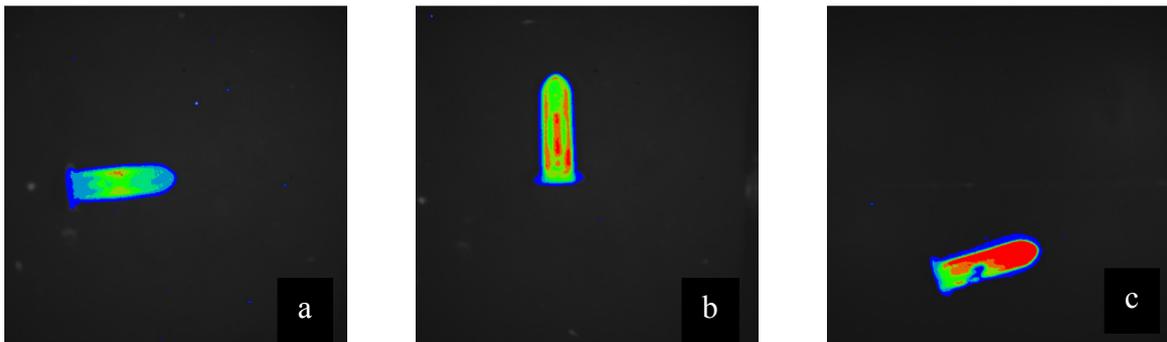


Abbildung 28: Pseudocolour Images von 1×10^6 A549-luc Zellen nach Transfektion mit dem Firefly Luciferase Gen

(a) Belichtungszeit 180s, Verstärkungsgrad 900; (b)+(c) Belichtungszeit 120s, Verstärkungsgrad 900

Die Pseudocolour Images konnten durch das Übereinanderlegen des Schwarz/Weiß- und des Biolumineszenzbildes generiert werden. Abbildung 29 stellt die Zusammenführung der Schwarz/Weiß Aufnahmen und der Biolumineszenzbilder zu den Pseudocolour Images dar.

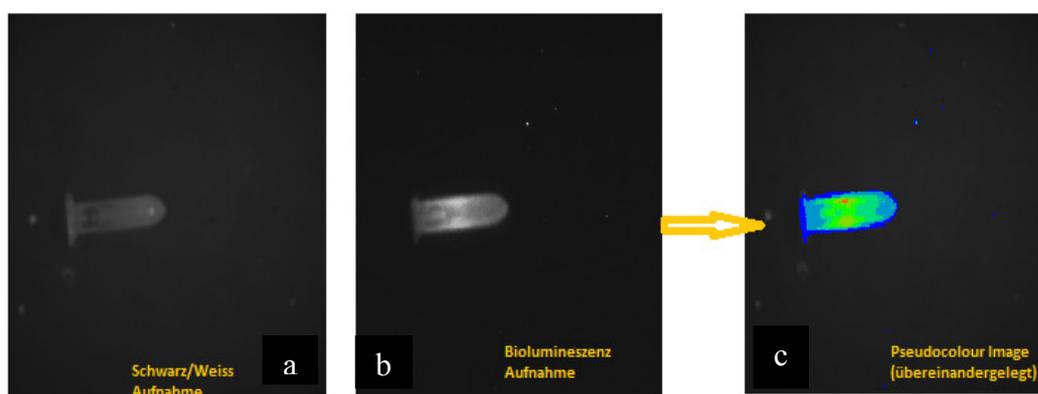


Abbildung 29: Generierung der Pseudocolours im Biolumineszenz Imaging

(a) Schwarz-Weiß-Aufnahme der Zellsuspension, (b) Darstellung der Biolumineszenz, (c) Darstellung der Biolumineszenz in Pseudocolour Images

5.3.3 Bindungsstudien mit A549 und LLC Zellen

Die monoklonalen Antikörper anti-EGFR-MAk (Matuzumab), anti-EpCam-MAk und anti-Hsp70-MAk wurden auf Bindungen an die Zelllinie A549 für das Modell der Pleurakarzinose überprüft und lieferten die folgenden Ergebnisse:

Die Bindung des anti-EGFR-MAk (Matuzumab) betrug 16,5%, die des anti-EpCam-MAk betrug 7% und die Bindungsrate des anti-Hsp70-MAk betrug 0,4%.

Matuzumab zeigte mit 16,5% eine ausreichende Bindung an die Zelllinie A549. Basierend auf diesem Ergebnis wurde diese Zelllinie zur Etablierung des Pleurakarzinosemodells herangezogen.

Zur Ermittlung eines geeigneten Antikörpers zur Bindung an die Lewis Lung Carcinoma Zelllinie (LLC) für ein Modell der Pleurakarzinose wurden die monoklonalen Antikörper anti-EGFR-MAk (Matuzumab) und anti-EpCam-MAk verwendet. Sie lieferten die folgenden Ergebnisse:

Die Bindung des anti-EGFR-MAk (Matuzumab) an die Zellen betrug 1,5%, die Bindung des anti-EpCam-MAk betrug 0,7%.

Die Bindungsstudien wurden bei Inkubationstemperaturen von 37° C durchgeführt. Aufgrund der niedrigen Bindungen der verfügbaren Antikörper erwies sich die Etablierung eines Pleurakarzinosemodells mit dieser Zelllinie als ungeeignet.

5.3.4 Scatchard Analyse

Mit der unter 5.2.5 beschriebenen Analyse nach Scatchard wurde die EGF-Rezeptorexpression der Zelllinie A549 quantifiziert. Diese Zelllinie zeigte in den Bindungsstudien die höchste Bindung mit dem Anti-EGFR-MAk (16,5%).

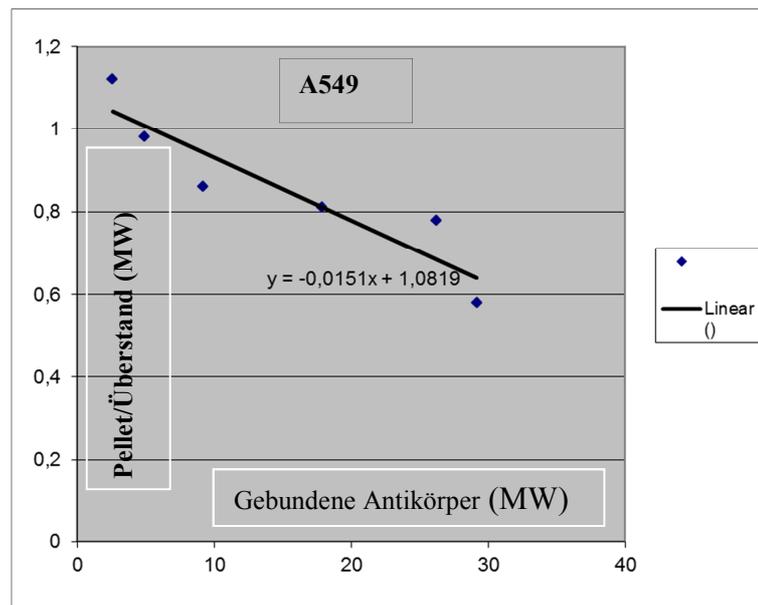


Abbildung 30: Grafische Darstellung des Scatchard-Plots der Zelllinie A549 zur Ermittlung der EGF-Rezeptordichte pro Zelle

71,6 ng Antikörper konnten maximal an die Zellen binden (71,6 fg pro Zelle). Die Antigendichte betrug $2,86 \times 10^5$ EGF-Rezeptoren pro A549-Zelle.

5.3.5 Antikörpermarkierung mit ^{213}Bi

Bei Verwendung von 100 μg Anti-EpCam-MAK bzw. Anti-Hsp70-MAK waren nach 7 Minuten 83% bzw. 86% des ^{213}Bi gebunden. Nach der Passage über eine PD-10 Säule waren 96% bzw. 88,5% des ^{213}Bi an die Antikörper gebunden. Es ergaben sich spezifische Aktivitäten bei Anti-EpCam-MAK von 0,2 MBq bis 0,6 MBq/ μg AK, und bei Anti-Hsp70-MAK von 0,17 MBq bis 0,5 MBq/ μg Antikörper.

5.3.6 Tierexperimente

5.3.6.1 Tumorangehrate nach Injektion von A549 und LLC Lungenadenokarzinomzellen

Die Tiere, welche mit A549 Zellen intrapleurale instilliert wurden, zeigten eine Tumorangehrate von 80%. Bei der Sektion zeigte sich hochgradiger Tumorbefall im Bereich des Mediastinums und des parietalen Pleurablattes, ein pleuraler Erguss konnte nicht festgestellt werden.

Nach intrapleuraler Injektion von Lewis Lung Carcinoma Zellen (LLC) betrug die Tumorangehrate bei den Mäusen 100%. Diese Zelllinie erwies sich als hochgradig tumorigen. Da zur Etablierung des Pleurakarzinosemodells mit nicht-transfizierten Zellen gearbeitet wurde,

konnte erst nach der Sektion ein Tumor diagnostiziert werden. Alle Tiere zeigten hochgradigen Tumorbefall im Bereich des Mediastinums und bei 6 der 10 Tiere konnte ein pleuraler Erguss festgestellt werden.



Abbildung 31: Etablierte murine Pleurakarzinose; Tumorabsiedlungen sind im Bereich des Mediastinums sichtbar

5.3.6.2 Überleben nach A549 Zellinstillation

Die mittlere Überlebenszeit nach Zellinstillation der mit 1×10^6 bzw. mit 5×10^6 Zellen der Lungenkarzinomzelllinie A549 intrapleural instillierten Mäuse betrug 46 bzw. 40 Tage. Das mittlere Überleben aller mit A549 Zellen instillierten Tiere betrug 43 Tage nach Zellinstillation.

5.3.6.3 Überleben nach LLC Zellinstillation

Die mittlere Überlebenszeit nach Zellinstillation der mit 5×10^5 LLC Zellen intrapleural instillierten Mäuse betrug 16 Tage.

Die mittlere Überlebenszeit der Mäuse mit A549 Zellinstillation erwies sich mit 43 Tagen als deutlich länger als die der mit Lewis Lung Carcinoma Zellen instillierten Mäuse (16 Tage).

5.3.7 Histologie der Pleurakarzinose

Die Lungen der Tiere, welche mit den A549 Lungenadenokarzinomzellen lokoregional instilliert worden waren wurden nach Euthanasie histologisch untersucht. Ziel dieser Untersuchung war die Bestätigung des Vorhandenseins von Tumorzellen im peripulmonalen Gewebe und somit der erfolgreichen Etablierung des lokoregionalen Tiermodells der Pleurakarzinose. Die Einbettung, Färbung und Diagnostik wurden von Herrn Prof. Walch, Pathologisches Institut des Helmholtz Zentrum München durchgeführt.

Abbildung 32 zeigt einen soliden Tumorherd mit massiver Leukozyteninfiltration angrenzend an das Lungengewebe. In der vergrößerten Darstellung ist dessen drüsiges Erscheinungsbild eines Adenokarzinoms mit Leukozyteninfiltration und Siegelringzellen auffallend.

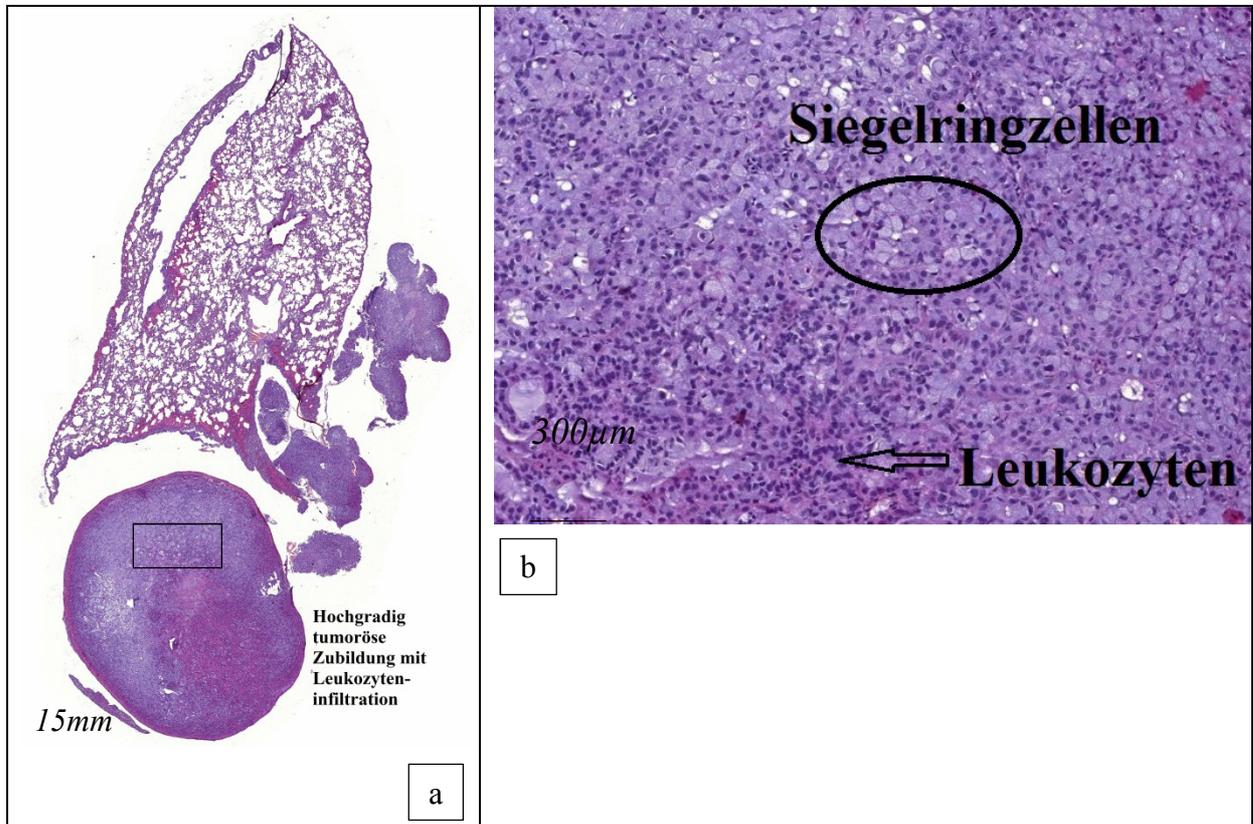


Abbildung 32:(a) Solider Tumorherd am Lungengewebe; (B) Solider Tumorherd am Lungengewebe in ca. 50-facher Vergrößerung

Ein mittel bis gut differenziertes Adenokarzinom kann in Abbildung 33 gezeigt werden. Siegelringzellen mit an den Rand gedrängten Zellkernen sind zu erkennen. Innerhalb der Lunge stellen sich Nerven- und Blutgefäße dar.

