

Aus der Klinik für Nuklearmedizin  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Direkter Vergleich der Peptid Rezeptor Radionuklidtherapie  
an Neuroendokrinen Neoplasien mit  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC und  
 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR11 im Kleintiermodell mittels multimodaler  
Bildgebung

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jakob Albrecht

aus Berlin

Datum der Promotion: 04.03.2022

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>Vorwort</b> .....	<b>3</b>
<b>1. Abstrakt deutsch</b> .....	<b>4</b>
<b>2. Abstract english</b> .....	<b>6</b>
<b>3. Manteltext</b> .....	<b>7</b>
3.1 Einleitung.....	7
3.2 Material und Methoden .....	10
3.2.1 Etablierung des orthotopen Xenograft Modells .....	10
3.2.2 Radiochemie.....	11
3.2.3 <i>In vitro</i> Versuche .....	11
3.2.4 Aktivitätsstudie .....	12
3.2.5 Zwei-Zyklus-PRRT .....	12
3.2.6 Multimodale Bildgebung.....	13
3.2.7 Bildauswertung.....	15
3.2.8 Histologie.....	16
3.2.9 Statistik .....	16
3.3 Ergebnisse .....	18
3.3.1 <i>In vitro</i> Versuche .....	18
3.3.2 Aktivitätsstudie .....	19
3.3.3 Zwei-Zyklus-PRRT .....	20
3.4 Diskussion .....	27
3.5 Literaturverzeichnis.....	33
<b>4. Eidesstattliche Versicherung</b> .....	<b>39</b>
<b>5. Anteilserklärung</b> .....	<b>40</b>
<b>6. Auszug aus der Journal Summary List (ISi Web of KnowledgeSM)</b> .....	<b>41</b>
<b>6. Druckexemplare der Publikation</b> .....	<b>42</b>
<b>7. Lebenslauf</b> .....	<b>48</b>
<b>8. Publikationsliste</b> .....	<b>50</b>
<b>9. Danksagung</b> .....	<b>52</b>

## **Vorwort**

Bei dem nachfolgenden Manteltext handelt es sich um die Zusammenfassung einer wissenschaftlichen Arbeit, welche unter dem Titel „Multimodal Imaging of 2-cycle PRRT with  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR11 and  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC in an Orthotopic Neuroendocrine Xenograft Tumor Mouse Model“ von Albrecht et al. bereits im Journal of Nuclear Medicine veröffentlicht wurde (1). Folglich sind die Inhalte bis auf wenige Ausnahmen bereits publiziert.

## 1. Abstrakt deutsch

**Einleitung:** Neuroendokrine Neoplasien (NEN) sind seltene Tumorerkrankungen, die häufig erst in einem fortgeschrittenen Tumorstadium diagnostiziert werden. Die Peptid Rezeptor Radionuklidtherapie (PRRT) unter Verwendung von radioaktiv markierten Somatostatinrezeptor (SSTR) Agonisten stellt eine gängige und effektive palliative Therapieoption dar. Seit 2006 stehen vielversprechende SSTR Antagonisten im Fokus der Forschung. In der aktuellen Studie haben wir in einem orthotopen Mausmodell die PRRT mit zwei Zyklen des neuen SSTR Antagonisten  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR11 mit dem gängigen Agonisten  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC mittels multimodaler morphologischer und funktioneller Bildgebung verglichen.

**Methoden:** *In vitro* Bindungs- und Internalisierungsassays sowie eine Zellzyklusanalyse wurden durchgeführt. Für die *in vivo* Versuche wurde ein orthotopes Mausmodell einer pankreatischen NEN mit SSTR2 transfizierten BON-Zellen verwendet. Nach einer initialen Aktivitätsstudie (n = 12), erhielten die Tiere zwei Therapiezyklen im Abstand von drei Wochen mit jeweils entweder 100  $\mu\text{l}$  Kochsalzlösung (n = 4), 20 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR11 (n = 4) oder 30 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC (n = 4) intravenös. Das Monitoring von Tumorgröße und Morphologie erfolgte wöchentlich mittels MRT, eine einmalige Kontrolle des Tumormetabolismus nach Abschluss der Therapie mittels FDG-PET/MRT. Der SSTR-Besatz sowie der Uptake der Radiopharmaka in Tumor und Nieren wurde mittels SPECT/CT untersucht.

**Ergebnisse:**  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR11 zeigte *in vitro* eine 6-fach höhere Affinität verglichen mit dem Agonisten. *In vivo* präsentierte der SSTR Antagonist einen 4 – 6-fach höheren Tumoruptake sowie einen 3-fach höheren Tumor-to-Kidney Quotienten, verglichen mit  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC. Während  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR11 ein über beide Therapiezyklen hin konstanter Uptake zeigte, kam es bei  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC bei der zweiten Injektion zu einer signifikanten Abnahme ( $p = 0,01$ ). Nach Therapie mit  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR11 kam es zu einer Reduktion der Tumorgröße ( $p < 0,001$ ) sowie zu einem deutlich verlängerten medianen Überleben (207 d (IQR = 132 – 228)) gegenüber dem Agonisten (126 d (IQR = 118 – 129)). MRT gestützte Analysen der Tumormorphologie zeigten ausgeprägtere Nekroseareale in den  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR11 therapierten Tieren. Die FDG-PET/MRT nach Abschluss der Therapie erbrachte ein deutlich geringeres vitales Tumolvolumen für den SSTR Antagonisten (6,2 % (IQR = 2 – 23)) verglichen mit  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC (24,1 % (IQR = 16 – 40)).

**Schlussfolgerung:** Das verwendete multimodale Bildgebungsprotokoll erlaubt eine detaillierte Therapievalidierung mit Berücksichtigung von Tumormorphologie und Metabolismus. Der neue SSTR Antagonist  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR11 zeigt einen deutlich ausgeprägteren zytotoxischen Effekt *in vitro* wie auch *in vivo* sowie eine vorteilhafte Tumor-zu-Nieren Ratio.

## 2. Abstract english

**Introduction:** Neuroendocrine neoplasms (NEN) are rare tumors and often diagnosed at late stages with no curative therapy options. Peptide receptor radionuclide therapy (PRRT) using radiolabeled somatostatin receptor (SSTR) agonists, is an approved and effective treatment regimen. Since 2006 new SSTR antagonists have been discussed to surpass agonists for PRRT. In this study, we compared a two-cycle antagonist-based PRRT ( $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR11) with the commonly used agonist  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC in an orthotopic murine model. In addition to tumor size, functional parameters such as metabolism and SSTR state were evaluated using a multimodal imaging concept.

**Methods:** First, *in vitro* analysis including binding, internalization assays and cell cycle analysis was performed. Next, we established an orthotopic murine model using the SSTR2 transfected pancreatic NEN cell line BON (BON-SSTR2). After an initial study to evaluate optimal activity and time interval (n = 12), a PRRT including two therapy cycles with an interval of three weeks was applied. Animals received intravenous injections of either 100  $\mu\text{l}$  saline (n = 4), 20 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR11 (n = 4) or 30 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC (n = 4). MRI was performed on a weekly basis for assessment of tumor volume and morphology. An FDG-PET/MRI scan after PRRT allowed quantification of metabolically active tumor tissue. SSTR levels and tumor and kidney uptake of the respective radiopharmaceuticals were evaluated using SPECT/CT.

**Results:**  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR11 showed a 6-fold higher affinity compared to the agonist *in vitro*. *In vivo*, the SSTR antagonist presented a 4 – 6-fold higher tumor uptake and a 3-fold higher tumor-to-kidney ratio.  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC showed a decreased tumor uptake during the second therapy cycle (p = 0.01), while  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR11 presented a stable or even increasing uptake. Treatment with the SSTR antagonist induced a significant reduction of tumor size (p < 0,001) and was associated with prolonged median survival (207 d (IQR = 132 – 228)) compared to the agonist (126 d (IQR = 118 – 129)). Visual assessment of the tumor morphology showed increasing fractions of intratumoral necrosis in  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR11 treated tumors. FDG-PET/MRI supported these results, showing less viable tumor tissue of only 6,2 % (IQR = 2 – 23) compared to  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC (24,1 % (IQR = 16 – 40)).

**Conclusion:** The applied multimodal imaging concept allowed a detailed analysis of the treatment effects including tumor morphology and metabolism, revealing a pronounced cytotoxic effect and a favorable tumor-to-kidney ratio of the new SSTR antagonist  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR11.

### 3. Manteltext

#### 3.1 Einleitung

Neuroendokrine Neoplasien (NEN) sind eine heterogene Gruppe an Tumorerkrankungen, deren Gemeinsamkeit sowohl neuronale als auch endokrine Eigenschaften sind. Die Inzidenz der NEN ist in den letzten Dekaden gestiegen (2), aktuell machen sie aber nur etwa 1% aller malignen Neuerkrankungen des Gastrointestinaltraktes aus und gelten damit als selten (3). Während ein Teil der Tumoren hormonelle Aktivität aufweist und konsekutiv klinisch durch meist unspezifische Symptome auffällig wird, sogenannte funktionelle NEN, bleiben nicht funktionelle NEN lange asymptomatisch, sodass ein Großteil dieser Tumoren erst in einem fortgeschrittenen Tumorstadium entdeckt wird (4).