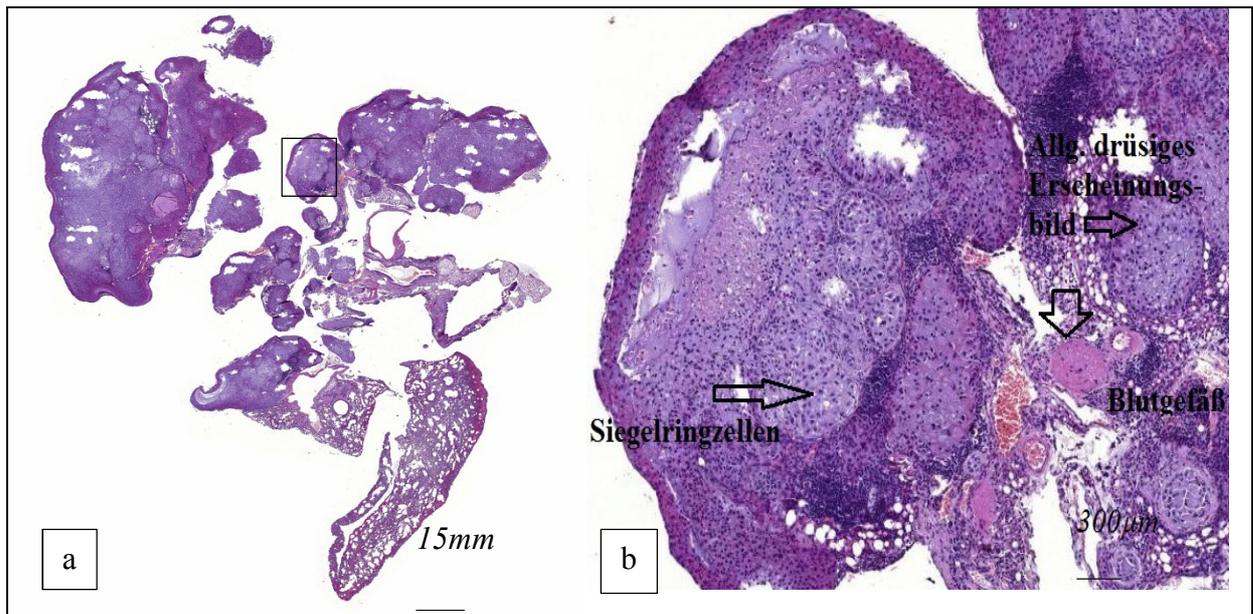


Abbildung 33: (a) Mittel bis gut differenziertes Adenokarzinom der Lunge; (b) Mittel bis gut differenziertes Adenokarzinom der Lunge in ca. 50-facher Vergrößerung

Abbildung 32 und Abbildung 33 machen die insgesamt hochgradige Tumorausprägung im und um das Lungengewebe der Mäuse nach A549 Zellinokulation deutlich.

6. DISKUSSION

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die therapeutische Effizienz einer fraktionierten Gabe des ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk bei fortgeschrittenen Harnblasentumoren zu bewerten. In vorangegangenen Studien wurde bereits erarbeitet, dass das beschriebene Radioimmunkonjugat erfolgreich EJ 28-luc Harnblasenkarzinomzellen in der Blase der Maus abtöten konnte. Am Effizientesten war es dabei, wenn es bereits 1h nach intravesikaler Zellinstillation mit einer Aktivität von 0,93 MBq verabreicht wurde. Von diesen Ergebnissen ausgehend hieße das, dass ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk, direkt nach TUR eines Blasenkarzinoms instilliert, einer Reimplantation verbliebener, disseminierter Tumorzellen beim Patienten entgegenwirken könnte, indem die freiflotierenden Tumorzellen abgetötet werden. Wurde das Radioimmunkonjugat 7 bzw. 14 Tage nach Zellinstillation verabreicht, so sank die Überlebenszeit der Mäuse nach Zellinstillation merkbar ab, im letzteren Fall überlebten nur mehr bis zu 40% der Tiere mehr als 300 Tage nach Zellinstillation (Pfof, 2009). Dabei handelte es sich um eine einmalige Applikation des Radioimmunkonjugats ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk.

In den in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten sollte nun das Ansprechen von bereits etablierten Harnblasentumoren auf die Radioimmuntherapie bewertet werden, wenn die Tumoren fraktioniert bis zu dreimal mit einer festgesetzten Aktivität des Radioimmunkonjugats behandelt wurden. Dabei sollte der Tumor zwiebelschalenartig abgetragen werden, bis hin zu seinem kompletten Verschwinden. Das Vorhandensein der mit dem Gen der Luciferase transfizierten, menschlichen Blasenkarzinomzellen in der Harnblase bei geringgradigem Signal im Biolumineszenz Imaging wurde im Vorfeld histologisch bestätigt, eine Therapie wurde erst bei Präsentwerden eines geringgradigen Signales im Biolumineszenz Imaging eingeleitet.

Die Therapiegruppen wurden 3x im Abstand von 4 Tagen mit 0,46 MBq ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk oder 2x im Abstand von 7 Tagen mit 0,93 MBq ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk behandelt und diese beiden Gruppen bezüglich der therapeutischen Effizienz des Radioimmunkonjugats verglichen und die Toxizität für das gesunde Urothel evaluiert.

Die Wahl von 4 Tagen zwischen der dreimaligen Administration des RIK basierte auf einer vorangegangenen Studie. In dieser Studie wurde eine Verdopplungszeit der Tumorzellzahl von 4 Tagen, und ein maximaler Tumordurchmesser von $95\mu\text{m}$ für Tumoren innerhalb des Peritoneums angenommen (Elgqvist et al., 2006). Dementsprechend konnte man folgende

Schlüsse ziehen: Alle Tumorzellen, welche nicht tiefer als die mittlere Reichweite der Alpha-Partikel ($\sim 60\mu\text{m}$) unter der Oberfläche des Tumors lagen, wurden bereits bei 1. Applikation des RIK abgetötet. Die verbleibenden $35\mu\text{m}$ Tumorradius hatten sich an Tag 4, dem Zeitpunkt der zweiten Therapieadministration verdoppelt, und lagen somit nur mehr knapp außerhalb der Reichweite der Alpha-Strahler. An Tag 8, dem Zeitpunkt der dritten RIK-Administration, musste die Strahlung nur noch die möglichen einzelnen, verbliebenen Zellen abtöten.

Die Aussagen bezüglich der 4-Tages-Abstände zwischen den jeweiligen RIK-Applikationen basierten auf den Annahmen, dass die Aktivität nur an der Oberfläche des Tumors verteilt war, dass die Aktivität homogen über alle Zellen verteilt war, und auch ausreichte um den Zelltod bis in eine Tiefe von $62\mu\text{m}$ zu verursachen. Genauso wurde vorab angenommen, dass die abgetöteten Zellen von der Oberfläche des Tumors innerhalb der 4 Tage verschwanden, bis die nächste Therapie verabreicht wurde. Würde anstatt dessen angenommen, dass die Radioimmunkonjugate in den Tumor diffundierten, und somit auch das Zentrum des Tumors von Beginn an bestrahlten, so wäre die Zielsetzung der fraktionierten Therapie, eine homogene Verteilung der absorbierten Dosis sicherzustellen, anstatt den Tumor zwiebelschalenartig abzutragen (Elgqvist et al., 2006). Welche der beiden Annahmen die Korrektere ist, soll in weiteren Studien herausgefunden werden.

Die Wahl der beiden unterschiedlichen Aktivitäten beruhte auf der Studie von Pfof, 2009. So wurde in dieser Studie gezeigt, dass die Mäuse nach einer intravesikalen Instillation von $0,93\text{ MBq}$ -anti-EGFR-MAK die längste Überlebenszeit aufwiesen (Pfof, 2009). Für die zweimalige Applikation wurde in der vorliegenden Arbeit deshalb jeweils diese Aktivität verwendet, während für die dreimalige Applikation jeweils die Hälfte dieser Aktivität verwendet wurde.

6.1 Etablierung des murinen orthotopen Harnblasenkarzinommodells

Die Tumorangehrate in der Harnblase der Mäuse betrug in unserer Studie knapp über 60%. Zur intravesikalen Zellinstillation wurden die Tiere mit einer Kombination aus Medetomidin ($500\mu\text{g}/\text{kg}$), Midazolam ($5000\mu\text{g}/\text{kg}$) und Fentanyl ($50\mu\text{g}/\text{kg}$) intraperitoneal anästhesiert. Dies führte zu einer bis zu 3 Stunden anhaltenden Narkose, während dieser die Tiere auf einem Wärmekissen mit gesetztem Katheter verblieben. Solange die Tiere katheterisiert waren, verblieben die instillierten Harnblasenkarzinomzellen in der Blase. In dieser Zeit sollten sich die Zellen an die Läsionen, die durch den vorangegangenen Kautervorgang des Urothels ge-

setzt worden waren, haften. Am Ende der Narkose nach 3 Stunden wurden die Katheter entfernt und damit entleerte sich die gefüllte Blase zu einem großen Teil. Es kann nun angenommen werden, dass die Ausbildung eines Tumors im Laufe der folgenden Wochen abhängig war von der Anzahl der an die Läsionen angehafteten EJ 28-luc Zellen und von der Ausprägung und der Anzahl der Läsionen, die gesetzt wurden. Das ausreichend lange Verbleiben der Tumorzellen in der Harnblase um sich an die Läsionen anheften zu können sollte in den Studien durch dreistündige Immobilisierung der Tiere erreicht werden.

Zu der Anzahl der sich in der Harnblase befindlichen Tumorzellen ist zu erwähnen, dass beim Menschen nach Transurethraler Resektion bereits eine minimale Menge disseminierter Tumorzellen ausreichend ist, um früher oder später zu einem Rezidiv zu führen. Dies wird gefördert durch die durch die Resektion traumatisierte Blasenwand, an welche die verbliebenen Tumorzellen umgehend adhären können. Dieser Umstand macht die Annahme unwahrscheinlich, dass das Nicht-Ausbilden eines Blasentumors auf eine zu kleine Anzahl angehefter EJ28-luc Zellen in die traumatisierte Harnblasenwand nach Entfernen des Katheters zurückzuführen ist – einzig ausgenommen der unwahrscheinliche Fall, dass alle Zellen nach Ablauf der drei Stunden vollständig aus der Blase abgeflossen wären und sich bis dahin keine Zelle an die Läsionen angeheftet hätte. Umso mehr wird die Vermutung gestärkt, dass jene Tiere, bei denen sich kein Tumor ausbildete, zu oberflächliche Läsionen in der Blasenwand aufwiesen, an die sich die verbliebenen Zellen anhaften konnten.

Den Beweis, dass sich Zellen der Zelllinie EJ 28-luc direkt nach der Inokulation in der Harnblase befanden, lieferte uns die Biolumineszenzaufnahme, welche mit katheterisierten Tieren 30 min nach Instillation durchgeführt wurde (siehe Abbildung 8).

In den Folgeaufnahmen der Tiere aus Abbildung 8 zeigte sich, dass bei einer der beiden Mäuse nach 21 Tagen ein deutliches Signal im Biolumineszenz Imaging zu sehen war, während bei der anderen Maus kein Signal zu finden war, sich also kein Tumor entwickelt hatte. Dies könnte sich wiederum dadurch erklären, dass die gesetzten Läsionen bei der tumortragenden Maus wahrscheinlich ausreichend waren um eine Anheftung der Tumorzellen zu gewährleisten. Es soll auch erwähnt werden, dass die Maus, welche nach 21 Tagen ein deutliches Signal im Biolumineszenz Imaging aufwies, sieben Tage nach Zellinokulation von 2×10^6 EJ 28-luc Harnblasenkarzinomzellen noch völlig signalfrei bei den in vivo Aufnahmen war (Abbildung 34). 30 min nach Zellinokulation war das Signal sehr deutlich gewesen. Diese Tatsache bedeutet, dass sieben Tage nach Zellinstillation weniger als 1×10^3 Zellen in der Harnblase ge-

wesen sein müssen, denn diese Zahl stellt die minimal darstellbare gemessene Zellzahl im Biolumineszenz Imaging dar (Pfof, 2009). Der Vergleich des nicht vorhandenen Signals an Tag 7 mit dem von Tag 21 nach Zellinstillation zeigte, dass es in der Zeitspanne von 2 Wochen zu einer großen Vermehrung der verbliebenen Zellen gekommen war.

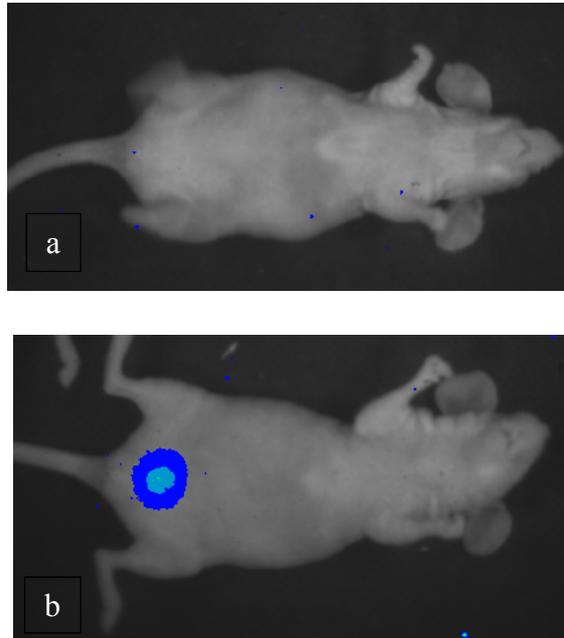


Abbildung 34: Tumorwachstum bei dem unter (b) in Abbildung 8 dargestellte Tier

(Maus Nr. 39, siehe Anhang)

(a) 7 Tage nach ZI konnte kein Biolumineszenzsignal dargestellt werden; (b) 21 Tage nach ZI hatte eine massive Zellvermehrung stattgefunden und ein Signal im Biolumineszenz Imaging war nachweisbar

Bei einem Großteil der Tiere konnten zwei Wochen nach Zellinstillation erstmals Signale wahrgenommen werden, und bei einem kleineren Teil schließlich nach 3 Wochen. War nach 3 Wochen noch kein Signal zu sehen, so konnte man in der Regel davon ausgehen, dass die Maus tumorfrei bleiben würde. Bei 12% der Tiere konnte innerhalb der 3 Wochen, während denen 1x wöchentlich das Tumorwachstum dokumentiert wurde, kein Signal im Biolumineszenz Imaging festgestellt werden, was annehmen ließ, dass sich Tumor ausgebildet hatte. Zwischen dem 31. und dem 43. Tag, als bei diesen Tieren ein weiteres Mal eine Tumoretablierung kontrolliert wurde, zeigte sich zum ersten Mal eine schwache Lichtemission. Basierend auf den Überlegungen, dass die am kleinsten darstellbare Zellzahl der EJ 28-luc Harnblasenkarzinomzellen im Biolumineszenz Imaging bei 1×10^3 liegt, so kann in obigem Fall angenommen werden, dass bei den betroffenen Mäusen anfangs eine Zellzahl in der Blase vorhanden gewesen sein musste, welche $< 1 \times 10^3$ war. Da die offensichtlich sehr geringe An-

zahl angehafter Zellen Zeit brauchte, um sich zu vermehren, konnte die Zellzahl, welche ein Signal im Biolumineszenz Imaging auslöste auch erst relativ spät erreicht werden. Diese Tiere wurden einer Therapie zugeführt, und die Anzahl der Tage zwischen Zellinstillation und Therapiebeginn dokumentiert, weil ja schlussendlich die Größe des Tumors und nicht die Dauer bis zur Tumoretablierung für den Therapieerfolg ausschlaggebend war.