Während eine Resektion aktuell als therapeutischer Goldstandard gilt, sind zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bei fortgeschrittenen Tumoren die Therapiemöglichkeiten oft limitiert (4). In solchen Fällen kommt regelmäßig eine Peptid Rezeptor Radionuklid Therapie (PRRT) zum Einsatz (5). Dabei wird ein therapeutisch wirksamer Beta-Minus-Strahler, meist Lutetium-177 ( $^{177}\text{Lu}$ ) oder Yttrium-90 ( $^{90}\text{Y}$ ), an ein Peptid mit tumorspezifischer Rezeptoraffinität gebunden. Zielrezeptor ist im Falle von NEN der von diesen zumeist überexprimierte Somatostatinrezeptor (SSTR), insbesondere vom Subtyp 2 (SSTR2). Aufgrund der geringen maximalen Reichweite der Betastrahler - ca. 2 mm für  $^{177}\text{Lu}$  - wird so eine lokale Bestrahlung von Tumorzellen bei geringen Kollateralschäden erreicht. Durch die physiologische Akkumulation auch in nicht maligne verändertem, SSTR2 exprimierendem Gewebe (z.B. lymphatisches System, Niere, Knochenmark), kommt es auch hier zu Zellschädigungen, was den wesentlichen therapielimitierenden Faktor der PRRT darstellt (5, 6).

$^{177}\text{Lu}$  markierte SSTR Agonisten wie etwa [ $^{177}\text{Lu}$ -DOTA<sup>0</sup>,Tyr<sup>3</sup>,Thr<sup>8</sup>]-octreotid ( $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC) oder [ $^{177}\text{Lu}$ -DOTA<sup>0</sup>,Tyr<sup>3</sup>]-octreotat ( $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE) werden bereits seit vielen Jahren im Rahmen individueller Heilversuche erfolgreich eingesetzt (7). Seit 2018 besteht eine offizielle Zulassung für  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE durch die europäische Arzneimittelbehörde EMA („European Medicines Agency“) bzw. die amerikanische FDA („Food and Drug Administration“). Ausschlaggebend für die Zulassung war die NETTER-1 Studie, eine randomisiert kontrollierte Phase III Studie, welche unter anderem ein deutlich verlängertes progressionsfreies Überleben durch die PRRT in fortgeschrittenen NEN zeigte (8). Überdies wird die PRRT auch erfolgreich zum neoadjuvanten Downstaging bei primär irresektablen NEN eingesetzt (diskutiert in (3)).

Nachdem die SSTR Agonisten viele Jahre als Mittel der Wahl angesehen wurden – insbesondere aufgrund deren intrinsischer Fähigkeit zur Internalisierung und konsekutiven Anreicherung in den Tumorzellen – stehen aktuell SSTR Antagonisten, z.B.  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR11 als vielversprechendster Vertreter, im Fokus der Forschung. 2006 wurde von Ginj et al. erstmals das gängige Dogma der Überlegenheit von Agonisten infrage gestellt und ein potentieller Vorteil von SSTR Antagonisten postuliert (9). Trotz der bis heute limitierten Anzahl an Studien, konnte dieser Benefit in fast allen bis dato veröffentlichten präklinischen (10-13) und klinischen Arbeiten (14, 15) bestätigt werden. So wurde gezeigt, dass die Antagonisten eine höhere Anzahl an Bindungsstellen erkennen und eine höhere Affinität aufweisen (16). Dalm et al. (11) haben ein 5-fach höheren Tumoruptake von  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR11 verglichen mit  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE beschrieben. Die höhere Affinität bedingt zudem eine prolongierte Tumorverweildauer der Radiopharmaka, sodass Wild et al. in einer ersten klinischen Studie eine 1,7 – 10,6-fach höhere Tumordosis berechnet haben (14). Aufgrund der höheren Tumorverweildauer wird hier bevorzugt  $^{177}\text{Lu}$  als Nuklid eingesetzt, da dessen Halbwertszeit etwa 2,5-fach höher ist als die von  $^{90}\text{Y}$  (162 h vs. 64 h). Zudem emittiert  $^{177}\text{Lu}$  zusätzlich  $\gamma$ -Strahlung, welche selbst zwar keinen therapeutischen Effekt hat, jedoch die Visualisierung und Quantifizierung des Radiopharmakons mittels Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (SPECT) ermöglicht. Somit kann ein auf Bildgebung basierender longitudinaler Versuchsaufbau gewählt werden und auf tierintensive Biodistributionsversuche zu unterschiedlichen Zeitpunkten verzichtet werden, bei annähernd gleichwertiger Aussagekraft (17).

Während die meisten bisher publizierten Studien vor allem die pharmakokinetischen und dosimetrischen Aspekte des neuen SSTR Antagonisten untersucht haben, ist aktuell wenig über die direkten Effekte auf den Tumor bekannt. Im klinischen Alltag wird die Verlaufsbeurteilung von soliden Tumoren unter Therapie oft anhand des Größenverlaufs der Tumorkläsionen ermittelt. Dazu kommen definierte Beurteilungskriterien, z.B. die sogenannten RECIST Kriterien („Response Evaluation Criteria in Solid Tumors v1.1“ (18)), zum Einsatz. Die Ermittlung der Tumorgöße erfolgt dabei in der Regel mittels Computertomographie (CT) oder Magnetresonanztomographie (MRT). In präklinischen Studien dagegen ist die Messung der Tumorgöße in subkutanen Modellen mittels Schieblehre eine häufig verwendete und etablierte Methode, um ein Therapieansprechen zu bewerten. Einige Studien haben jedoch gezeigt, dass die Tumorgöße als alleiniges Kriterium für ein

Therapieansprechen insbesondere bei immunologischen (19) sowie zielgerichteten Therapien von soliden Tumoren unzureichend ist (20) und auch Veränderungen innerhalb des Tumors wie ausgedehnte Nekrosen nicht erfasst. Eine multimodale Bildgebung liefert zusätzliche Informationen wie etwa funktionelle und metabolische Veränderungen, welche nicht unmittelbar einen Effekt auf Tumorgröße oder Tumolvolumen mit sich bringen. Im Tiermodell erlaubt die multimodale Bildgebung zudem die Verwendung von orthotopen Tumoren, welche, im Gegensatz zu subkutan implantierten Tumoren, eine differente Physiologie aufweisen. Es wird angenommen, dass die Tumorphysiologie von der jeweiligen Tumorumgebung geprägt wird, sodass orthotope Modelle die realen Tumorbedingungen mehr widerspiegeln, als die subkutane Umgebung. (21, 22).

Nach aktuellen Leitlinien muss vor der Durchführung einer PRRT immer der Nachweis einer suffizienten Expression von SSTR auf den Tumorzellen erfolgen (5). Goldstandard hierfür sind nuklearmedizinische Verfahren wie die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) unter Verwendung von Gallium-68 ( $^{68}\text{Ga}$ ) Verbindungen (z.B.  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC) (3). Während alternativ auch ein szintigraphischer Nachweis erfolgen kann, stellt die immunhistochemische Färbung von SSTR in Biopsien nach aktuellem Kenntnisstand keine zuverlässige Alternative dar (23). Ein weiteres bildgebendes Verfahren, welches bei NEN regelmäßig eingesetzt wird, ist die PET mit  $^{18}\text{F}$ -fluoro-desoxyglucose (FDG). Insbesondere bei höhergradigen und entdifferenzierten NEN korreliert die FDG-Avidität als metabolischer Marker mit der Zellproliferation (24), woraus sich ein prognostischer Nutzen für den Verlauf (25) sowie für die PRRT ergibt (26). Zusammenfassend bietet die kombinierte Anwendung von morphologischer und funktioneller Bildgebung die Möglichkeit einer umfangreichen Analyse sowohl der initialen Tumorcharakteristika als auch therapiebedingter Veränderungen orthotoper Tumore im longitudinalen Verlauf.

Das Ziel dieser Studie war es, die morphologischen und funktionellen Therapieeffekte des neuen SSTR Antagonisten  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR1 in direktem Vergleich mit dem klinisch gängigen Agonisten  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC mittels ausgewählter multimodaler Bildgebung zu analysieren. Hierzu wurde ein orthotopes Mausmodell mit einer SSTR positiven pankreatischen NEN Zelllinie verwendet.

## **3.2 Material und Methoden**

### 3.2.1 Etablierung des orthotopen Xenograft Modells

Die Tierversuche wurden durch die Tierversuchskommission des Landesamts für Gesundheit und Soziales Berlin (LaGeSo) unter der Antragsnummer G0011/16 genehmigt. Die Tiere wurden unter sterilen Bedingungen gehalten. Wasser und Futter standen jederzeit zur Verfügung.

Um eine Abstoßungsreaktion der humanen Tumorzellen durch die körpereigene Immunabwehr der Tiere zu verhindern, wurden immundefiziente Mäuse des Stammes SCID („severe combined immunodeficient“) verwendet. Die Etablierung des orthotopen Tiermodells erfolgte wie in Albrecht et al. beschrieben (1). Sobald die Tiere ein Gewicht von mindestens 20 g erreicht haben, wurden SSTR2 transfizierte BON Zellen (BON-SSTR2) orthotop in den Pankreasschwanz injiziert. Zur Anästhesie und Analgesie erhielten die Mäuse perioperativ Ketamin intraperitoneal (ip) (0,06 mg/g KG), Metamizol subkutan (sc) (0.2 mg/g KG) und Carprofen sc (0,005 mg/g KG). Um eine bessere Steuerbarkeit der Anästhesie zu erreichen, wurde zusätzlich eine kontinuierliche Anästhesie durchgeführt (1 – 2 % Isofluran bei konstantem Sauerstofffluss von 0,5 l/min). Eine konstante Körpertemperatur konnte mittels Wärmematte während der gesamten Operation gewährleistet werden.

Über eine ca. 2 cm lange Medianlaparotomie entlang der Linea alba wurde die Abdominalhöhle eröffnet. Der Pankreasschwanz konnte anhand der Milz als Leitstruktur sicher identifiziert werden. Mittels einer feinen Spritze (30 G) wurden  $2,0 - 2,2 \times 10^6$  Zellen in Nährmedium (maximal 20  $\mu$ l) orthotop injiziert. Ein in antiseptische Lösung (0.04 % Polihexanid in Ringerlösung) getauchter Wattetupfer wurde während des Entfernens der Injektionsnadel auf die Punktionsstelle gehalten, um ein Austreten von Zellen und damit ein Tumorwachstum im Bauchraum zu verhindern. Die anschließende Naht erfolgte mit resorbierbarem Nahtmaterial der Stärke 5-0 (VICRYL (Polyglactin 910), Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Germany). Für die muskuläre Schicht wurden durchgängige, für den Hautverschluss Einzelknopfnähte verwendet. Das operative Vorgehen entspricht dem Procedere wie in Albrecht et al. beschrieben (1). Das Wohlbefinden der Tiere wurde vor Therapiestart wöchentlich und im Anschluss zweimal pro Woche kontrolliert.

### 3.2.2 Radiochemie

Die Synthese des SSTR Antagonisten  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR11 erfolgte wie bereits in Albrecht et al. beschrieben (1). Die entsprechenden Komponenten wurden von unterschiedlichen Herstellern erworben:  $^{177}\text{Lu}$ -Chlorid ( $^{177}\text{LuCl}_3$ , EndolucineBeta®) sowie die entsprechenden Reagenzien-Kits von ITG (ITM Isotopen Technologien München AG, Garching, Deutschland) und der Chelator DOTA von ABX (advanced biochemical compounds GmbH, Deutschland). Das Peptid JR11 wurde freundlicherweise von Prof. Maecke (Universitätsklinikum Freiburg, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

Für die Rezeptorzintigraphie wurde das SSTR spezifische Radiopharmakon  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EDDA- (Ethylenediamine-N-N'-diacetic acid)/ HYNIC-[D-Phe1, Tyr3-octreotide]-TFA-Salz ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -TEKTROTYD) verwendet. Das entsprechende Reagenzien-Kit stammt von Rotop Pharma GmbH, Dresden, Deutschland.

### 3.2.3 In vitro Versuche

Die *in vitro* Versuche wurden mit SSTR 2- (pcDNA3.1-huSSTR2, #SSTR200000, cDNA Resource Center, Bloomsberg, PA, USA; www.cdna.org) transfizierten BON Zellen durchgeführt. Die Wirkung des neuen SSTR-Antagonisten  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR11 wurde zunächst *in vitro* mit dem Agonisten  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC in Bindungs- sowie Internalisierungsassays verglichen. Darüber hinaus wurde eine Zellzyklusanalyse durchgeführt.

Das Bindungsassay wurde durchgeführt wie bereits von Exner et al. beschrieben (27). Die Zellen wurden zunächst in 96-well Platten ausgesät und mit Pufferlösung inkubiert (50 mM HEPES, pH 7,4, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,5 % w/v BSA, Proteasominhibitoren), welche mit Iod-125 markiertem Somatostatin 14 versetzt war. Zunehmende Konzentrationen an DOTATOC bzw. DOTA-JR11 wurden zur Verdrängung hinzugegeben. Die Zellen wurden nach 30 min gewaschen (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 125 mM NaCl, 0,05 % w/v BSA) und anschließend in 1 M NaOH lysiert. Die Restaktivität wurde in einem Gammacounter (Wallac 1470 Wizard, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) gemessen.

Die Berechnung der Internalisierungsraten erfolgte nach (11). Dazu wurden die Zellen in 12-well Platten ausgesät und mit den entsprechenden Konzentrationen der  $^{177}\text{Lu}$  markierten Somatostatinanaloga über Nacht inkubiert. Um zwischen membrangebundener und internalisierter Aktivität zu unterscheiden, wurden die Zellen

zunächst mehrfach mit PBS gewaschen. Die membrangebundene Aktivität wurde mittels einer Säurelösung für 10 min abgelöst (50 mM Glycin, 100 mM NaCl, pH 2,8), anschließend wurden die Zellen in 1 M NaOH lysiert. Beide Fraktionen wurden in einem Gammacounter untersucht.

Für die Zellzyklusanalyse wurden, wie bereits in (27) beschrieben, die BON-SSTR2 Zellen ebenfalls in 12-well Platten ausgesät und mit den radioaktiv markierten Somatostatinanaloga inkubiert. Nach 4-stündiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen gewaschen und in frisches Wachstumsmedium umgesetzt. Anschließend wurden sowohl die Zellen als auch der Überstand gesammelt und mit 70 %-igem Ethanol für mindestens 24 h bei -20 °C fixiert. Für die Zellzyklusanalyse wurden die Proben mit PBS gewaschen und mit Propidiumiodid versetzt (20 µg/ml Propidiumiodid, 20 µg/ml RNase A in PBS) und mittels Durchflusszytometrie untersucht (FACSCalibur, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

#### 3.2.4 Aktivitätsstudie

Um eine geeignete Aktivität und das passende Zeitintervall zwischen den geplanten PRRT Zyklen zu ermitteln, wurde in einer vorgeschalteten Studie zunächst ein PRRT Zyklus mit den in der Literatur beschriebenen Aktivitäten durchgeführt (11). Das Ziel war es, einerseits den Größenverlauf der Tumore und andererseits die Wirksamkeit und Verträglichkeit der Radiopharmaka zu untersuchen.

Wie bereits von Albrecht et al. (1) publiziert, wurden insgesamt 12 Tieren orthotope, pankreatische NEN inokuliert. Das Tumorstadium wurde wöchentlich mittels MRT Aufnahmen ermittelt. Sobald die Tumoren eine Größe von etwa 100 mm<sup>3</sup> erreichten, wurde eine einmalige Injektion von 30 MBq <sup>177</sup>Lu-DOTATOC (n = 4), 30 MBq <sup>177</sup>Lu-DOTA-JR11 (n = 4) bzw. 100 µl Kochsalzlösung (n = 4) in die Schwanzvene verabreicht. Das Tumorstadium wurde weiterhin wöchentlich kontrolliert bis zu einer Größe von 1000 mm<sup>3</sup>.

#### 3.2.5 Zwei-Zyklus-PRRT

Der Versuchsaufbau erfolgte wie in Albrecht et al. beschrieben (1). Da in der Aktivitätsstudie alle Tiere, welche mit 30 MBq <sup>177</sup>Lu-DOTA-JR11 therapiert wurden, innerhalb von etwa 3 Wochen verstarben, wurde die Aktivität von <sup>177</sup>Lu-DOTA-JR11 um ca. 30 % reduziert, sodass für die PRRT Studie 20 MBq <sup>177</sup>Lu-DOTA-JR11 (n = 4), 30 MBq <sup>177</sup>Lu-DOTATOC (n = 4) bzw. 100 µl Kochsalzlösung i.v. verabreicht wurden.

Die erste Injektion erfolgte dabei bei einer Tumorgöße von etwa 100 mm<sup>3</sup>, die zweite wurde, basierend auf den Ergebnissen der Aktivitätsstudie, nach 3 Wochen durchgeführt. Der Versuch wurde beendet, sobald das Tumolvolumen 1000 mm<sup>3</sup> erreichte oder ein Gewichtsverlust > 20% des Ausgangsgewichts bzw. andere sofortige Abbruchkriterien nach den Vorgaben der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS) eintraten.