6.2 Biolumineszenz Imaging

Biolumineszenz, die auf Enzymen basierende Erzeugung sichtbaren Lichts durch einen lebenden Organismus ist ein natürlich vorkommendes Phänomen bei vielen Tieren. Luciferase ist ein Enzym, das die Oxidierung eines Substrates katalysiert und so Lichtteilchen (Photonen) freigesetzt werden. Die Biolumineszenz der nordamerikanischen Leuchtkäfers (*Photinus pyralis*) wurde bisher am meisten studiert.

Aufgrund der Expression dieses Firefly Luciferase Gens (*luc*) wird das Enzym Luciferase produziert. Dieses wiederum wandelt das Substrat D-Luziferin in nicht-reaktives Oxyluziferin um, was zu einer Emission grünen Lichtes mit einer Wellenlänge von 562 nm führt (Sato et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit konnten bereits bei einigen Tieren eine Woche nach Zellinstillation mit gen-transfizierten Tumorzellen Lichtemissionen mit einer Charge Coupled Device (CCD) Kamera gemessen werden. Diese CCD Kameras konvertieren Lichtphotonen in Elektronen. Die Software wandelt die Signale dieser Elektronen in zweidimensionale Bilder um. Ebenso quantifiziert sie die Intensität des ausgesendeten Lichts und wandelt diese Werte in eine Pseudocolourgraphik um (Sato et al., 2004).

Die Größe des Tumors war bei jedem Tier zu Therapiestart zumindest geringgradig, was histologisch durch die Anwesenheit von Tumorzellen im Urothel im Vorfeld bewiesen worden war. Die Tatsache, dass die histologische Untersuchung einer Mäuseblase mit geringgradigem Signal im Biolumineszenz Imaging die Anwesenheit eines kleinen Tumors zeigte, rechtfertigte auch, diese Tiere als tumorpositiv zu werten, obwohl bei der geringen Größe des Signals technisch noch keine Pseudocolour Images generiert werden konnten.

Jurczok et al. (2008) bestätigten in einer Studie die hohe Sensitivität des Biolumineszenz Imaging in der frühen Detektion von Tumorzellimplantaten, wiesen aber auch auf dessen Li-

mitationen hin. So kann diese Technik bei fortgeschrittenen Tumorstadien aufgrund von Lichtsignal-Abschwächungen durch die Tumormasse weniger verlässlich sein. Auch die Lagerung der Tiere auf dem Gelkissen spielt eine nicht untergeordnete Rolle. Die enzymatische Umsetzung des Substrates Luziferin ist ATP abhängig und aufgrund dessen können nekrotische Tumoreale oder apoptotische Zellen kein Biolumineszenzsignal bewirken, und können nicht dargestellt werden (Huber, 2003; Jurczok et al., 2008).

Iyer et al. (2002) erfassten schließlich die gute Korrelation der Luciferase-Enzymaktivität mit dem resultierenden Biolumineszenz-Signal, welches eine Grundlage für quantitative Messungen des Tumorwachstums und der Tumorregression nach Therapie in der Mäuseblase bieten kann, wie die eigenen Ergebnisse zeigen.

6.3 Therapeutische Effizienz der Radioimmuntherapie bei fortgeschrittenen Tumoren

In manchen Fällen wurden bei der Überprüfung der therapeutischen Effizienz von ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk im Biolumineszenz Imaging Tiere beobachtet, welche sich bei der Messung 4 Tage nach Therapieende als signalfrei erwiesen und dennoch einige wenige Tage nach der Messung aufgrund von Kachexie und schlechtem Allgemeinbefinden euthanasiert werden mussten. In der Sektion fanden sich schließlich bei einigen dieser Tiere deutlich vergrößerte, mit Tumorgewebe durchwachsene Harnblasen mit Gefäßeinsprossungen. Man musste also in diesen Fällen davon ausgehen, dass aufgrund nekrotischer Anteile des Tumors und der daraus resultierenden Abwesenheit von ATP das zugesetzte Luziferin nicht mehr enzymatisch umgesetzt werden, und die Tumore im Biolumineszenz Imaging nicht mehr dargestellt werden konnten. Die betroffenen Mäuse hatten nicht auf die Therapie angesprochen und wurden nach der Sektion dementsprechend gewertet.

Einige andere dieser Biolumineszenz-negativen Tiere nach Therapie, welche wenige Tage nach der Kontrollmessung verstarben, zeigten eine völlig normal aussehende Blase in der Sektion. Bei diesen Tieren wurden die Tumorzellen durch die Therapie abgetötet, man musste also als mögliche Todesursache auch das bis zu 4-malige Narkotisieren und Katheterisieren bei diesen Tieren mit in Betracht ziehen, vor allem wenn der Zeitpunkt der letzten Narkose bzw. Manipulation nur einige wenige Tage zurücklag. 4-maliges Katheterisieren oder Manipulieren der Harnblase, stellte für die Tiere eine große Belastung dar und muss nach den Er-

fahrungen, die aus dieser Arbeit gewonnen werden konnten, als Maximum genannt werden, was deutlich die Grenzen der Versuchsdurchführung aufzeigte. Eine Limitierung der Häufigkeit des Katheterisierens der Blase liegt beim Menschen nicht vor, eine fraktionierte Therapie könnte also aus technischer Sicht aus deutlich mehr als drei Therapien bestehen. Dies kann allerdings experimentell in der Mäuseblase nicht durchgeführt werden. Ein feinfühliges und routiniertes Arbeiten ist unbedingt erforderlich um diese Versuche durchführen zu können.

Bei einigen wenigen Tieren trat der Fall auf, dass sie nach den Aufnahmen im Biolumineszenz Imaging vier Tage nach Therapieende als tumorfrei gewertet wurden und auch noch lange Zeit überlebten. Als sie allerdings vor Tag 300 nach Zellinstillation eine deutliche Verschlechterung des Allgemeinzustandes aufwiesen, zeigten sich wieder manifeste Blasenkarzinome. Hierbei könnte der Fall vorliegen, dass der Tumor nach letzter Therapie so sehr verkleinert wurde, dass während der Messung zu wenige Zellen vorhanden waren um ein Signal zu bewirken ($<1 \times 10^3$). Diese verbliebenen Zellen vermehrten sich dann im Laufe der Zeit wieder und dies führte innerhalb der 300 Tage nach Zellinstillation zur Euthanasie der Tiere. Die von uns verabreichte Therapie führte in diesem Fall zu einer Abtötung und Verminderung der Tumorzellanzahl, allerdings eliminierte sie die Zellen nicht vollständig und dadurch kam es wieder zum Rezidiv. Bei diesen Tieren hätte eine weitere Therapie möglicherweise die Abtötung der letzten verbliebenen Tumorzellen bewirkt, in dieser Arbeit wurde aus Tierschutzgründen allerdings maximal dreimal therapiert.

Die Beobachtungszeit der Mäuse betrug 300 Tage. Sie wurde so gewählt, da dies der durchschnittlichen Lebenszeit einer gesunden Maus dieser Spezies entspricht. Mittlerweile verzeichnet die Zuchtanstalt Charles River in Sulzfeld, dass 50% aller Nacktmäuse, die in ihren Stallungen eines natürlichen Todes sterben, den 21. Lebensmonat, also 630 Tage erreicht.

Rolle des ^{213}Bi -anti-EGFR-Antikörpers Matuzumab (EMD 72000) bezüglich der therapeutischen Effizienz

Der monoklonale anti-EGFR-Antikörper Matuzumab (EMD 72000) wurde in dieser Arbeit ausschließlich als Carrier für das Radionuklid ^{213}Bi zu den EGFR-überexprimierenden Zellen der Zelllinie EJ 28-luc verwendet. Bei jedem Markierungsvorgang mit ^{213}Bi wurden $100\mu\text{g}$ Antikörper zugesetzt. Bei den erzielten spezifischen Aktivitäten entfielen auf eine Maus pro Therapiegabe im Mittel ca. $2\mu\text{g}$ desselben. Der anti-EGFR-Antikörper Matuzumab EMD 72000 besitzt, wenn er in sehr hohen Konzentrationen eingesetzt wird, auch ohne gekoppeltes

zytotoxisches Agens einen Antitumor-Effekt, allerdings in deutlich höheren Dosen, als bei unserem Mausmodell angewendet. Unmarkierte EGFR-Antikörper können Apoptosevorgänge in ausgewählten Tumorzellen induzieren. Allerdings ist ihre Wirkungsweise dabei eher zytostatisch als zytotoxisch (Laskin und Sandler, 2004). Matuzumab wurde bereits in klinischen Studien zur Behandlung von EGFR-positiven Tumoren wie z.B. des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (Kollmannsberger et al., 2006) und des Ovarialkarzinoms eingesetzt (Seiden et al., 2007). Dabei konnte aber die Eliminierung der Tumorzellen erst nach intravenöser Gabe sehr hoher Mengen (400 – 1600 mg/ Patient / Woche) des nativen Antikörpers beobachtet werden (Vanhoefler et al., 2004). Diese Menge würde einer Gabe von ca. 0,125 – 0,5 mg pro Maus entsprechen und ist somit ungefähr 100-fach höher als die tatsächlich applizierte Antikörper-Menge bei der intravesikalen ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk Instillation in der vorliegenden Studie (2µg). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass der Antitumor-Effekt der ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk Therapie aufgrund der hochenergetischen α -Strahlung von ^{213}Bi erfolgte und nicht durch den Anti-EGFR-Antikörper verursacht wurde. Um zu zeigen, dass bei alleiniger Applikation dieser geringen Antikörpermenge keine therapeutische Wirkung erwartet werden konnte, und deshalb jede Tumorreduktion einzig auf das Radionuklid zurückzuführen war, wurden 10 tumortragende Tiere mit jeweils 1µg unmarkiertem anti-EGFR-MAk 3x im Abstand von 4 Tagen mittherapiert und die Überlebenszeit dieser Tiere mit jener der mit dem RIK therapierten Tiere verglichen. Dabei konnte ein signifikanter Unterschied festgestellt werden (siehe Tabelle 9).

Aufgrund des Nicht-Ereichens der vordefinierten klinischen Endpunkte in klinischen Phase II Studien mit dem Antikörper Matuzumab bei Indikationen wie dem metastasierenden Kolonkarzinom (mCRC), oder dem Magenkarzinom wurde Matuzumab EMD 72000 im Februar 2008 vom Markt genommen. Als sein Nachfolger wird nun Cetuximab verwendet.

Bei 28 der 44 Tiere der Therapiegruppen konnte eine Verkleinerung des Tumors nach Therapie festgestellt werden. In der vorangegangenen Studie wurden die Tumorzellen bei 90% der Tiere abgetötet, wenn das Radioimmunkonjugat 1 Stunde nach intravesikaler Zellinstillation verabreicht wurde. Zu diesem Zeitpunkt waren die Zellen noch freischwimmend. Diese Tatsache stellt den Unterschied zwischen den beiden Ausgangssituationen deutlich dar. In der vorliegenden Studie wurde mit der Therapie frühestens 14 Tage nach intravesikaler Instillation von 2×10^6 EJ28-luc Harnblasenkarzinomzellen begonnen. Dies wurde deshalb so gehandhabt, weil die ersten Lichtemissionen der Zellen im Biolumineszenz Imaging meist erst zu

diesem Zeitpunkt darstellbar wurden. Um darlegen zu können, dass sich ein Harnblasentumor auch wirklich etabliert hatte, war es essentiell, vorab diese Tatsache per Biolumineszenz Imaging darzustellen. Bestätigt wurde das Vorhandensein eines Urothelkarzinomes vor Therapie zusätzlich histopathologisch, wofür ein ganz besonderer Dank Herrn PD Dr. Georg Weirich vom Institut für Pathologie am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München gilt. Er konnte bestätigen, dass die Intensität der Lichtemissionen im Biolumineszenz Imaging histologisch mit der Größe der Tumoren korrelierte.

Die Therapien mit ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk starteten in der vorliegenden Studie an bereits etablierten und daher fortgeschrittenen Tumoren. In solchem Stadium sprachen noch ca. 60% der Tiere auf die Therapie an. Tiere, bei denen sich die Tumorgroße nach der ersten Therapie weiter vergrößert hatte, zeigten kein Ansprechen auf weitere intravesikale Applikationen des Radioimmunkonjugats. Bei diesen Tieren wurde der Tumor zu groß um von der fraktionierten Therapie erfolgreich verkleinert werden zu können. Verkleinerte sich ein Tumor allerdings während der Therapie, so stand dem Radioimmunkonjugat bei jeder weiteren Gabe ein kleinerer Tumor gegenüber, dessen Zellschichten zu einem viel größeren Teil von der hochzytotoxischen Alphastrahlung erfasst werden konnten. Der Tumor konnte zwiebelschalenartig abgetragen werden. Die Fraktionierung konnte dann wirksam werden, wenn der Tumor primär auf das Radioimmunkonjugat angesprochen hatte. Die Ausgangsgröße des Tumors durfte daher nicht zu groß sein. Sprach der Tumor nicht primär auf die Therapie an, so wurde er zu groß, um ihn von Gabe zu Gabe zwiebelschalenartig abtragen zu können, da sich sein Durchmesser stetig vergrößerte, und so das Radioimmunkonjugat nur mehr die äußersten Zellschichten erreichen konnte.