### 3.2.6 Multimodale Bildgebung

#### *Überblick der verwendeten Protokolle*

In einer Reihe von Vorversuchen wurden verschiedene bildgebende Modalitäten untersucht mit dem Ziel, ein multimodales Bildgebungsprotokoll zu etablieren. Dieses wurde in Hinblick auf folgende Kriterien erstellt: 1) Eignung für die Analyse des Therapieeffektes, 2) praktisch-technische Durchführbarkeit und Reproduzierbarkeit und 3) zeitliche Limitierung im Hinblick auf das Wohl der Versuchstiere. In Tabelle 1 sind alle Sequenzen aufgelistet, welche letztlich Einzug in das Untersuchungsprotokoll gefunden haben.

**Tabelle 1:** Auflistung der für den Versuch etablierten Bildgebungsprotokolle.

<b>Modalität</b>	<b>Sequenz/ Radiopharmakon</b>	<b>Nutzen</b>
MRT	T2w	Morphologie, exaktes Tumolvolumen
PET/MRT	<sup>18</sup> F-FDG	metabolisch aktives Tumorgewebe
SPECT/CT	<sup>99m</sup> Tc-Tektrotyd	SSTR-Besatz des Tumors
SPECT/CT	<sup>177</sup> Lu-DOTA-JR11 <sup>177</sup> Lu-DOTADOTC	Quantifizierung des Uptakes

Die für unser finales Protokoll als ungeeignet erachteten Sequenzen sind in Tabelle 2 aufgeführt. Als eine der hierunter vielversprechendsten Messungen hat sich die diffusionsgewichtete MRT Messung (DWI) gezeigt. Für diese konnten wir in einem orthotopen Modell eines hepatozellulären Karzinoms eine Korrelation mit den physiologisch-morphologischen Veränderungen der Karzinome und deren Tumorumgebung während des Größenwachstums feststellen (diskutiert in Albrecht et al. (28)). Die Sequenz wurde aber letztlich verworfen, da diese zeitlich (40 min.) und technisch aufwändige Untersuchung bei mehreren aufeinanderfolgenden Messungen

zu einer Überhitzung der Spulen und folglich zu Messungenauigkeiten bis hin zu Systemausfällen bei unserem 1 T MRT System führte (28).

**Tabelle 2:** Auflistung der im Rahmen der Versuchsplanung untersuchten und abgelehnten Bildgebungsprotokolle.

<b>Modalität</b>	<b>Sequenz/ Radiopharmakon</b>	<b>Nutzen</b>	<b>Grund der Ablehnung für unser Protokoll</b>
MRT	DWI	Korrelation mit morphologischen Veränderungen, frühes Therapieansprechen	technische Limitationen (28)
PET/MRT	<sup>15</sup> O-Wasser	Goldstandard zur Perfusionsmessung	Bei einer Halbwertszeit von zwei min nicht praktikabel
PET/MRT	Perfusions-MRT („dynamic contrast enhanced“)	Darstellung der Tumorperfusion	Technisch bedingt lange Messzeiten mit unzureichender Erfassung der initialen Kontrastmittelanflutung

### *Durchführung*

Die *in vivo* Bildgebung wurde an einem dedizierten Kleintier PET/MRT (nanoScan PET/MRI, Mediso, Ungarn) und SPECT/CT (nanoScan SPECT/CT, Bioscan/Mediso, Ungarn) durchgeführt. Es erfolgte eine Narkose mit 1 – 2 % Isofluran in 0,5 l Sauerstoff/min (3% Isofluran während der Narkoseeinleitung). Die Körpertemperatur wurde während der gesamten Messung durch ein thermoregulierbares Mausbett konstant bei 37 °C gehalten. Die Überwachung der Narkosetiefe erfolgte über die Atemfrequenz, diese wurde über einen druckempfindlichen Sensor (Atempad) ermittelt.

### *PET/MRT*

Das Monitoring von Tumorgröße und Morphologie erfolgte wöchentlich mittels anatomischer MRT Aufnahmen. Aufgrund der unzureichenden Verfügbarkeit von Bildgebungsprotokollen für präklinische 1 T PET/MRT Scanner wurden zunächst verschiedene MRT Sequenzen anhand von Phantommessungen etabliert, wie in

Albrecht et al. (28) beschrieben. Die entsprechende T2 gewichtete Sequenz (T2w) wurde wie folgt für diese Studie adaptiert: TR = 8.700 ms; TE = 103 ms; Schichtdicke/Gap = 1,1 mm/ 0,1 mm; Matrix = 256 x 256 mm; Anzahl der Mittelungen = 5 und Anzahl der Wiederholungen = 2.

Die metabolische Aktivität der Tumore wurde einmalig mittels FDG-PET überprüft, sobald nach dem zweiten Therapiezyklus ein erneutes signifikantes Tumorwachstum (Tumorgröße mindestens 700 mm<sup>3</sup>) zu beobachten war. Dazu wurden jeweils 10 – 20 MBq FDG 30 – 60 min vor den PET Akquisitionen (iterative Bildrekonstruktionen mit OSEM-Algorithmus (Ordered Subset Expectation Maximization); 8 Iterationen; 6 Subsets; Voxelgröße = 500 × 500 × 600 µm<sup>3</sup>) in die Schwanzvene injiziert. Die anatomischen MRT Aufnahmen erfolgten im selben Aufnahmeprotokoll, sodass anschließend eine korrekte Fusion der erzeugten PET- und MRT-Bilder erfolgen konnte.

### *SPECT/CT*

Zur Darstellung der Verteilung und zur Quantifizierung der aufgenommenen Radiopharmaka wurden einen Tag nach jeder Therapieinjektion semi-stationäre SPECT Untersuchungen durchgeführt. Die anatomische Orientierung erfolgte mittels zusätzlich akquirierter CT Aufnahmen unter Verwendung der folgenden Parameter: 64 mAs; 45 kVp; Pitch = 1; Expositionszeit = 1.000 ms.

Die SSTR Expression der orthotopen NEN wurde vor und nach erfolgter PRRT mittels eines SSTR spezifischen Radiopharmakons untersucht. Hierzu wurden etwa 100 MBq <sup>99m</sup>Tc-TEKTROTYD i.v. injiziert. Die Aufnahme erfolgte nach 60 min mit folgenden Parametern: 60 Sekunden/Projektion mit 20 Projektionen und einer daraus resultierenden Gesamtdauer von 20 min pro SPECT-Aufnahme. Für die Quantifizierung von <sup>177</sup>Lu-DOTATOC und <sup>177</sup>Lu-DOTA-JR11 wurden jeweils 24 h nach Injektion SPECT/CT Messungen durchgeführt mit 120 Sekunden/Projektion und einer Gesamtdauer von 40 min.

### 3.2.7 Bildauswertung

Die MRT Aufnahmen wurden mittels InterView Fusion 3.01 (Mediso, Ungarn) ausgewertet. Für die Volumetrie wurde ein „volume of interest“ (VOI) manuell über den gesamten Tumor gelegt.

PET und SPECT Bilder wurden in PMOD 3.505 (PMOD Technologies Ltd., Schweiz) analysiert. Das metabolisch aktive Tumorgewebe wurde anhand von fusionierten T2w MRT/FDG-PET Bildern ermittelt. Hierzu wurde zunächst der gesamte Tumor auf einer T2w Aufnahme in einem VOI erfasst. Die FDG-aiden Anteile konnten daraufhin semi-automatisch abgegrenzt werden. Ausgehend von dem Volumenelement (Voxel) mit der höchsten Aktivität innerhalb des Tumors, wurden alle weiteren Voxel markiert, deren Aktivität mindestens 30 % des aktivsten Voxels betragen. Der Quotient aus diesen FDG-aiden Anteilen und dem gesamten Tumolvolumen wurde in dieser Studie als vitales Tumorgewebe definiert.

Zur Quantifizierung der Aufnahme von  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC und  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR11 wurde ein VOI um das jeweilige Organ (Niere, Tumor) gelegt und zunächst die mittlere aufgenommene Aktivität des gesamten Organs bestimmt. Diese mittlere Aktivität wurde dann in Relation zu der ursprünglich injizierten Aktivität gesetzt – nach erfolgter Zerfallskorrektur – und auf einen Milliliter genormt (%IA/ml), um eine Vergleichbarkeit zwischen Tumoren mit unterschiedlichem Volumen zu erreichen. Da die linke und rechte Niere ähnliche Werte präsentierten, wurde jeweils der Mittelwert aus beiden Nieren verwendet.

### 3.2.8 Histologie

Zum Nachweis von vitalem Tumorgewebe wurden die Tumoren post mortem entnommen und in Paraffin gebettet. Es wurden 1-2  $\mu\text{m}$  dicke Schichten sowohl aus der Tumormitte als auch vom Tumorrand geschnitten und mit Hämatoxylin (Merck) und Eosin (Sigma-Aldrich) (H&E) gefärbt. Für die Immunhistochemie wurde ein SSTR 2 spezifischer Antikörper verwendet (Clone A-8; Santa Cruz Biotechnology Inc.; Heidelberg; Germany).

### 3.2.9 Statistik

Aufgrund der geringen Fallzahlen ( $n = 4$ ) war eine valide statistische Testung limitiert möglich. Die Tumorgröße, als primärer Parameter zur Einschätzung eines Therapieerfolgs, sowie der Uptake der Radiopharmaka 24 h nach PRRT wurden mittels semi-parametrischer (MANOVA.RM) (29) und nicht-parametrischer (nparLD) (30) Tests in R (R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich) untersucht. Der statistische Größenvergleich erfolgte zu Therapiebeginn, 20 Tage (etwa Zeitpunkt

der zweiten Injektion) und 35 Tage nach erster Injektion (spätester Zeitpunkt für die Kontrollgruppe).

Die deskriptive Statistik und visuelle Aufarbeitung der Daten erfolgte in GraphPad Prism Version 8.2.1 durchgeführt (GraphPad Software, San Diego, California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

Die *in vitro* Versuche wurden, aufgrund der limitierten Verfügbarkeit der Radiopharmaka, lediglich einmalig durchgeführt, sodass keine statistische Testung durchgeführt wurde, die Ergebnisse sind als Trend zu betrachten.

Die Wachstumsverzögerung wurde in Anlehnung an eine Arbeit von Dalm et al. (11) als Differenz der Zeiten der einzelnen Gruppen bis zum Erreichen einer Tumorgroße von 1000 mm<sup>3</sup> im Vergleich zur Kontrollgruppe definiert. Aufgrund von technischen und entsprechend zeitlichen Limitationen bei den Messungen konnten nicht alle Tiere an denselben Tagen untersucht werden. Für die korrekte Darstellung der Daten mittels deskriptiver Statistik wurden daher die Tumorgroßen zwischen den einzelnen Messzeitpunkten in MATLAB R2018a (Mathworks) linear interpoliert.

In der Kaplan-Meyer Analyse wurde der Tod der Tiere als spontanes Versterben oder Euthanasie aufgrund der Abbruchkriterien nach der GV-SOLAS definiert.

### **3.3 Ergebnisse**

#### 3.3.1 *In vitro* Versuche

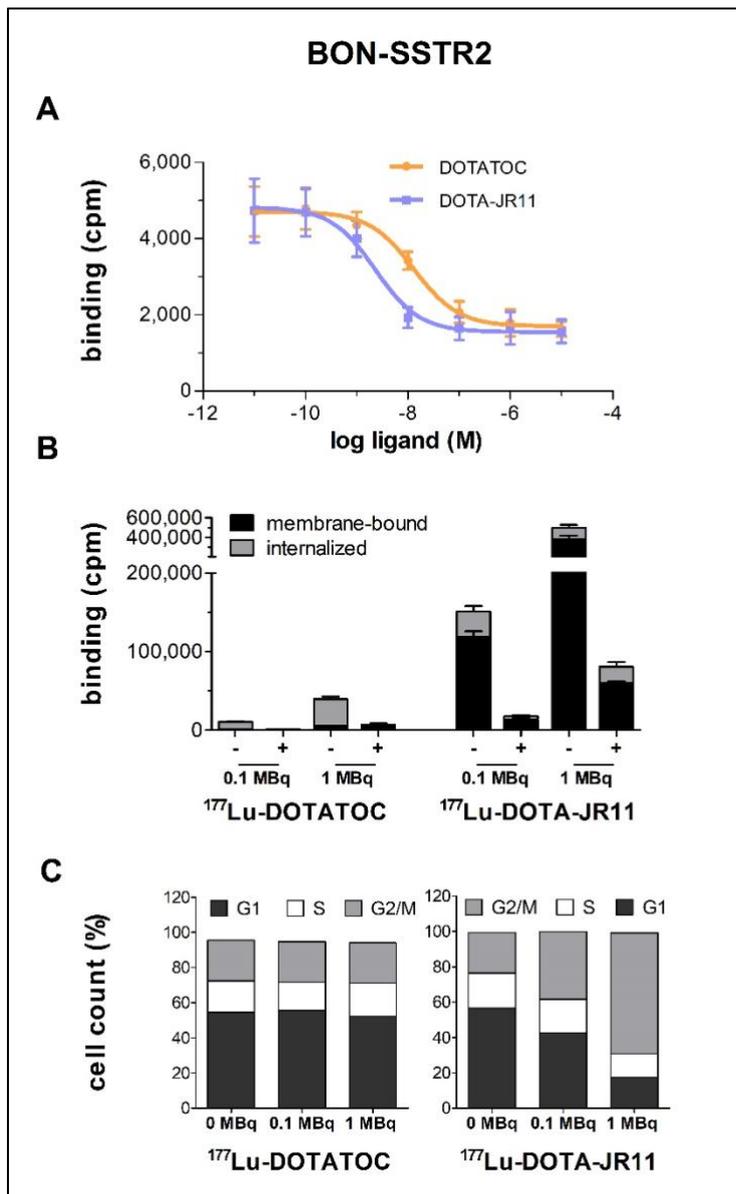
##### *Bindungs- und Internalisierungsassay*

Um die halbmaximalen inhibitorischen Konzentrationen ( $IC_{50}$ -Werte) der Somatostatinanaloga zu ermitteln, wurden radioaktive Bindungsassays mit Iod-125 markiertem Somatostatin 14 durchgeführt. Der SSTR Antagonist DOTA-JR11 zeigte dabei einen deutlich geringeren  $IC_{50}$ -Wert ( $IC_{50} = 2,3 \text{ mM}$ ) als DOTATOC ( $IC_{50} = 13,1 \text{ mM}$ ), was eine etwa 6-fach höhere Affinität zum SSTR2 für den Antagonisten impliziert (Abbildung 1A).

Der Internalisierungsassay zeigte eine 10-fach höhere zellgebundene Aktivität für  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR11, wobei diese mit 80 % überwiegend membrangebunden vorlag. Der Agonist  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC wies dagegen lediglich 20 % membrangebundene Aktivität auf (Abbildung 1B). Eine Bestätigung der SSTR2 Spezifität der Radiopharmaka erfolgte durch Verdrängung der membrangebundenen Aktivität mittels nicht radioaktiv markiertem Somatostatinanalogon.

##### *Zellzyklusanalyse*

Der SSTR Agonist  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC zeigte bei keiner der verwendeten Aktivitäten (0,1 MBq bzw. 1 MBq) einen Einfluss auf den Zellzyklus. Im Gegensatz dazu führte  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR11 zu einer aktivitätsabhängigen Induktion eines Zellzyklusarrestes in der G2/M Phase. Der Anteil der in der Teilungsphase (G2/M Phase) arretierten Zellen lag bei 38 % nach Inkubation mit 0,1 MBq (23 % in der Kontrollgruppe) und stieg bei 1 MBq auf 63 % an. Gleichzeitig verringerte sich die Anzahl der Zellen in der G0/1 Phase auf 43 % bei 0,1 MBq bzw. 17% bei 1 MBq (57 % in der Kontrollgruppe) (Abbildung 1C).



**Abbildung 1.**

(A) Bindungsassay der SSTR2 transfizierten BON-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen des SSTR2 antagonistischen DOTA-JR11 sowie des agonistischen DOTATOC. Es zeigt sich eine etwa 6-fach höhere Affinität des Antagonisten.

(B) Internalisierungsassay mit unterschiedlichen Aktivitäten der entsprechenden Radiopharmaka. Die SSTR2 Spezifität wurde durch Versuche mit (+) und ohne (-) Verdrängung durch ein natives SSTR2 Analogon bestätigt.

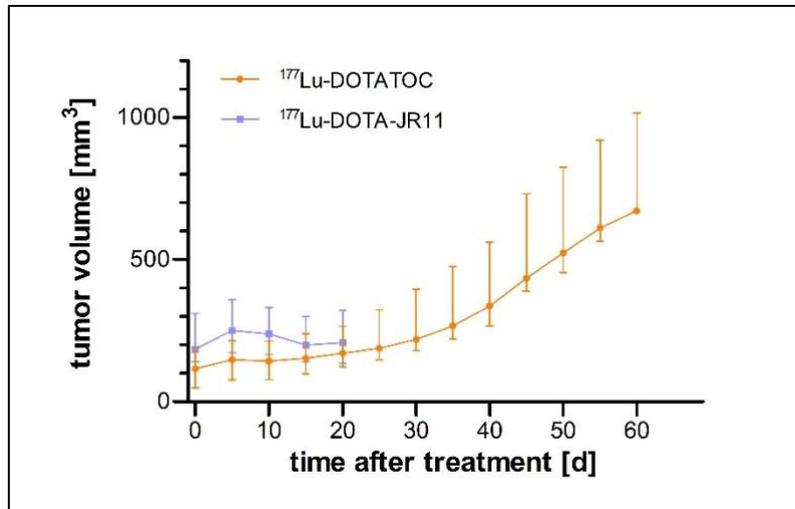
(C) Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie nach Inkubation der Zellen mit dem jeweiligen Radiopharmakon.