Daraus wird der Schluss gezogen, dass das Ansprechen eines Tumors auf die Radioimmuntherapie mit ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk von der Größe des Ausgangstumors abhängig war wenn die Radioimmunkonjugate sich nur an die äußeren Zellschichten anheften konnten. Wies die Harnblase an der Oberfläche des Urothels wenige Tumorzellverbände auf, so konnte der Tumor noch therapiert werden. Bei hochgradig proliferierenden Tumorzellen (die Definition des mittelgradigen Biolumineszenzsignals konnte damit korreliert werden) konnte die fraktionierte Radioimmuntherapie keine Wirksamkeit mehr zeigen (Weirich 2010, unveröffentlicht).

Die Therapiegruppen, welche 3x mit 0,46 MBq anti-EGFR-MAk im Abstand von 4 Tagen therapiert wurden zeigten eine mittlere Überlebenszeit von 124 bzw. von 138 Tagen, während jene Gruppen, die 2x mit 0,925 MBq anti-EGFR-MAk im Abstand von 7 Tagen behandelt

wurden 127 bzw. 165 Tage nach Zellinstillation überlebten. Beim Vergleich der Überlebens-tage nach Zellinstillation konnte bei den beiden Therapieschemata kein signifikanter Unter-schied festgestellt werden. Ebenso brachte die Auswertung der Änderungen der Biolumines-zenzsignale der beiden Gruppen ein ähnliches Ergebnis. Bei fraktionierter Gabe von ^{213}Bi -anti-EGFR-MAK konnten Aktivitäten größer als $3 \times 0,46 \text{ MBq}$ die therapeutische Effizienz und die Überlebenszeit der Tiere nicht mehr weiter verbessern. Gleichzeitig war nur eine 2-malige Behandlung mit $0,93 \text{ MBq}$ nötig, um denselben Therapieausgang zu erzielen. Verbes-sert konnte er durch die höhere Aktivität nicht mehr werden. Aufgrund der Tatsache, dass mehrmalige Therapiegaben das Risiko von verbleibenden Tumorzellen in der Harnblase redu-zieren können, sollte eine mehrmalige Applikation mit niedriger Aktivität weniger frequenten Applikationen mit höherer Aktivität vorgezogen werden.

6.4 Toxizität des ^{213}Bi -Radioimmunkonjugats

In der Studie sollte auch gezeigt werden, dass das Radioimmunkonjugat ausschließlich selektiv an EGFR-überexprimierende Karzinomzellen bindet und physiologisches Urothel davon nicht geschädigt wurde. Dies ließ sich beweisen, indem eine Gruppe tumorfreier Tiere mit demselben Therapieregime mitbehandelt wurde wie eine tumortragende Gruppe, welche $3 \times$ im Abstand von 4 Tagen mit $0,46 \text{ MBq}$ anti-EGFR-MAK therapiert wurde. Das Urothel dieser tumorfreien Mäuse wurde 300 Tage nach Therapieende histopathologisch auf Strahlenschä-den untersucht und zeigte dabei keine pathologischen Veränderungen. Dadurch konnte ge-zeigt werden, dass ^{213}Bi -anti-EGFR-MAK aufgrund seiner extrem kurzen Reichweite von 3-4 Zelldurchmessern nur dort schädigte, wo das RIK band und dass es nicht in der Lage war, Strahlenschäden am umliegenden, physiologischen Gewebe zu verursachen, wenn sein Car-rier keine Möglichkeit hatte, durch Rezeptorbindung unmittelbar an die Zelle zu binden. Ebenso wurden tumorfreie Tiere zur Ermittlung der maximal tolerierten Aktivität (MTA) des physiologischen Urothels zweimalig mit $1,85$ bzw. mit $3,7 \text{ MBq}$ ^{213}Bi -anti-EGFR-MAK be-handelt und wiederum deren Urothel auf Strahlenschäden untersucht. Auch in diesen Fällen wurden in der vorliegenden Arbeit keine pathologischen Veränderungen diagnostiziert.

In einer noch unveröffentlichten Arbeit von Müller wurden Urothelia bei Mäusen weiter unter-sucht welche ohne vorherige Tumorzellinstillation $2 \times 1,85 \text{ MBq}$ ^{213}Bi -anti-EGFR-MAK intra-vesikal im Abstand von 7 Tagen erhalten hatten. Dabei war in nur einem Fall das Urothel ver-ändert. Dabei war die instillierte Aktivität von $2 \times 1,85 \text{ MBq}$ doppelt so hoch wie in den The-

rapieexperimenten. Die dabei erhobenen histologischen Befunde umfassten atypische Zellen mit vergrößerten Kernen, Hyperchromasie und irregulären Kernmembranen. Diese Veränderungen sind gut durch die Wirkung eines Alpha-Emitters zu erklären, können jedoch unter praktischen Gesichtspunkten vernachlässigt werden, da bereits fraktionierte Gaben von 0,925 MBq ^{213}Bi -anti-EGFR-MAK sehr effizient sind und höhere Aktivitäten keinen weiteren therapeutischen Vorteil mit sich bringen (Müller 2013, unveröffentlichte Daten).

Biodistributionsstudien wurden bereits in Vorgängerstudien durchgeführt. Dabei wurde die systemische Verteilung des Radioimmunkonjugates nach intravesikaler Instillation sowohl bei nativen, als auch bei gekauterten Blasen gemessen. Prinzipiell kann dabei zusammengefasst werden, dass die lokoregionale Applikation eine Retention des ^{213}Bi -anti-EGFR-MAK in der nativen Blase bewirken konnte. Bei traumatisiertem Urothel wie etwa nach Transurethraler Resektion trat Aktivität in die Zirkulation über, die jedoch so gering war, dass keine Schäden an den Organen festgestellt werden konnten (Pfof, 2009).

Beck et al. beschrieben 2007, dass die Aktivität im Blut und blutreichem Gewebe nach intravenöser Injektion des RIK lange zirkuliert (Beck et al., 2007). Lokoregionale Applikation gewährleistet deshalb eine geringere Strahlenexposition der blutreichen Organe wie Leber, Herz und Milz. Gleichzeitig war die Bindung des ^{213}Bi -anti-EGFR-MAK an den EGFR des Harnblasenkarzinoms bei systemischer Applikation deutlich geringer als bei lokoregionaler Gabe (Pfof, 2009).

6.5 Die Etablierung des Pleurakarzinosemodells

Der Anti-EGFR-MAK wies eine bessere Bindung an die A549 Lungenadenokarzinomzellen auf als an die LLC Zellen. Da aufgrund der angestrebten lokoregionalen Alpha-Radioimmuntherapie der Pleura die Bindung des Antikörpers an die Zelllinie essentiell ist, wurde die erstere Zelllinie für die Etablierung des Modells des Pleurakarzinose verwendet, obwohl die Tumorausbildung bei den Mäusen zugunsten der LLC Zellen ausfiel. Die humane Lungenadenokarzinomzelllinie A 549 zeigte dennoch eine sehr gute Tumorangehrate von 80%.

Die Lungenadenokarzinomzellen wurden zur Zellinstillation durch einen Interkostalraum direkt in den Pleuralspalt instilliert. Ein Hautschnitt war zur besseren Zugänglichkeit und Sichtbarkeit des Interkostalraumes notwendig, das Setzen des Schnittes sowie auch dessen Heilung brachten keine Komplikationen mit sich. Die Kanüle wurde dann für im Pleuralspalt befunden

den, sobald sie die Unterhaut und die Muskulatur durchdrungen hatte. Die Menge der instillierten Zellen wurde gerechtfertigt durch die Studien von Matsumoto et al, in denen erfolgreich mit 5×10^6 A549 Lungenadenokarzinomzellen ein Pleurametastasenmodell entwickelt werden konnte (Matsumoto et al., 2009). Obwohl die intrapleurale Instillation die Schritte der vaskulären, pulmonalen und pleuralen Zellinvasion bei der Metastasenausbildung in der Pleura umgeht, kann man damit doch die Fähigkeit der Tumorzellen zur Ausbildung einer Karzinose in der Pleura beobachten. Bei der Zelllinie A549 handelt es sich um eine Lungenkarzinomzelllinie, sodass außerdem eine Tumorausbildung auch in der Lunge zu erwarten war.

Eine präzise Instillation aller Zellen in den mikroskopisch kleinen Pleuralspalt konnte technisch nicht garantiert werden, sodass davon ausgegangen werden musste, dass Karzinomzellen bei der Instillation bis in den Thorax gelangten. Die histologische Untersuchung der Lungen zeigte, dass sich sowohl innerhalb der Lungen als auch im Pleuragewebe gut innerviertes Tumorgewebe fand.

Die Ausprägung der Lungenadenokarzinome war insgesamt sehr stark und eine Diagnose der Adenokarzinome eindeutig. Die Herausforderung wird in Zukunft die präzise Verbringung der Zellen in den Pleuralspalt, und deren Darstellung in vivo mittels Biolumineszenz Imaging sein, um somit ein verlässliches Modell für die Evaluierung der lokoregionalen Therapie mit ^{213}Bi -anti-EGFR-MAK bei der Pleurakarzinose zu entwickeln, die bisher eine sehr schlechte Prognose aufweist.

6.6 Ausblick

Aufgrund seiner geringen Nebenwirkungen und seiner spezifischen Wirkungsweise stellt eine lokoregionale Tumorthherapie mit dem alpha-Strahler ^{213}Bi , gekoppelt an einen monoklonalen Antikörper eine hoffnungsvolle neue Therapiestrategie für viele Betroffene dar, zumal die zur Zeit eingesetzten, adjuvanten Instillationstherapeutika nach transurethraler Resektion viele nachteilige Effekte für den gesamten Organismus besitzen. Die Möglichkeit, das Radioimmunkonjugat direkt an das Tumorgewebe zu bringen, wo es wiederum ganz spezifisch an Tumorzellen wirkt, eröffnet den Weg zu einer schonenden Tumorthherapie.

Aufgrund der Ergebnisse, welche diese Arbeitsgruppe bereits erarbeitet hat, besteht ein großes Interesse von Seiten der Klinik für Urologie der Technischen Universität München, die lokoregionale Radioimmuntherapie mit ^{213}Bi -anti-EGFR-MAK nun auch in die Klinische For-

schung einzubringen. Eine prospektive, nicht-randomisierte Pilotstudie zur Untersuchung der Durchführbarkeit und Toxizität des ^{213}Bi anti-EGFR-MAk bei Patienten mit urothelialeem Carcinoma in situ der Harnblase ist bereits in Planung.

Die Gewinnung von ^{213}Bi über den Ac/Bi-Generator ist zwar ein sehr einfaches Verfahren, jedoch stellt sie in den für die Anwendung am Menschen geforderten Konzentrationen nach wie vor eine Hürde hinsichtlich der Verfügbarkeit der Radionuklide dar. Die geringe Menge an Antikörper, die für einen Patienten für die Therapie benötigt wird (100-200 μg Antikörper pro Patient), ist verhältnismäßig leicht zur Verfügung zu stellen. Es bleibt zu hoffen, dass bei vielversprechenden Ergebnissen in den klinischen Studien mit ^{213}Bi am Menschen in nächster Zukunft neue Optionen zur Gewinnung von ^{213}Bi gefunden werden können.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, auch andere Einsatzgebiete neben der intravesikalen Applikation für eine lokoregionale Therapie mit ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk aufzuzeigen. Durch die Etablierung eines Tiermodells der Pleurakarzinose mit der Lungenkarzinomzelllinie A549 eröffnen sich nun weitere experimentelle Forschungsschwerpunkte, um eine effiziente und sichere Alternative zu den zur Zeit angewendeten, wenig vielversprechenden Therapien der Pleurakarzinose zu finden. Die Etablierung des Modells lieferte zufriedenstellende Ergebnisse hinsichtlich der Tumorangehrate, nun ist es an der Zeit, das Wachstum der intrapleuraleen Tumoren auch in vivo mittels Biolumineszenz Imaging zu verfolgen und in einem weiteren Schritt mit der Evaluierung der Effizienz der lokoregionalen Alpha-Radioimmuntherapie zu beginnen.

Alternativen

Am Ende dieser Arbeit bitte ich Entwicklungen einbringen zu dürfen, welche die Etablierung alternativer Methoden zum Tierversuch vorantreiben.

1959 haben der Zoologe William Russel und der Mikrobiologe Rex Burch die „Drei-R-Regeln“ (Reduction, Refinement, Replacement) erstmals erwähnt (Russel und Burch, 1959). Reduction steht für die Verringerung der für die Versuche benötigten Tierzahlen. Refinement umschreibt Verminderung von Schmerz und Stress für die Tiere, und Replacement steht für den Ersatz von Tieren sooft als möglich durch in-vitro-Tests.

Die EU Direktive 2010/63/EU, die am 1. Januar 2013 in Kraft getreten ist, führt an, dass die europäische Kommission und die EU-Mitgliedsstaaten durch Forschung zur Entwicklung und Validierung alternativer Methoden beitragen sollen. Die Rahmenprogramme der Gemeinschaft für Forschung und technologische Entwicklung stellen zunehmend Mittel zur Verfügung, die darauf abzielen, die Verwendung von Tieren in Verfahren zu vermeiden, zu vermindern und zu verbessern (Einleitung Dir. 2010/63/EU, Abs. 46). Die Europäische Union hat ein Zentrum zur Validierung alternativer Methoden ins Leben gerufen (European Center for the Validation of Alternative Methods – ECVAM). Dieses koordiniert seit 1991 die Validierung alternativer Ansätze in der Union. Die EU-Mitgliedsstaaten sollen die Kommission bei der Ermittlung geeigneter Laboratorien zur Durchführung notwendiger Validierungsstudien unterstützen (Einleitung Dir. 2010/63/EU, Abs. 47).