MBq: Megabecquerel; cpm: counts per minute. Modifiziert nach Albrecht et al. (1).

### 3.3.2 Aktivitätsstudie

Nach Applikation von 30 MBq <sup>177</sup>Lu-DOTA-JR11 verstarben alle vier Tiere innerhalb von drei Wochen. Während in dieser Zeit lediglich ein ausgeprägter Gewichtsverlust bei den Tieren festgestellt wurde, ergab sich bei der postmortalen Organentnahme kein makroskopischer Hinweis auf eine Todesursache. <sup>177</sup>Lu-DOTATOC wurde in dieser Dosierung dagegen von allen Tieren gut vertragen. Abbildung 2 zeigt die Wachstumsdynamik der Tumore entsprechend der im MRT durchgeführten Volumetrie. Es zeigt sich kurz nach der Therapie ein weitgehend stagnierendes Tumorstadium, bevor nach etwa drei Wochen ein erneutes Wachstum zu beobachten war. Auf Basis dieser Erkenntnis wurde in der PRRT Studie die zweite

Injektion des Therapeutikums nach drei Wochen durchgeführt, um strategisch der Erholung der Tumorzellen entgegenzuwirken und somit den Therapieeffekt zu verlängern



**Abbildung 2.**

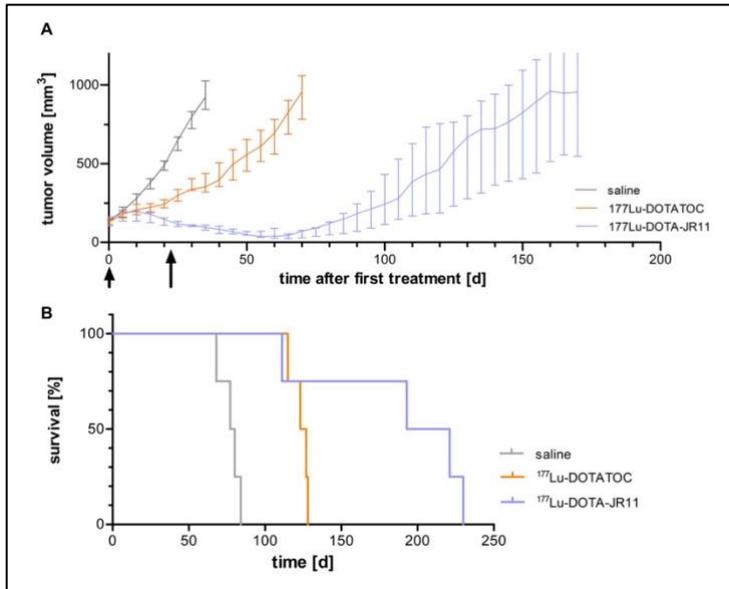
Wachstumskurve der orthotopen, pankreatischen NEN nach einem Therapiezyklus mit  $^{177}\text{Lu-DOTATOC}$  ( $n = 4$ ) bzw.  $^{177}\text{Lu-DOTA-JR11}$  ( $n = 4$ ). Dargestellt sind die medianen Tumorgößen sowie die interquartile Reichweite (IQR). Aus Albrecht et al. (supplemental data) (1).

### 3.3.3 Zwei-Zyklus-PRRT

#### *Tumormorphologie und Metabolismus*

Die Therapiegruppen zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant unterschiedliche Tumorgöße 20 d ( $p < 0,001$ ) bzw. 35 d ( $p < 0,001$ ) nach dem ersten Therapiezyklus (Abbildung 3A). Während  $^{177}\text{Lu-DOTATOC}$  therapierte Tumoren lediglich eine Wachstumsverzögerung ohne Reduktion des absoluten Tumolvolumens zeigten, kam es bei  $^{177}\text{Lu-DOTA-JR11}$  zu einer kontinuierlichen Volumenreduktion über 27 d im Median (IQR = 20 – 56).

Die Kaplan-Meier Analyse (Abbildung 3B) ergab einen deutlichen Überlebensvorteil für den SSTR Antagonisten  $^{177}\text{Lu-DOTA-JR11}$  (median 207 d (IQR = 132 – 228)) verglichen mit  $^{177}\text{Lu-DOTATOC}$  (median 126 d (IQR = 118 – 129)) und der Kontrollgruppe (median 80 d (IQR = 72 – 84)). Von den DOTA-JR11 therapierten Tieren ist eines aus unbekannter Ursache nach 111 d verstorben ( $125 \text{ mm}^3$ ), zwei wurden nach 221 d ( $928 \text{ mm}^3$ ) bzw. 230 d ( $700 \text{ mm}^3$ ) aufgrund von Gewichtsverlust entsprechend den Abbruchkriterien des Versuches euthanasiert. Die Wachstumsverzögerung, entsprechend der in der Statistiksektion aufgeführten Definition, lag bei 141 d (IQR = 113 – 150) für  $^{177}\text{Lu-DOTA-JR11}$  und bei 46 d (IQR = 38 – 49) für  $^{177}\text{Lu-DOTATOC}$ .



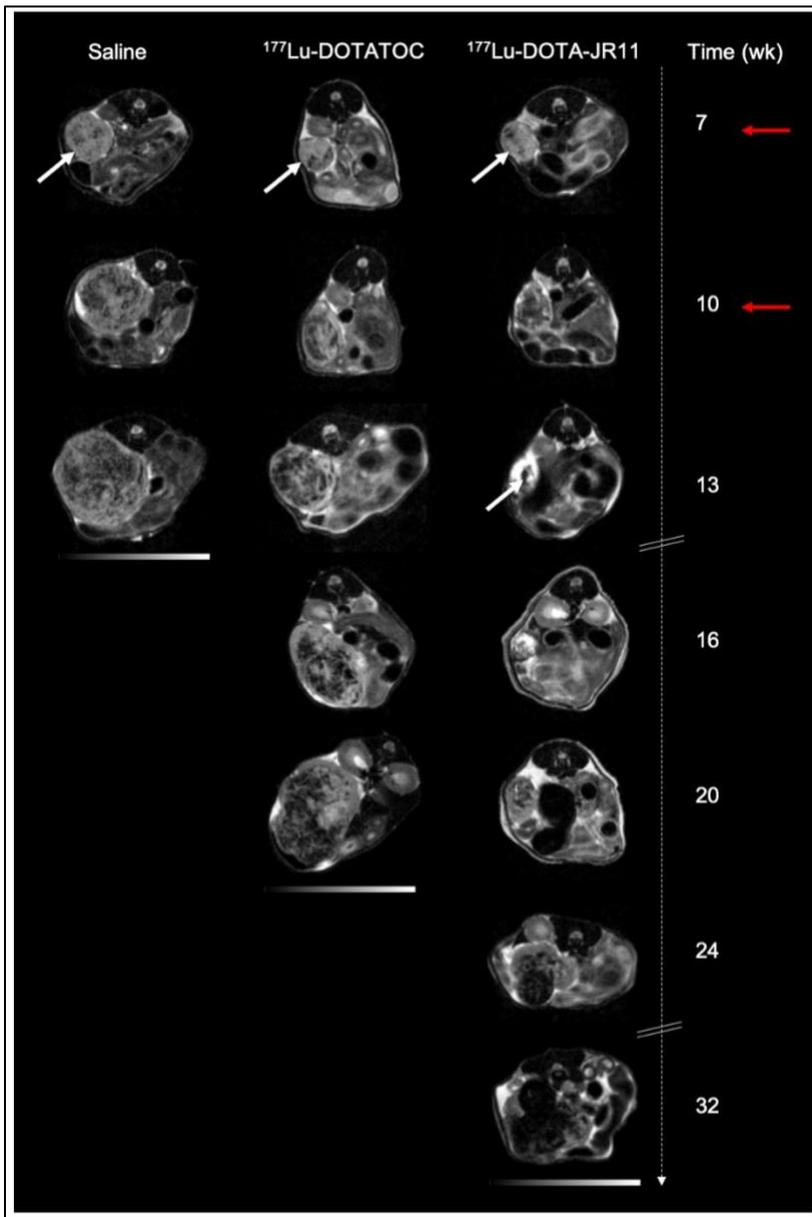
**Abbildung 3.**

(A) Tumorwachstum unter zwei Zyklen PRRT (Pfeile) mit jeweils 20 MBq <sup>177</sup>Lu-DOTA-JR11 (n = 4), 30 MBq <sup>177</sup>Lu-DOTATOC (n = 4) oder 100 µl Kochsalzlösung. Die Daten sind als Median und Interquartile Reichweite angegeben.

(B) Überlebenskurven nach Kaplan-Meyer.

MBq: Megabecquerel. Aus Albrecht et al. (1).