Im Jahr 2002 wurde die Europäische Consensus Plattform für Alternativen (Ecopa) gegründet. Ihre Mitglieder kommen aus der Industrie, aus Tierschutzorganisationen und der Regierung mit dem Ziel die Forschung in Richtung Alternativen zu Tierexperimenten voranzutreiben und die Akzeptanz alternativer Methoden in der experimentellen Praxis zu erhöhen.

Solange es wissenschaftlich nicht möglich ist Experimente mit lebenden Tieren vollständig zu ersetzen, ist es weiterhin notwendig diese einzusetzen, um die Gesundheit von Mensch, Tier und Umwelt zu schützen. Das Ersetzen von Tierversuchen durch neue Methoden muss aber unser langfristiges Ziel sein.

ANHANG
Tabelle 10: Detaillierte Übersicht der Ergebnisse zur Tumorgröße und zum Überleben aller verwendeten Tiere

Maus Nr.	Gruppe	1. Tumordetektion, x d nach ZI	Therapieschema			Überleben x d		Biolumineszenz Imaging nach Therapie
			2x ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAk im Abstand von 7d	3x ^{213}Bi -Anti-EGFR-MAk im Abstand von 4d	3x Anti-EGFR-MAk im Abstand von 4d	Nach ZI	Nach Therapie	
1	Ko Gr	21	-	-	-	42	-	-
2	Ko Gr	14	-	-	-	62	-	-
3	Ko Gr	14	-	-	-	36	-	-
4	Ko Gr	14	-	-	-	28	-	-
5	Ko Gr	7	-	-	-	114	-	-
6	Ko Gr	7	-	-	-	59	-	-
7	Ko Gr	7	-	-	-	38	-	-
8	Ko Gr	21	-	-	-	80	-	-
9	Ko Gr	14	-	-	-	79	-	-
10	Ko Gr	7	-	-	-	116	-	-
11	Kalt Ak Gr	14	-	-	1 µg	56	-	-
12	Kalt Ak Gr	14	-	-	1 µg	35	-	-
13	Kalt Ak Gr	14	-	-	1 µg	89	-	-
14	Kalt Ak Gr	14	-	-	1 µg	49	-	-
15	Kalt Ak Gr	14	-	-	1 µg	48	-	-
16	Kalt Ak Gr	21	-	-	1 µg	73	-	-
17	Kalt Ak Gr	21	-	-	1 µg	46	-	-
18	Kalt Ak Gr	21	-	-	1 µg	99	-	-
19	Kalt Ak Gr	7	-	-	1 µg	40	-	-
20	Kalt Ak Gr	7	-	-	1 µg	41	-	-
21	Th Gr 1	13	-	0,46 MBq	-	96	-	(gleich) 0
22	Th Gr 1	13	-	0,46 MBq	-	73	-	(verkleinert) -1
23	Th Gr 1	13	-	0,46 MBq	-	53	-	(vergrößert) 1
24	Th Gr 1	21	-	0,46 MBq	-	54	-	(gleich) 0
25	Th Gr 1	35	-	0,46 MBq	-	300	-	(negativ) -1
26	Th Gr 1	33	-	0,46 MBq	-	98	-	(vergrößert) 1

Fraktionierte lokoregionale Radioimmuntherapie mit ^{213}Bi -anti-EGFR-MAK

27	Th Gr 1	31	-	0,46 MBq	-	300	-	(negativ) -1
28	Th Gr 1	31	-	0,46 MBq	-	56	-	(negativ) -1
29	Th Gr 1	31	-	0,46 MBq	-	88	-	(negativ) -1
30	Th Gr 1a	21	-	0,46 MBq	-	38	-	(negativ) -1
31	Th Gr 1a	21	-	0,46 MBq	-	49	-	(negativ) -1
32	Th Gr 1a	14	-	0,46 MBq	-	51	-	(verkleinert) -1
33	Th Gr 1a	14	-	0,46 MBq	-	300	-	(negativ) -1
34	Th Gr 1a	14	-	0,46 MBq	-	38	-	(vergrößert) 1
35	Th Gr 1a	14	-	0,46 MBq	-	300	-	(negativ) -1
36	Th Gr 1a	14	-	0,46 MBq	-	300	-	(negativ) -1
37	Th Gr 1a	14	-	0,46 MBq	-	38	-	(negativ) -1
38	Th Gr 1a	21	-	0,46 MBq	-	42	-	(vergrößert) 1
39	Th Gr 1a	21	-	0,46 MBq	-	63	-	(vergrößert) 1
40	Th Gr 1a	14	-	0,46 MBq	-	300	-	(Gleich) 0
41	Th Gr 2	8	0,93 MBq	-	-	268	-	(negativ) -1
42	Th Gr 2	21	0,93 MBq	-	-	127	-	(negativ) -1
43	Th Gr 2	21	0,93 MBq	-	-	38	-	(Gleich) 0
44	Th Gr 2	21	0,93 MBq	-	-	268	-	(negativ) -1
45	Th Gr 2	21	0,93 MBq	-	-	289	-	(negativ) -1
46	Th Gr 2	14	0,93 MBq	-	-	59	-	(Gleich) 0
47	Th Gr 2	7	0,93 MBq	-	-	57	-	(Gleich) 0
48	Th Gr 2	43	0,93 MBq	-	-	63	-	(Gleich) 0
49	Th Gr 2	21	0,93 MBq	-	-	63	-	(Gleich) 0
50	Th Gr 2	14	0,93 MBq	-	-	85	-	(negativ) -1
51	Th Gr 2	41	0,93 MBq	-	-	280	-	(negativ) -1
52	Th Gr 2	7	0,93 MBq	-	-	55	-	(vergrößert) 1
53	Th Gr 2	41	0,93 MBq	-	-	58	-	(Verkleinert) -1
54	Th Gr 2	7	0,93 MBq	-	-	62	-	(Verkleinert) -1
55	Th Gr 2	21	0,93 MBq	-	-	139	-	(vergrößert) 1

Fraktionierte lokoregionale Radioimmuntherapie mit ^{213}Bi -anti-EGFR-MAK

56	Th Gr 2a	14	0,93 MBq	-	-	300	-	(negativ) -1
57	Th Gr 2a	21	0,93 MBq	-	-	58	-	(Verkleinert) -1
58	Th Gr 2a	14	0,93 MBq	-	-	49	-	(vergrößert) 1
59	Th Gr 2a	21	0,93 MBq	-	-	300	-	(negativ) -1
60	Th Gr 2a	21	0,93 MBq	-	-	300	-	(negativ) -1
61	Th Gr 2a	21	0,93 MBq	-	-	65	-	(negativ) -1
62	Th Gr 2a	14	0,93 MBq	-	-	46	-	(vergrößert) 1
63	Th Gr 2a	21	0,93 MBq	-	-	63	-	(negativ) -1
64	Th Gr 2a	14	0,93 MBq	-	-	300	-	(negativ) -1
65	Histo Gr 1	21	-	-	-	-	-	-
66	Histo Gr 1	7	-	-	-	-	-	-
67	Histo Gr 1	21	-	-	-	-	-	-
68	Histo Gr 1	21	-	-	-	-	-	-
69	Histo Gr 2	-		0,46 MBq -	-	-	>300	-
70	Histo Gr 2	-		0,46 MBq -	-	-	>300	-
71	Histo Gr 2	-		0,46 MBq -	-	-	>300	-
72	Histo Gr 2	-		0,46 MBq -	-	-	>300	-
73	Histo Gr 2	-		0,46 MBq -	-	-	>300	-
74	Tox Gr 1	-	1,85 MBq	-	-	-	81	-
75	Tox Gr 1	-	1,85 MBq	-	-	-	146	-
76	Tox Gr 1	-	1,85 MBq	-	-	-	146	-
77	Tox Gr 1	-	1,85 MBq	-	-	-	146	-
78	Tox Gr 1	-	1,85 MBq	-	-	-	146	-
79	Tox Gr 2	-	3,7 MBq	-	-	-	146	-
80	Tox Gr 2	-	3,7 MBq	-	-	-	146	-
81	Tox Gr 2	-	3,7 MBq	-	-	-	146	-
82	Tox Gr 2	-	3,7 MBq	-	-	-	146	-
83	Tox Gr 2	-	3,7 MBq	-	-	-	146	-

Zusammenfassung

Fraktionierte lokoregionale Radioimmuntherapie mit ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk

Die routinemäßig angewandten Therapien gegen humane Harnblasentumoren gehen immer noch mit schlechten Prognosen einher. Vorallem das Carcinoma in Situ rezidiert in 80 % der Fälle aufgrund der durch die Transurethrale Resektion freiflotierenden disseminierten Tumorzellen. Deshalb wurde ein orthotopes Harnblasenkarzinom-Mausmodell in fortgeschrittenem Stadium etabliert und die therapeutische Effizienz einer fraktionierten, intravesikalen Therapie mit dem α -Strahler ^{213}Bi , gekoppelt an einen anti-EGFR-MAk, welcher spezifisch an humane EJ 28 luc Harnblasenkarzinomzellen bindet evaluiert. Zusätzlich wurde die mögliche Toxizität des Radioimmunkonjugats für die physiologischen Urothelzellen bewertet.

Für die Bewertung des Erfolgs der Therapie wurden sechs Gruppen weiblicher Swiss nu/nu Mäuse intravesikal 2×10^6 EJ 28 luc Harnblasenkarzinomzellen instilliert, die stabil mit dem Firefly Luciferase Gen transfiziert waren. Den Tieren wurden zuvor unter Narkose mit einem Elektrokauter kleine urotheliale Läsionen gesetzt, an denen sich die Tumorzellen festsetzen konnten. Das Tumorwachstum wurde wöchentlich mittels Biolumineszenz Imaging kontrolliert. Sobald ein geringgradiges Signal im Biolumineszenz Imaging nachzuweisen war, wurde mit der Radioimmuntherapie begonnen (zwischen 14. und 36. Tag nach Zellinstillation). Zwei Gruppen erhielten jeweils drei Therapien mit 0,46 MBq ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk pro Behandlung im Abstand von 4 Tagen. Zwei Gruppen erhielten jeweils zwei Therapien mit 0,93 MBq ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk pro Behandlung im Abstand von 7 Tagen. Die fünfte Gruppe wurde mit dem unmarkierten Anti-EGFR-MAk (1 μg) therapiert und die sechste Gruppe diente als unbehandelte Kontrollgruppe. Das Tumorwachstum wurde mittels Biolumineszenz Imaging beobachtet. 15 Tiere wurden ohne vorangegangene Zellinstillation mitbehandelt und deren Urothelia bis zu 300 Tage nach Therapie auf Strahlenschäden überprüft. Das Überleben aller Tiere wurde 300 Tage beobachtet.

Die mittlere Überlebenszeit der nicht therapierten Kontrollgruppe betrug nach intravesikaler Zellinstillation 65 Tage. Die Mäuse, welche mit dem unmarkierten anti-EGFR-MAk behandelt wurden, erreichten ein mittleres Überleben von 57,5 Tagen. Die Therapiegruppen, welche mit 0,46 MBq des Radioimmunkonjugats behandelt worden waren überlebten im Mittel 124 bzw. 138 d, die mit 0,93 MBq behandelten Tiere 127 bzw. 165 d. Der log-rank Test ergab

einen signifikanten Unterschied im 95% Konfidenzintervall in der Überlebenszeit zwischen den Therapiegruppen und den mit dem unmarkierten Antikörper behandelten Tieren bzw. den Kontrolltieren ($p < 0,05$). 28 der 44 mit dem Radioimmunkonjugat behandelten Tiere zeigten 4 Tage nach der letzten Behandlung ein deutlich geringeres Biolumineszenzsignal als vor Therapiebeginn, während bei allen Tieren der Kontrollgruppe im gleichen Zeitintervall das Biolumineszenzsignal zugenommen hatte. Die Ergebnisse machen deutlich, dass die fraktionierte, lokoregionale α -Radioimmuntherapie mit ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk das Potential hat, bereits etablierte Harnblasenkarzinome zu eliminieren bzw. sie in ihrer Größe zu verringern. Die Urothelia der Tiere, die ohne vorangegangene Tumorzellinstillation behandelt wurden zeigten keine pathologischen Veränderungen, die auf einen Strahlenschaden schliessen lassen. Die fraktionierte Radioimmuntherapie ist deshalb eine vielversprechende Therapie bei fortgeschrittenen Harnblasentumoren.

Als weiteres Mausmodell für die Bewertung der Effizienz der lokoregionalen α -Radioimmuntherapie mit anti-EGFR-MAk wurde ein Modell der humanen Pleurakarzinose neu etabliert. Dazu wurde eine orthotope Xenotransplantation der humanen Lungenadenokarzinomzelllinie A549, die ebenfalls den EGFR exprimiert in den Pleuralspalt durchgeführt. Auf Höhe des Xiphoids wurde ein 5mm langer, transversaler Hautschnitt gesetzt und 1×10^6 bzw. 5×10^6 A549 Zellen durch einen Interkostalraum direkt in den Pleuralspalt injiziert. Insgesamt 20 Tiere dienten zur Ermittlung der Überlebenszeiten nach Zellinstillation.

Die Tiere zeigten im Mittel eine Überlebenszeit von 43 Tagen nach Zellinstillation. Bei der Sektion zeigte sich ein drüsiges Erscheinungsbild eines Adenokarzinoms mit Leukozyteninfiltrationen. Somit konnte ein weiteres Modell für die fraktionierte Radioimmuntherapie etabliert werden, das für Therapieversuche mit ^{213}Bi -anti-EGFR-MAk herangezogen werden kann.

Summary

Fractionated locoregional radioimmunotherapy with ^{213}Bi -anti-EGFR-MAB

Routine treatment for human bladder tumours is still insufficient in terms of therapies with better prognosis. Especially the high grade Carcinoma in Situ shows recurrence in 80 % of cases after transurethral resection due to disseminated tumour cells remaining at the surgery site. Therefore, an orthotopic mouse model carrying human bladder tumours in an advanced stage was established. The therapeutic efficacy of a fractionated intravesical treatment with ^{213}Bi -anti-EGFR-MAB specifically targeting EJ 28 luc bladder cancer cells, as well as its possible toxicity for the physiological urothelium were evaluated.