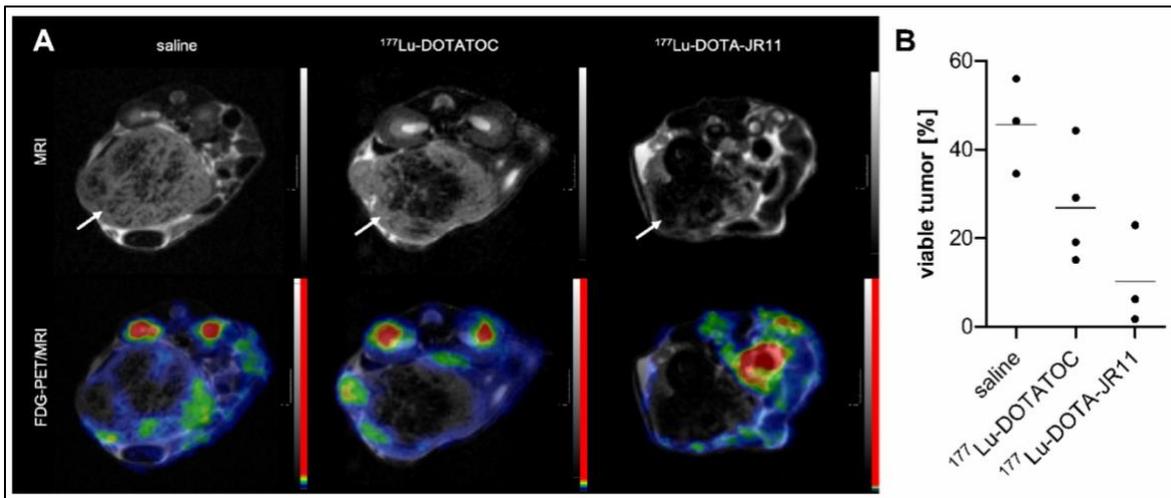
Die Betrachtung der Tumormorphologie anhand der T2w MRT zeigte im zeitlichen Verlauf eine progrediente Heterogenität der Tumore. Etwa drei Wochen nach dem zweiten Therapiezyklus zeigten sich die <sup>177</sup>Lu-DOTA-JR11 therapierten Tumore deutlich regredient mit lediglich geringem Restgewebe. In allen Therapiegruppen fielen im Verlauf zunehmende hypointense Areale mit vorwiegend zentralem Verteilungsmuster auf. Dieser Effekt war am stärksten in der <sup>177</sup>Lu-DOTA-JR11 Gruppe ausgeprägt (Abbildung 4).



**Abbildung 4.**

T2w MRT Aufnahmen in axialer Orientierung von jeweils einem repräsentativen Tier pro Therapiegruppe. Die Mäuse erhielten zwei Therapiezyklen (rote Pfeile) mit jeweils entweder 100 µl Kochsalzlösung (n = 4), 20 MBq <sup>177</sup>Lu-DOTA-JR11 (n = 4) oder 30 MBq <sup>177</sup>Lu-DOTATOC (n = 4). Die Tumore (weiße Pfeile) zeigen im Verlauf unterschiedlich große hypointense (nekrotische) Areale.

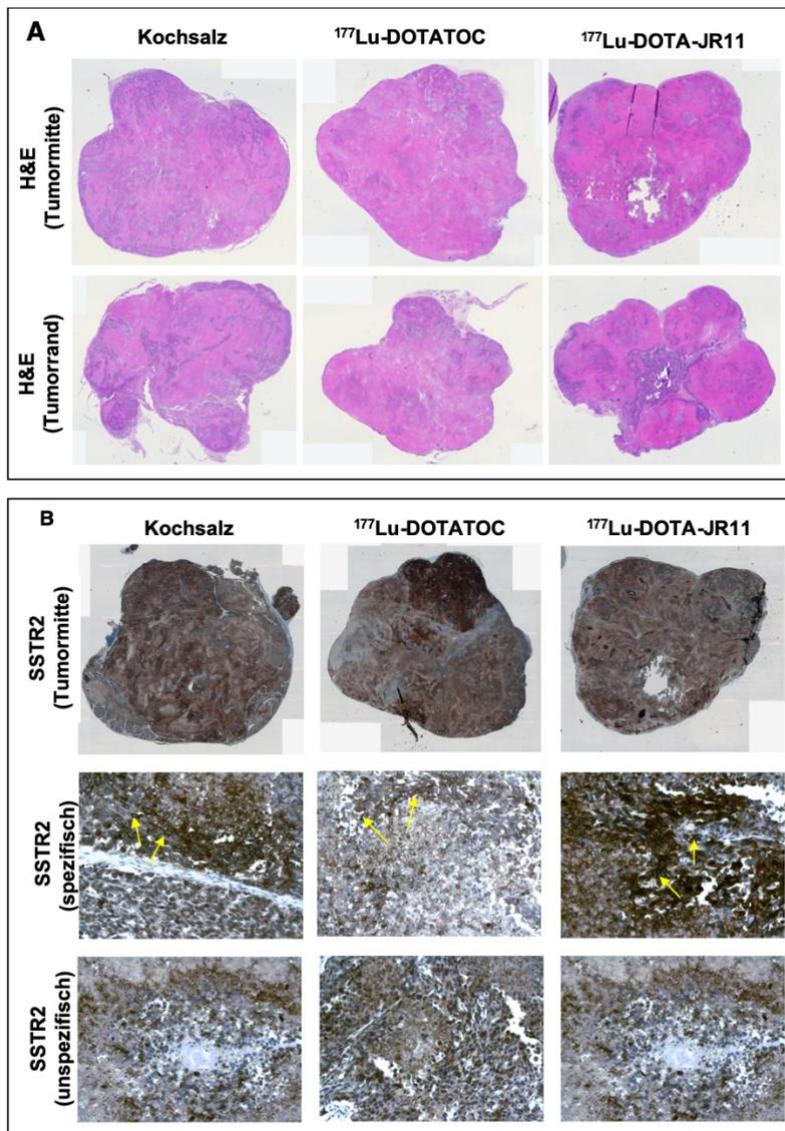
Um die Vitalität des Tumorgewebes anhand des für Tumorzellen charakteristischerweise erhöhten Glucosemetabolismus nach Abschluss der PRRT nachzuweisen, wurde einmalig eine FDG-PET/MRT Untersuchung durchgeführt. Dabei zeigten sich die FDG-aviden vitalen Tumoranteile korrelierend mit hyperintensiven Arealen der MRT (Abbildung 5). In der Kontrollgruppe fand sich zum Zeitpunkt der PET/MRT Untersuchung ein vitaler Tumoranteil von 46,4 % (IQR = 35 – 56), nach Applikation von <sup>177</sup>Lu-DOTATOC von 24,1 % (IQR = 16 – 40) und nach <sup>177</sup>Lu-DOTA-JR11 von 6,2 % (IQR = 2 – 23).



**Abbildung 5.**

(A) Fusionierte FDG-PET/MRT Bilder bestätigen eine FDG-Avidität in hyperintensiven Tumorebenen. (B) Die quantitative Analyse des vitalen Tumorgewebes zeigt den geringsten FDG-aiden Anteil für  $^{177}\text{Lu-DOTA-JR11}$ . MBq: Megabecquerel. Aus Albrecht et al. (1).

Die H&E Färbungen bestätigen postmortal höhere Anteile an vitalem Tumorgewebe im Bereich des in der Bildgebung FDG-aiden und hyperintensiven Tumorrandes (Abbildung 6).



**Abbildung 6.**

(A) Hämatoxylin und Eosin Färbung exemplarischer Tumoren jeweils von Tumorrand und -mitte.

(B) Immunhistochemische SSTR2 Färbung. Es lässt sich eine membrangebundene (spezifisch; gelbe Pfeile) von unspezifischer Färbung, etwa in nekrotischen Arealen, differenzieren. Modifiziert nach Albrecht et al. (1).

### *Uptake und Rezeptorbesatz*

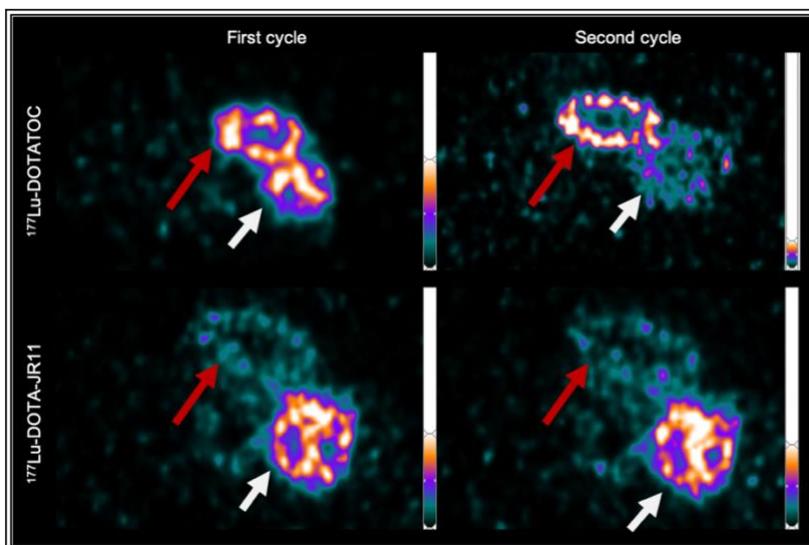
Zur Quantifizierung des Uptakes der applizierten Radiopharmaka wurde 24 h nach jedem Therapiezyklus eine SPECT Untersuchung durchgeführt. Die gemessenen Werte sind in Tabelle 3 aufgeführt. Der Tumouruptake von <sup>177</sup>Lu-DOTA-JR11 war während des ersten Therapiezyklus etwa 4-fach höher als für <sup>177</sup>Lu-DOTATOC, während des zweiten Zyklus etwa 6-fach höher. Während der Tumouruptake des SSTR Agonisten zum zweiten Zyklus hin signifikant abgenommen hat ( $p = 0,01$ ), deutet die deskriptive Statistik für den Antagonisten eher auf eine Zunahme hin, jedoch ohne statistische Signifikanz zu erreichen ( $p = 0,1$ ). Im Hinblick auf den Uptake der beiden Radiopharmaka in den Nieren ergab sich kein signifikanter Unterschied, weder zwischen den Therapiezyklen noch zwischen den beiden Radiopharmaka (Tabelle 3). Folglich zeigt sich für den ersten Therapiezyklus ein etwa 3-fach höherer und für den