For the evaluation of the success of therapy of the bladder cancer-bearing mice six groups of female Swiss nu/nu mice were orthotopically instilled with 2×10^6 human bladder carcinoma cells, stably transfected with firefly-luciferase (EJ 28-luc). Animals were set small urothelial lesions beforehand by electrocautery under general anaesthesia. Tumour cells were able to adhere to these lesions. Tumour growth was monitored weekly via bioluminescence imaging. Radioimmunotherapy was initiated when tumours could be first detected via bioluminescence imaging (usually between day 14 and 36 after cell instillation). Two groups received three treatments each with 0.46 MBq of ^{213}Bi -anti-EGFR-MAB per treatment in a time interval of four days. Two groups received two treatments each with 0.93 MBq of ^{213}Bi -anti-EGFR-MAB per treatment in a time interval of seven days. Group five received the unlabelled anti-EGFR-MAB (1 μg) and group six remained untreated. Tumour development was monitored by bioluminescence imaging. 15 animals without previous tumour cell inoculation were included in the treatment and urothelia were histologically examined up to 300 d after therapy. Survival was observed up to 300 days.

The mean survival of the bladder tumour bearing mice of the group receiving no treatment was 65 days. The mice treated with the unlabelled anti-EGFR-MAB showed a mean survival of 57.5 days. Groups treated with 0.46 MBq of the radioimmunoconjugate survived 124 or 138 d, respectively, and groups receiving 0.93 MBq showed a mean survival of 127 or 165 d, respectively. According to the log-rank test there was a significant difference (95% CI) in mean survival between treatment groups and the group treated with the unlabelled anti-EGFR-MAB respectively the untreated group ($p < 0.05$). 28 of 44 animals treated with ^{213}Bi -anti-EGFR-MAB showed a lower bioluminescence signal 4 days after the last treatment com-

pared to treatment start, whereas all animals of the control group showed an increase of the bioluminescence signal within the same time interval. These results are in favour of a fractionated locoregional treatment with ^{213}Bi -anti-EGFR-MAb to eliminate or gradually reduce the size of advanced bladder tumours without systemic toxicity. The urothelia of the animals included in the treatments without prior tumour cell inoculation did not show any pathological findings indicating radiation injury. Thus, fractionated locoregional α -radioimmunotherapy with ^{213}Bi -anti-EGFR-MAb is a very promising approach for successful treatment of bladder carcinoma in an advanced stage.

Furthermore a mouse model with pleuracarcinosis was newly established as an additional model for evaluation of the efficacy of a locoregional α -radioimmunotherapy with ^{213}Bi -anti-EGFR-MAb. For the establishment of the pleuracarcinosis model, an orthotopic xenotransplantation of the human lung carcinoma cell line A549 also expressing EGFR, in the pleural space was conducted. At xiphoid level, a transversal skin incision was set and 1×10^6 or 5×10^6 A549 cells were injected through an intercostal space directly into the pleural space. 20 animals were used to determine the survival of the mice after cell inoculation.

The mice showed a mean survival of 43 days after cell inoculation. A remarkable tumour burden was found at necropsy. An adenous appearance with leucocyte infiltration was remarkable. The mouse model of human pleuracarcinosis was successfully established and can now be used for further evaluation of locoregional α -radioimmunotherapy.

Literaturverzeichnis

Agostini E. Mechanics of the pleural space. 1972. *Physiol Rev* 52(2): 57 – 128

American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2012. www.cancer.org (abgerufen am 21JAN12)

Andersson H, Cederkrantz E, Bäck T, Divgi C, Elgqvist J, Himmelmann J, Horvath G, Jacobsson L, Jensen H, Lindegren S, Palm S, Hultborn R. Intraperitoneal α -Particle Radioimmunotherapy of Ovarian Cancer Patients: Pharmacokinetics and Dosimetry of $^{211}\text{At-MX35F(ab')}_2$ – A Phase I Study. *J Nucl Med* 2009 Vol.50; 7:1153-1160

Andius P, Fehrling M, Holmäng S. Intravesical Bacillus Calmette-Guérin therapy: Experience with a reduced dwell time in patients with pronounced side effects. *BJU Int.* 2005; 96(9):1290-1293

Antony VB. Pathogenesis of malignant pleural effusions and talc Pleurodesis. 1999; *Pneumologie* 53(10): 493 – 498

Antony VB. Immunological mechanisms in pleural disease. 2003; *Eur Respir J* 21(3): 539 – 544

Antony VB, Nasreen N, Mohammed KA, Sriram PS, Frank W, Schönfeld N, Loddenkemper R. Talc Pleurodesis: basic fibroblast growth factor mediates pleural fibrosis. 2004; *Chest* 126(5): 1522 – 1528

Antunes G, Neville E, Duffy J, Ali N. BTS guidelines for the management of malignant pleural effusions. *Thorax* 58, 2003; (Suppl II):ii29 – ii38

Apostolidis C, Carlos-Marques R, Janssens W, Molinet R, Nikula T, Ouadi A. Cancer treatment using ^{213}Bi and ^{225}Ac in radioimmunotherapy. *Nuclear News* 2001; 29-33.

Apostolidis C, Molinet R, Rasmussen G, Morgenstern A. Production of ^{225}Ac from ^{229}Th for targeted alpha therapy. *Anal Chem* 2005; 77:6288-91.

Astoul P, Viallat JR, Laurent JC, Brandely M, Boutin C. Intrapleural

- recombinant IL-2 in passive immunotherapy for malignant pleural effusion. *Chest*, 1993; 103(1):209 – 213
- Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R, et al. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder. *Eur Urol*. 2008; 54(2):303-314
- Badalment RA, Ortolano V, Burgers JK. Recurrent or aggressive bladder cancer: indications for adjuvant intravesical therapy. *Urol Clin North Am* 1992; 19:485-498
- Ballangrud AM, Yang WH, Palm S, Enmon R, Borchardt PE, Pellegrini VA, McDevitt MR, Scheinberg DA, Sgouros G. Alpha-particle emitting atomic generator (^{225}Ac)-labeled trastuzumab (herceptin) targeting of breast cancer spheroids: efficacy versus HER2/neu expression. *Clin Cancer Res* 2004; 10:4489-97.
- Barbetakis N, Antoniadis T, Tsilikas C. Results of chemical Pleurodesis with mitoxantrone in malignant pleural effusion from breast cancer. *World J Surg* 2004; 2:16
- Beck R, Seidl C, Pfof B, Morgenstern A, Bruchertseifer F, Baum H, Schwaiger M, Senekowitsch-Schmidtke R. ^{213}Bi -radioimmunotherapy defeats early stage disseminated gastric cancer in nude mice. *Cancer Sci* 2007; 98(8): 1215-22.
- Bellmunt J, Hussain M, Dinney CP. Novel approaches with targeted therapies in bladder cancer. Therapy of bladder cancer by blockage of the epidermal growth factor receptor family. *Crit Rev Oncol Hematol* 2003; 46 (Suppl.1):85-104.
- Bennet R, Maskell N. Management of malignant pleural effusions. *Curr Opin Pulm Med* 2005; 11(4): 296 – 300
- Bethge WA, Wilbur DS, Sandmaier BM. Radioimmunotherapy as non-myeloablative conditioning for allogeneic marrow transplantation. *Leuk Lymphoma* 2006; 47:1205-14
- Bloechl S, Beck R, Seidl C, Morgenstern A, Schwaiger M, Senekowitsch-Schmidtke R. Fractionated locoregional low-dose radioimmunotherapy improves survival in a mouse model of diffuse-type gastric cancer using a ^{213}Bi -conjugated monoclonal

- antibody. *Clin Cancer Res* 2005; 11:7070S-7074S.
- Boll RA, Malkemus D, Mirzadeh S. Production of ^{225}Ac for alpha particle mediated radioimmunotherapy. *Appl Radiat Isot.* 2005; 62(5):667-79.
- Brechbiel MW, Gansow OA. Backbone-substituted DTPA ligands for ^{90}Y radioimmunotherapy. *Bioconjug Chem.* 1991; 2(3):187-94
- Brechbiel MW, Gansow OA. Synthesis of C-functionalized Trans-cyclohexyldiethylenetriaminepenta-acetic acids for labeling of monoclonal antibodies with the bismuth-212 alpha-particle emitter. *J Chem Soc Perkin Trans.* 1992; 1:1173-1178
- Brunner A, Prelog M, Verdorfer I, Tzankov A, Mikuz G, Ensinger C. EpCAM is predominantly expressed in high grade and advanced stage urothelial carcinomas of the bladder. *J Clin Pathol.* 2008; 61(3):307-10.
- Buchhorn HM, Seidl C, Beck R, Saur D, Apostolidis C, Morgenstern A, Schwaiger M, Senekowitsch-Schmidtke R. Non-invasive visualization of the development of peritoneal carcinomatosis and tumour regression after ^{213}Bi -radioimmunotherapy using bioluminescence imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2007; 34(6):841-9.
- Burch JD, Rohan TE, Howe GR, Risch HA, Hill GB, Steele R, Miller AB. Risk of bladder cancer by source and type of Tobacco exposure: a case-control study. *Int J Cancer.* 1989; 44(4):622-628
- Camera L, Kinuya S, Garmestani K, Wu C, Brechbiel MW, Pai LH, McMurry TJ, Gansow OA, Pastan I, Paik CH, et al. Evaluation of the serum stability and in vivo biodistribution of CHX-DTPA and other ligands for yttrium labeling of monoclonal antibodies. *J Nucl Med.* 1994; 35:882-9
- Caron PC, Jurcic JG, Scott AM, Finn RD, Divgi CR, Graham MC, Jureidini IM, Sgouros G, Tyson D, Old LJ, et al. A phase IB trial of humanized monoclonal antibody M195 (anti-CD33) in myeloid leukemia: specific targeting without immunogenicity. *Blood.* 1994; 83:1760-1768

- Chang GC, Lan HC, Juang SH, Wu YC, Lee HC, Hung YM, Yang HY, Whang-Peng J, Liu KJ. A pilot clinical trial of vaccination with dendritic cells pulsed with autologous tumor cells derived from malignant pleural effusion in patients with late-stage lung carcinoma. *Cancer*, 2005; 103(4):763– 771
- Chen H, Brahmer J. Management of malignant pleural effusion. *Curr Oncol Rep*, 2008; 10(4): 287 – 293
- Cheng J, Huang H, Zhang ZT, Shapiro E, Pellicer A, Sun TT, Wu XR. Overexpression of epidermal growth factor receptor in urothelium elicits urothelial hyperplasia and promotes bladder tumour growth. *Cancer Res* 2002; 62:4157-4163
- Chiong E, Esuveranathan K. New therapies for non-muscle-invasive bladder cancer. *World J Urol* 2009, 28(1):71-80
- Cohen SM, Johannson SI. Epidemiology and etiology of bladder cancer. *Urol Clin North Am*, 1992; 19:421-428
- Couturier O, Supiot S, Degraef-Mougin M, Faivre-Chauvet A, Carlier T, Chatal JF, Davodeau F, Cherel M. Cancer radioimmunotherapy with alpha-emitting nuclides. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2005; 32:601-14.
- Davis HE, Lee YC, Davies RJ. Pleurodesis for malignant pleural effusion: talc, toxicity and where next? *Thorax*, 2008; 63: 572 – 574
- De Boer WI, Schuller AG, Vermey M, van der Kwast TH. Expression of growth factors and receptors during specific phases in regenerating urothelium after acute injury *in vivo*. *Am. J. Pathol.*, 1994; 145: 1199–1207
- Drecoll E, Gaertner F, Miederer M, Blechert B, Vallon M, Müller J, Alke A, Seidl C, Bruchertseifer F, Morgenstern A, Senekowitsch-Schmidtke R, Essler E. Treatment of Peritoneal Carcinomatosis by Targeted Delivery of the Radio-Labelled Tumor Homing Peptide ^{213}Bi -DTPA-[F3]₂ into the nucleus of tumour Cells. *PLoS ONE*. 2009;4(5):e5715
- Duncan RE, Bennet DW, Evans AT, Arow BS, Schellhas R. Radiation induced bladder tumor. *J Urol*, 1977; 118: 43-45

Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al., eds. AJCC Cancer Staging Manual. 7th edition
New York, NY: Springer; 2010: 291-8

Ehrlich P. The collected Papers of Paul Ehrlich. Vol. 3, 1960; 59, Pergamon, London

Elgqvist J, Bernhardt P, Hultborn R, Jensen H, Karlsson B, Lindegren S,

Warnhammar E, Jacobsson L. Myelotoxicity and RBE of ^{211}At -

conjugated monoclonal antibodies compared with $^{99\text{mTc}}$ -conjugated

monoclonal antibodies and ^{60}Co irradiation in nude mice. *J Nucl Med* 2005; 46:464

471

Elgqvist J, Andersson H, Bäck T, Claesson I, Hultborn R, Jensen H, Lindegren S, Olsson M,

Palm S, Warnhammar E, Jacobsson L. Fractionated Radioimmunotherapy of intra-

peritoneally growing ovarian cancer in nude mice with ^{211}At -MX35F(ab')₂:

therapeutic efficacy and myelotoxicity. *Nuclear Medicine and Biology* 2006, Vol 33,

Issue 8: 1065-1072

Elgqvist J, Andersson H, Bäck T, Claesson I, Hultborn R, Jensen H, Johannson BR,

Lindegren S, Olsson M, Palm S, Warnhammar E, Jacobsson L. Alpha-radioimmuno-

therapy of intraperitoneally growing OVCAR-3 tumors of variable dimensions:

Outcome related to measured tumor size and mean absorbed dose. *J Nucl Med* 2006;

47:1342-50.

Elenbaas B, Spirio L, Koerner F, Fleming MD, Zimonjic DB, Donaher JL, Popescu

NC, Hahn WC, Weinberg RA. Human breast cancer cells generated by

oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes Dev.* 2001;

1;15(1): 50-65.

Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK. The World Health Organisation/International

Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional

cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder consensus Conference Committee. *Am*

J Surg Pathol. 1998; 22(12):1435-1448

Fairchild WV, Spence CR, Solomon HD, Gangai MP. The incidence of bladder

cancer after cyclophosphamide therapy. *J Urol,* 1979; 122: 163-167

- Fischer K. Experimentelle Studien zur lokoregionalen Radioimmuntherapie disseminierter Tumorausbreitung am Beispiel des diffusen Magenkarzinoms mit einem tumorspezifischen, an den α -Emitter ^{213}Bi gekoppelten Antikörper. Diss. Tierärztliche Fakultät LMU München. 2001.
- Flecknell PA. Guide to Techniques in Mouse Development (eds PM Wassarman and ML DePamphilis). Meth. Enzymol. 1993; 225,16-33
- Fleshner N, Garland J, Moadel A, Herr H, Ostroff J, Trambert R, O Sullivan M, Russo P. Influence of smoking status on the disease-related outcomes of patients with tobacco-associated superficial transitional cell carcinoma of the bladder. Cancer. 1999; 86(11):2337-2345
- Fujimoto K, Tanaka Y, Rademaker A, Oyasu R. Epidermal growth factor responsive and -refractory carcinomas initiated with *N*-methyl-*N*-nitrosourea in Rat urinary bladder. Cancer Res., 1996; 56: 2666–2670
- Günther JH, Jurczok A, Wulf T, Brandau S, Deinert I, Jocham D, Böhle A. Optimizing syngeneic orthotopic murine bladder cancer (MB49). Cancer Res 1999; 59(12):2834-2837.
- Hadaschik BA, Black PC, Sea JC, Metvalli AR, Fazli L, Dinney CP, Gleave ME, So AI. A validated mouse model for orthotopic bladder cancer using transurethral tumour inoculation and bioluminescence imaging. BJU Int 2007; 100:1377-84.
- Hall MC, Chang SS, Dalbagni G, Pruthi RS, Seigne JD, Skinner EC, Wolf JS Jr, Schellhammer PF. Guideline for the management of non-Muscleinvasive bladder cancer (Stages Ta T1 and Tis): 2007 update. J Urol 2007; 178(6):2314-2330
- Hautmann RE, De Petriconi R, Gottfried HW, Kleinschmidt K, Mattes R, Paiss T. The ileal neobladder: complications and functional results in 363 patients after 11 years of follow up. J Urol, 1999; 161:422
- Hazra A, Gu J, Wu X. Genetic susceptibility to bladder cancer. In: Lerner SP, Schoenberg MP, Sternberg CN, eds. Textbook of bladder cancer. Oxford: Taylor and Francis; 2006: 2-36

- He F, Mo L, Zheng XY, Hu C, Lepor H, Lee EY-HP, Sun TT, Wu XR. Deficiency of pRb family proteins and p53 in invasive urothelial tumorigenesis. *Cancer Res*, 2009; 69; 9413
- Heffner JE, Klein JS. Recent advances in the diagnosis and management of malignant pleural effusion. *Mayo Clin Proc* 2008; 83(2): 235 – 250
- Heney NM, Ahmed S, Flanagan MJ et al. Superficial bladder cancer: progression and recurrence. *J Urol*. 1983; 130(6):1083-1086.
- Huber R. Bewertung der lokoregionalen Radioimmuntherapie disseminierter Tumorzellen des diffusen Magenkarzinoms mit einem ^{213}Bi gekoppelten tumorspezifischen Antikörper im Mausmodell. Diss Tierärztliche Fakultät LMU München. 2003.
- Huber R, Seidl C, Schmid E, Seidenschwang S, Becker KF, Schuhmacher C, Apostolidis C, Nikula T, Kremmer E, Schwaiger M, Senekowitsch-Schmidtke R. Locoregional alpha-radioimmunotherapy of intraperitoneal tumor cell dissemination using a tumor-specific monoclonal antibody. *Clin Cancer Res* 2003; 9(Pt.2): 3922S-3928S.
- Hughes OD, Bishop MC, Perkins AC, Wastie ML, Denton G, Price MR, Frier M, Denley H, Rutherford R, Schubiger PA. Targeting superficial bladder cancer by the intravesical administration of copper-67-labeled anti-MUC1 mucin monoclonal antibody C595. *J Clin Oncol* 2000; 18:363-70.
- Hultborn R, Andersson H, Bäck T, Divgi C, Elgqvist J, Himmelmann J, Horvath G, Jensen H, Lindegren S, Palm S, Jacobsson L. Pharmacokinetics and dosimetry of ^{211}At -MX35 F(ab')₂ in therapy of ovarian cancer – preliminary results from an ongoing phase I study. (Abstract). *Cancer Biother Radiopharm* 2006; 21: 373-81.
- Humm JL. A microdosimetric model of astatine-211 labeled antibodies for radioimmunotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1987; 13:1767-73.
- Huneke RB, Pippin CG, Squire RA, Brechbiel MW, Gansow OA, Strand M. Effective

- alpha-particle-mediated radioimmunotherapy of murine leukemia. *Cancer Res.* 1992; 52:5818-20.
- Hussain S, Plückerthun A, Allen TM, Zangemeister-Wittke U. Antitumor activity of an epithelial cell adhesion molecule-targeted nanovesicular drug delivery system. *Mol Cancer Ther* 2007; 6(11):3019-27.
- International Bladder Cancer Nomogram Consortium, Bochner BH, Kattan MW, Vora KC. Postoperative nomogram predicting risk of recurrence after radical cystectomy for bladder cancer. *J Clin Oncol.* 2006; 24(24):3967-3972
- Iyer M, Berenji M, Templeton NS, Gambhir SS. Noninvasive imaging of cationic lipid-mediated delivery of optical and PET reporter genes in living mice. *Mol Ther.* 2002; 6:555-62.
- Jemal A, Ward E, Hao Y, Thun M. Trends in the leading causes of death in the United States, 1970-2002. *JAMA.* 2005; 294(10):1255-1259.
- Jimenez VK, Marshall FF: Surgery of bladder cancer. In: Walsh et al (eds) 2002 *Campbell's Urology* 8th ed: pp 2819-44
- Junghans RP, Dobbs D, Brechbiel MW, Mirzadeh S, Raubitschek AA, Gansow OA, Waldmann TA. Pharmacokinetics and bioactivity of 1,4,7,10-tetra-azacyclododecane off',N'',N''''-tetraacetic acid (DOTA)-bismuth-conjugated anti-Tac antibody for alpha-emitter (Bi-212) therapy. *Cancer Res.* 1993; 53:5683-5689.
- Jurcic JG. Immunotherapy for acute myeloid leukemia. *Curr Oncol Rep* 2005; 7:339-46
- Jurczok A, Fornara P, Söling A. Bioluminescence imaging to monitor bladder cancer cell adhesion in vivo: a new approach to optimize a syngeneic, orthotopic, murine bladder cancer model. *BJU Int.* 2008;101(1):120-4.
- Kemper M. Krankheitsverlauf bei jungen Patienten mit einem Harnblasenkarzinom – eine retrospektive Vergleichsstudie. Dissertation, LMU München: Medizinische Fakultät, 2007.
- Kennel SJ, Stabin M, Yoriyaz H, Brechbiel M, Mirzadeh S. Treatment of lung tumor colonies with ⁹⁰Y targeted to blood vessels: comparison with the alpha-particle

- emitter²¹³Bi. Nucl Med Biol. 1999; 26;1:149-57.
- Kobayashi H, Wu C, Yoo TM, Sun BF, Drumm D, Pastan I, Paik CH, Gansow OA, Carrasquillo JA, Brechbiel MW. Evaluation of the in vivo biodistribution of yttrium-labeled isomers of CHX-DTPA-conjugated monoclonal antibodies. J Nucl Med. 1998; 39;829-36.
- Kojro E. Untersuchungen zum Expressionsmuster von HSP27 und phospho-HSP27 in SK-N-MC Zellen nach unterschiedlichen Stressinduktionen anhand von 2D-Gelelektrophorese. Biochemisches Praktikum, Februar 2012, Universität Mainz
- Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 1975; 256:495-497.
- Kollmannsberger C, Schittenhelm M, Honecker F, Tillner J, Weber D, Oechsle K, Kanz L, Bokemeyer C. A phase I study of the humanized monoclonal anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody EMD 72000 (matuzumab) in combination with paclitaxel in patients with EGFR-positive advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC). Ann Oncol 2006; 17:1007-13.
- Krämer K. Hemmung der humanen Telomerase Reverse Transkriptase-Expression mittels synthetischer Nukleinsäuren in Harnblasenkarzinomzellen. Diss. Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Dresden, 2005.
- Lai-Fook SJ. Pleural mechanics and fluid exchange. Physiol Rev 2004; 84(2): 385 – 410
- Lamm D, Riggs D, Traynelis C, Nseyo U. Apparent failure of current intravesical chemotherapy prophylaxis to influence the long-term course of superficial transitional cell carcinoma of the bladder. J Urol 1995; 153:1444 – 1450
- Lamm DL, McGee WR, Hale K. Bladder cancer: current optimal intravesical Treatment. Urol Nurs. 2005; 25(5):323-326, 331-332.
- Langmuir VK, Atcher RW, Hines JJ, Brechbiel MW. ¹²⁵I-NRLU-10 kinetic studies and ²¹²Bi NRLU-10 toxicity in LS174T multicell spheroids. J Nucl Med, 1990; 31(9): 1527-33.
- Laskin JJ and Sandler AB. Epidermal growth factor receptor: A promising target in solid

- tumours. *Cancer Treat Rev* 2004; 30(1):1-17
- Lee YC, Light RW. Management of malignant pleural effusion. *Respirology*, 2004; 9(2): 148 – 156
- Lerner SP, Skinner E, Skinner DG. Radical cystectomy in regionally advanced bladder cancer. *Urol Clin North Am*, 1992; 19: 713-723
- Linn JF, Sesterhenn I, Mostofi FK. The molecular characteristics of bladder cancer in young patients. *J.Urol.* 1998;159(5):1493-1456
- Lissoni P, Mandalá M, Curigliano G, Ferretti G, Moro C, Ardizzoia A, Malugani F, Tancini G, Tisi E, Arrigoni C, Barni S. Progress report on the palliative therapy of 100 patients with neoplastic effusions by intracavitary low-dose Interleukin-2. *Oncology*, 2001; 60: 308 – 312
- Lloyd EL, Gemmell MA, Henning CB, Gemmell DS, Zabransky BJ. Cell survival following multiple-track alpha particle irradiation. *Int J Rad Biol & Related Studies in Physics, Chemistry & Medicine* 1979; 35:23-31.
- Loddenkemper R. Pleuraerkrankungen. *Pneumologe*, 2008; 5: 209 – 210
- Lynch CF, Cohen MB. Urinary System. *Cancer*. 1995; 75(1 suppl): 316-329
- Lynch TJ. Management of malignant pleural effusion. *Chest* 1993; 103: 385 – 389
- Macklis RM, Lin JY, Beresford B, Atcher RW, Hines JJ, Humm JL. Cellular kinetics, dosimetry and radiobiology of alpha-particle radioimmunotherapy: induction of apoptosis. *Radiat Res.* 1992; 130:220-26.
- Matsumoto S, Tanaka F, Sato K, Kimura S, Maekawa T, Hasegawa S, Wada H. Monitoring with non-invasive bioluminescent in vivo imaging system of pleural metastasis of lung carcinoma. *Lung Cancer*, 2009; 66: 75-79
- Manegold C. Therapie von Pleura- und Lungenmetastasen bei Tumorerkrankungen ohne bekannten Primärtumor. *Der Onkologe*, 1997; 3:375-379
- Mc Devitt MR, Barendsward E, Ma D, Lai L, Curcio MJ, Sgouros G, Ballangrud AM, Yang WH, Finn RD, Pellegrini V, Geerlings MW, Lee M, Brechbiel MW, Bander NH, Cordon-Cardo C, Scheinberg DA. An alpha-particle emitting antibody ($[^{213}\text{Bi}]J591$)

- for radioimmunotherapy of prostate cancer. *Cancer Res* 2000; 60:6095-100.
- McDevitt MR, Sgouros G, Finn RD, Humm JL, Jurcic JG, Larson SM, Scheinberg DA. Radioimmunotherapy with alpha-emitting nuclides. *Eur J Nucl Med* 1998; 25:1341-1351.
- Messing EM. Clinical implications of the expression of epidermal growth factor receptors in human transitional cell carcinoma. *Cancer Res.*, 1990; 50: 2530–2537
- Messing EM, Murphy-Brooks N. Recovery of epidermal growth factor in voided urine of patients with bladder cancer. *Urology*, 1994; 44: 502–506
- Milenic DE, Roselli M, Mirzadeh S, Pippin CG, Gansow OA, Colcher D, Brechbiel MW, Schlom J. In vivo evaluation of bismuth-labeled monoclonal antibody comparing DTPA-derived bifunctional chelates. *Cancer Biother Radiopharm.* 2001;16(2):133-46.
- Millán-Rodríguez F, Chéchile-Toniolo G, Salvador-Bayarri J, Palou J, Algaba F, Vicente-Rodríguez J. Primary superficial bladder cancer risk groups according to progression, mortality and recurrence. *J Urol.* 2000;164(3 Pt 1): 680-684
- Mirzadeh S, Kennel SJ. Optimizations of radiolabeling of immunoproteins with ²¹³Bi. *Radiochimica Acta*, 1997; 79: 145-149
- Mostofi FK, Sobin LH, Tosoni I. Histological typing of urinary bladder tumours. International classification of tumours, No 19. 1973; World Health Organisation, Geneva
- Mostofi FJ, Davis CJ, Sesterhenn IA, et al. Histological typing of urinary bladder tumours. In: World Health Organisation international histological classification of tumours. Springer, Berlin, 1999; 1-103
- Murray A, Simms MS, Scholfield DP, Vincent RM, Denton G, Bishop MC, Price MR, Perkins AC. Production and characterization of ¹⁸⁸Re-C595 antibody for radioimmunotherapy of transitional cell bladder cancer. *J Nucl Med* 2001; 42:726-32.
- Neragi – Miandoab S. Surgical and other invasive approaches to recurrent pleural effusion with malignant etiology. *Support Care Cancer.* 2008;

16(12):1323-31.

- Nikula TK, McDevitt MR, Finn RD, Wu C, Kozak RW, Garmestani K, Brechbiel MW, Curcio MJ, Pippin CG, Tiffany-Jones L, Geerlings MW Sr, Apostolidis C, Molinet R, Geerlings MW Jr, Gansow OA, Scheinberg DA. Alpha-emitting bismuth cyclohexyl DTPA constructs of recombinant humanized anti-CD33 antibodies: pharmacokinetics, bioactivity, toxicity and chemistry. *J Nucl Med.* 1999; 40:166-76.
- Oosterlinck W, Lobel B, Jakse G, Malmström PU, Stöckle M, Sternberg C:
The EAU Working Group on Oncological Urology: Guidelines on Bladder Cancer, 2002, *Eur Urol* 41: 105 – 112
- Oosterlinck W, Jakse G, Malmström PU, Stöckle M, Sternberg C, Neal D, Calais Da Silva F. Guidelines on bladder cancer, European Association of Urology, 2000
- Osteen RT, Kopf G, Wilson RF. In pursuit of the unknown primary. *Am J Surg*, 1978; 135:494 – 498
- Pagano F, Bassi P, Galetti TP, Meneghini A, Artibani W, Garbeglio A: Results of Contemporary radical cystectomy for invasive bladder cancer: A clinicopathological study with an emphasis on the inadequacy of the tumor, nodes and metastases classification, *J Urol*, 1991; 14: 45 – 50
- Petrich T, Quintanilla-Martinez L, Korkmaz Z, Samson E, Helmeke H, Meyer G, Knapp W, Pötter E. Effective Cancer Therapy with the α -particle-emitter ^{211}At In a Mouse Model of Genetically Modified Sodium/Iodide Symporter-Expressing Tumours. *Clin Cancer Res* 2006;12(4):1342-1348
- Pfost B, Seidl C, Autenrieth M, Saur D, Bruchertseifer F, Morgenstern A, Schwaiger M, Senekowitsch-Schmidtke R. Intravesical α -Radioimmuntherapie with ^{213}Bi -Anti-EGFR-Mab defeats human bladder carcinoma in Xenografted nude mice. *J Nucl Med* 2009;50:1700-1708
- Pfost B. Etablierung des humanen Harnblasenkarzinoms im orthotopen Mausmodell zur Bewertung der intravesikalen Radioimmuntherapie mit einem ^{213}Bi markierten

monoklonalen anti-EGFR-Antikörper. Dissertation Tierärztliche

Fakultät LMU München, 2009

Poppas DB, Pavlovic CP, Folkman J, Voest EE, Chen X, Luster AD, O'Donnell MA.

Intravesical Bacille Calmette-Guérin Induces the antiangiogenic chemokine
interferon-inducible protein 10. *Urology*. 1998; 52(2):268-275; discussion 275-276

Qu CF, Song EY, Li Y, Rizvi SM, Raja C, Smith R, Morgenstern A, Apostolidis C,

Allen BJ. Pre-clinical study of ^{213}Bi labeled PAI2 for the control of micro-metastatic
pancreatic cancer. *Clin Exp Metastasis* 2005; 22:575-86.

Raja C, Graham P, Abbas Rizvi SM, Song E, Goldsmith H, Thompson J, Bosserhoff

A, Morgenstern A, Apostolidis C, Kearsley J, Reisfeld R, Allen BJ. Interim
Analysis of Toxicity and Response in Phase 1 Trial of Systemic Targeted Alpha
Therapy for Metastatic Melanoma. *Cancer Biol Ther* 2007; 6(6):846-52.

Reghavan D, Shipley WU, Garnick MB, Russel PJ, Richie JP. Biology and

management of bladder cancer. *N Eng J Med*,1990; 322: 1129-1138

Rizvi S, Qu CF, Song JY Raja C, Allen BJ. In vivo studies of pharmacokinetics and

efficacy of ^{213}Bi labeled antimelanoma monoclonal antibody 9.2.27.

Cancer Biol Ther 2005; 4:763-8.

Rizvi S, Li Y, Song E, Qu CF, Raja C, Morgenstern A, Apostolidis C, Allen BJ. Preclinical

studies of bismuth-213 labeled plasminogen activator inhibitor type 2 (PAI2) in a
prostate cancer nude mouse xenograft model. *Cancer Biol Ther*. 2006;5:386-93.

Rodriguez – Panadero F, Janssen JP, Astoul P. Thoracoscopy: general

overview and place in the diagnosis and management of pleural effusion. *Eur
Respir J*, 2006; 28(2): 409 – 422

Rodriguez-Panadero F, Antony VB. Pleurodesis: State of the art. *Eur Respir J*, 1997;

10: 1648 – 1654

Ross GM. Induction of cell death by Radiotherapy. *Endocrine related cancer*, 1999; 6

41-44

Rotterud R, Nesland JM, Berner A, Fossa SD. Expression of the epidermal growth

- factor receptor family in normal and malignant urothelium. *BJU Int* 2005;95: 1344-50
- Rübben H, Otto T. Harnblasenkarzinom. In: H. Rübben (ed) *Uroonkologie*. 2001. Springer, Berlin, Heidelberg, S. 85 – 168
- Russel W, Burch R. *The Principles of Humane Experimental Technique*. London, 1959; Methuen, especially 69-154.
- Sahn SA. Malignant pleural effusions. *Semin Respir Crit Care Med*, 2001; 22(6): 607 – 616
- Saleh-Birjandi R. Klinische Relevanz von p53-Protein als Prognosemarker bei urothelialen Karzinomen der ableitenden Harnwege: Retroprospektive Untersuchung an Patienten mit Urothelkarzinom. Dissertation, LMU München: Medizinische Fakultät, 2007.
- Sato A, Klaunberg B, Tolwani R. In Vivo Bioluminescence Imaging. *Comparative Medicine*, 2004, Vol 54, No 6:631-634
- Scatchard G: The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann. Ny Acad. Sci.* 51, 1949; 660 - 672.
- Scheinberg DA, Lowett J, Divgi CD, Graham MC, Berman E, Pentlow K, Feirt N, Finn RD, Clarkson BD, Gee TS, et al. A phase I trial of monoclonal antibody M195 in acute myelogenous leukemia: specific bone marrow targeting and internalization of radionuclide. *J Clin Oncol.*1991 ;9:478-483.
- Seiden MV, Burris HA, Matulonis U, Hall JB, Armstrong DK, Speyer J, Weber JD, Muggia F. A phase II trial of EMD72000 (matuzumab), a humanized anti-EGFR monoclonal antibody, in patients with platinum resistant ovarian and primary peritoneal malignancies. *Gynecol Oncol* 2007; 104:727-31.
- Seidl C, Schröck H, Seidenschwang S, Beck R, Schmid E, Abend M, Becker KF, Apostolidis C, Nikula TK, Kremmer E, Schwaiger M, Senekowitsch-Schmidtke R. Cell death triggered by alpha-emitting ²¹³Bi-immunoconjugates in HSC45-M2 gastric cancer cells is different from apoptotic cell death. *Eur J Nucl Med*

- Mol Imaging 2005; 32:274-85.
- Seidl C, Senekowitsch-Schmidtke R. Targeted Radionuclid Therapy with α -Emitters – Basic Principles, Experimental Studies and Initial Clinical Trials. Der Nuklear-Mediziner 2008; 31:81-92
- Seitz M, Zaak D, Knüchel-Clarke R, Stief C. Harnblasentumoren, Die neue WHO-Klassifikation 2004. Urologe 2005; 44:1073-1086
- Sexton W, Wiegand LR, Correa JJ, Politis C, Dickinson SI, Kang LC: Bladder cancer: A review of non-muscle invasive Disease. Cancer Control, 2009; Vol.17, No. 4: 256-268
- Skinner DG, Daniels JR, Russel CA, Lieskovsky G, Boyd SD, Nochols P, Kern W, Krailo M, Groshen S. The role of adjuvant Chemotherapy following cystectomy for invasive bladder cancer: a prospective comparative trial. J Urol, 1991; 145:459 – 467
- Sökeland J. Harnblasentumoren. In: Sökeland J: Urologie , 11, Neubearbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag, New York: 236, 1993
- Soloway MS, Sofer M, Vaidya A. Contemporary Management of stage T1 transitional cell carcinoma of the bladder. J Urol 2002; 167: 1573-83
- Song E, Qu C, Rizvi S, Raja C, Beretov J, Morgenstern A, Apostolidis C, Bruchertseifer F, Perkins A, Allen B. Bismuth-213 radioimmunotherapy with C595 anti-MUC1 monoclonal antibody in an ovarian cancer ascites model. Cancer Biol Ther. 2008; 7(1):76-80
- Song H, Shahverdi K, Huso D, Esaias C, Fox J, Liedy A, Zhang Z, Todd Reilly R, Apostolidis C, Morgenstern A, Sgouros G. ^{213}Bi (α -emitter)-Antibody Targeting of Breast Cancer Metastasis in the *neu*-N Transgenic Mouse Model. Cancer Res. 2008 May 15;68(10):3873-3880.
- Stadler WM. Molecular events in the initiation and progression of bladder cancer. Int J Onkol, 1993 ; 3: 549-557
- Stathopoulos T, Zhu Z, Everhart M, Kalomenidis I, Lawson W, Bilaceroglu S, Peterson T,

- Mitchell D, Yull F, Light R, Blackwell T: Nuclear factor-kappaB affects tumor progression in a mouse model of malignant pleural effusion. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006; 34(2):142-50.
- Steger V, Mika U, Toomes H, Walker T, Engel C, Kyriss T, Ziemer G, Friedel G. Who gains most? A ten year experience with 611 thoracoscopic talc pleurodeses. *Ann Thorac Surg*, 2007; 83: 1940 – 1945
- Sterman DH, Recio A, Carroll RG. A phase I clinical trial of single-dose intrapleural IFN-beta gene transfer for malignant pleural mesothelioma and metastatic pleural effusions: high rate of antitumor immune responses. *Clin Cancer Res*, 2007; 13: 4456 – 4466
- Stewart JF, Tattersall MWN, Woods RL, Fox RM. Unknown primary adenocarcinoma: incidence of over-investigation and natural history. *Br med J*, 1979; 1: 1530 – 1533
- Sylvester RJ, van der Meijden AP, Oosterlinck W, Witjes JA, Bouffouix C, Denis L, Newling DW, Kurth K. Predicting recurrence and Progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC Trials. *Eur Urol.* 2006; 49(3):465-466; discussion 475-477.
- Sylvester RJ, Oosterlinck W, van der Meijden AP. A single immediate postoperative instillation of chemotherapy decreases the risk of recurrence in patients with Stage Ta T1 bladder cancer: a meta-analyses of published results of Randomized clinical trials. *J Urol* 2004;171(6 pt 1):2186-2190
- Sylvester RJ, van der Meijden AP, Lamm DL. Intravesical Bacillus Calmette-Guérin Reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: a meta-analyses of the published results of randomized clinical trials. *J Urol.* 2002;168(5): 1964-1970
- Tan C, Sedrakyan A, Browne J, Swift S, Treasure T. The evidence on the effectiveness of management for malignant pleural effusion: a systematic review. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2006; 29(5): 829 – 838

- Vanhoefer U, Tewes M, Rojo F, Dirsch O, Schleucher N, Rosen O, Tillner J, Kovar A, Braun AH, Trabach T, Seeber S, Harstrick A, Baselga J. Phase I study of the humanized antiepidermal growth factor receptor monoclonal antibody EMD 72000 in patients with advanced solid tumors that express the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol*. 2004 Jan 1;22(1):175-84.
- Vlaovic P, Jewett MA. Cyclophosphamide-induced bladder cancer. *Can J Urol*. 1999; 6(2):745-748.
- Walker-Renard PB, Vaughan LM, Sahn SA. Chemical pleurodesis for malignant pleural effusion. *Ann Intern Med*, 1994, 120(1): 56 – 64
- Willis RA. Secondary tumors of the lung. The spread of tumors in the human body. Butterworths, London, 1973; pp 167 – 174
- Witjes JA. Management of BCG failures in superficial bladder cancer: a review. *Eur Urol*, 2006; 49(5):790 – 797
- Xue-Ru Wu. Biology of urothelial tumorigenesis: insights from genetically engineered mice. *Cancer Metastasis Rev*, 2009, 28:281–290
- Yildirim H, Metintas M, Ak G, Metintas S, Erginel S. Predictors of talc pleurodesis outcome in patients with malignant pleural effusions. *Lung Cancer*, 2008; 62: 129 – 144
- Yoshida K, Sugiura T, Takifuji N, Kawahara M, Matsui K, Kudoh S, Takada M, Fukuoka M, Ariyoshi Y, Fukuda H, Saijo N. Randomized phase II trial of three intrapleural therapy regimens for the management of malignant pleural effusion in previously untreated non-small cell lung cancer: JCOG 9515. *Lung Cancer*, 2007; 58(3): 362 – 368
- Zalutsky MR, Pozzi OR. Radioimmunotherapy with alpha-particle emitting radionuclides. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2004; 48:289-96.

Danksagung

Ich möchte mich bei Frau Prof. Senekowitsch-Schmidtke zuallererst ganz herzlich für die Überlassung des Themas und für die ausgezeichnete Betreuung meiner Arbeit bedanken.

Herrn Dr. Christof Seidl danke ich ebenfalls für die großartige Betreuung während der gesamten Dauer des Projektes und für die prompte und zuverlässige Hilfestellung wannimmer ich diese benötigte.

Herrn PD Dr. Gregor Weirich vom Institut für Pathologie der Technischen Universität München danke ich sehr herzlich für die histologischen Untersuchungen der Proben.

Herrn PD Dr. Axel Walch vom Helmholtz Zentrum München danke ich für seine Zeit zur professionellen Befundung der Lungenproben und seine überaus freundliche Betreuung.

Meiner besten Kollegin Julia Fazel, die man sich für so ein großes Projekt vorstellen kann, danke ich über alles! Ich hätte das ohne Dich alles niemals geschafft, vielen Dank für Deine Hilfestellung und Kollegialität bei allen unseren Unternehmungen, am allerglücklichsten bin ich darüber, dass wir Freundinnen geworden sind.

Meiner lieben Kollegin Annette Frank danke ich für alle technischen Problemlösungen und für die perfekte Einschulung in mein Arbeitsgebiet, die du mir geboten hast! Danke!

Meine liebe Christina Lesti, ich danke Dir ebenfalls dass Du da warst und dass Du mich in entscheidenden Momenten aus dem Sumpf gezogen hast. Vielen lieben Dank!

Meinen lieben Freundinnen Elisabeth V., Elisabeth M., Marion B. und Katharina MC. möchte ich für Ihre Freundschaft und Ihr Mitgefühl und aufbauenden Worte beim Verfassen dieser Arbeit besonders danken.

Mein lieber Schatz Achim, ich danke Dir für Deine kompetente Unterstützung bei Formatierungsproblemen, die es erwartungsgemäß zuhauf gab und für Deine Liebe die ich nur erwidern kann, jeden Tag den ich bis jetzt mit Dir verbringen durfte habe ich so sehr genossen.

Am Ende aber nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern und meiner gesamten Familie ganz herzlich danken für alles was sie für mich getan haben. Ihr habt mich in allen Dingen auf eine Art und Weise unterstützt die unschlagbar ist. Ich liebe Euch von ganzem Herzen.