zweiten ein etwa 5-fach höherer Tumor-to-Kidney Quotient für  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR11 im Vergleich zu  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC. Die entsprechenden Unterschiede sind auch visuell in Abbildung 7 zu sehen.

**Tabelle 3.** Medianer Tumor- und Nieren-Uptake von  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC und  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR11 24 h nach Injektion (modifiziert nach Albrecht et al. (1)).

Radiopharmakon	1. Therapiezyklus		2. Therapiezyklus	
	Tumor [%IA/ml] (IQR)	Nieren [%IA/ml] (IQR)	Tumor [%IA/ml] (IQR)	Nieren [%IA/ml] (IQR)
$^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC	2,7 (2,4 – 2,9)	2,6 (2,0 – 2,7)	2,0 (1,8 – 2,3)	2,5 (2,3 – 4,2)
$^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR11	10,4 (9,3 – 10,9)	3,2 (2,8 – 3,6)	12,9 (9,9 – 14,0)	3,0 (2,9 – 3,5)

Um den SSTR Status der Tumoren vor und nach Abschluss der PRRT zu überprüfen, wurden  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Tektrotyd-SPECT/CT Untersuchungen durchgeführt. Alle Tumoren zeigten prätherapeutisch einen positiven Rezeptorstatus und eine Abnahme des Uptakes nach dem zweiten Therapiezyklus. Interessanterweise zeigten dabei die  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR11 therapierten Tiere mit 9,2 % eine verhältnismäßig geringe Abnahme des Uptakes, verglichen mit 36,8 % für die SSTR Agonisten und 42,2 % für die Kontrollgruppe. Die absoluten Werte sind in Tabelle 4 aufgeführt. Die Immunhistochemie bestätigte eine suffiziente Expression von SSTR 2 auf allen Tumoren nach Abschluss der PRRT (Abbildung 6).



**Abbildung 7:**

SPECT Aufnahmen 24 h nach Applikation von jeweils 20 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR11 (untere Zeile) bzw. 30 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC (obere Zeile). Der Tumor (weißer Pfeil) zeigt nach Applikation von  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR11 einen deutlich stärkeren Uptake als die Niere (roter Pfeil), während der Tumor nach Gabe von

$^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC ein ähnliches oder nach dem 2. Zyklus ein etwas niedrigeres Uptake-Niveau als die Niere zeigt. Aus Albrecht et al. (supplemental data) (1).

**Tabelle 4.** Medianer Tumorstärke nach Injektion von  $^{99m}\text{Tc}$ -Tektrotyd vor und nach Abschluss der PRRT.

<b>Therapie</b>	<b>vor Therapie [%IA/ml] (IQR)</b>	<b>nach Therapie [%IA/ml] (IQR)</b>
Kochsalz	5,3 (4,3 – 6,7)	3,3 (2,6 – 3,9)
$^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC	3,5 (3,3 – 3,7)	2,1 (1,3 – 3,1)
$^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR11	5,6 (5,0 – 6,3)	5,1 (4,0 – 6,1)

### 3.4 Diskussion

Während eine PRRT mit SSTR Agonisten ein häufig genutzter und ein bereits für diese Indikation zugelassener Therapieansatz für fortgeschrittene und metastasierte NEN ist, legen neue Studien einen therapeutischen Vorteil von SSTR Antagonisten nahe. In der vorliegenden Studie wurden in einem orthotopen Mausmodell die Effekte des neuen SSTR Antagonisten  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR11 auf den Tumor sowie auf das Überleben der Tiere mittels multimodaler Bildgebung in direktem Vergleich mit dem Agonisten  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC untersucht.

Unsere *in vitro* Versuche zeigten ein deutlich unterschiedliches Therapieansprechen der Zellen auf die beiden Radiopharmaka. Während  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC keinen messbaren Einfluss auf den Zellzyklus hatte, konnte für  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR11 ein aktivitätsabhängig zunehmender Zellzyklusarrest in der G2/M Phase in bis zu 63 % der Zellen bei gleichzeitiger Abnahme der Zellen in der G0/1 Phase beobachtet werden. Dieser Arrest ist Ausdruck einer deutlich ausgeprägteren, strahleninduzierten Zellschädigung und somit eines besseren Therapieansprechens. Überraschend ist, dass dieser Effekt ausschließlich bei den überwiegend membrangebundenen Antagonisten auftritt, obwohl diese eine weit größere Entfernung zum Zellkern aufweisen als die überwiegend intrazellulär gebundenen Agonisten. Eine mögliche Erklärung ist die deutlich höhere Affinität sowie die 10-fach höhere zellgebundene Aktivität von  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR11, welche in erster Linie auf die höhere Anzahl an Bindungsstellen zurückzuführen ist (16). In einer 2016 publizierten Arbeit von Dalm et al. wurde eine höhere Anzahl an DNA-Doppel- und -Einzelstrangbrüchen in SSTR2 transfizierten Osteosarkomzellen (U2OS) durch  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR11 verglichen mit  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE beschrieben (11), was sich gut mit der von uns beobachteten höheren zellgebundenen Aktivität des Radiopharmakons und damit der höheren Menge und Dichte an wirksamen Betateilchen erklären lässt.

*In vivo* zeigten sich erwartungsgemäß signifikante Effekte auf das Größenwachstum der Tumore in allen radiopharmazeutisch therapierten Tieren. Eine absolute Volumenreduktion wurde dabei allerdings nur in der  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR11 therapierten Gruppe beobachtet, während  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC nur zu einer Wachstumsverzögerung führte. Klinisch ist die Reduktion der Tumorgöße, z.B. mittels Chemotherapie oder PRRT, ein valider Ansatz, einen fortgeschrittenen Tumor einer kurativen Resektion zugänglich zu machen (31, 32). Der ausgeprägtere zytotoxische Effekt des SSTR

Antagonisten stellt demnach einen wichtigen Aspekt der PRRT als Mittel zum neoadjuvanten Downstaging dar.

Im Vergleich zu der von Dalm et al. (11) veröffentlichten Studie zu SSTR Antagonisten kam es bei uns zu einer wesentlich längeren und ausgeprägteren Wachstumsverzögerung. Dies lässt sich auf mehrere Unterschiede in der Methodik der beiden Arbeiten zurückführen. Zum einen haben wir einen zweiten PRRT Zyklus durchgeführt, welcher in klinischen Studien zu einem bekanntermaßen längeren progressionsfreien Überleben führt (33), und zum anderen haben wir deutlich weniger Zellen für das Tumormodell verwendet ( $2,0 - 2,2 \times 10^6$  vs.  $4,0 - 40 \times 10^6$ ), was per se in einem langsameren, jedoch gleichmäßigerem Anwachsen des Tumors assoziiert ist. Auch die unterschiedlichen Zelllinien könnten in Teilen für die unterschiedliche Wachstumsverzögerung verantwortlich sein. Während von Dalm et al. ein H69 Zellen (kleinzelliges Lungenkarzinom) als Tumorentität verwendet wurden, wurde in unserer Studie eine Pankreaskarzinom Zelllinie verwendet, was auch zu der unterschiedlichen Wachstumsdynamik beigetragen haben kann. Auch das Tumormodell an sich spielt für das Wachstum eine wesentliche Rolle (orthotop vs. subkutan). So zeigen etwa orthotope Tiermodell eine höhere Vaskularisierung und Perfusion als subkutane (34), was konsekutiv zu einem anderen Anreicherungsverhalten der Radiopharmaka führen kann.

Anhand der T2w MRT Sequenzen konnte die Tumormorphologie *in vivo* untersucht werden. Während sich bei allen Tumoren eine zentral betonte Nekrose (entsprechend hypointensen Tumorarealen (35)) entwickelte, zeigte sich diese bei den  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR11 therapierten Tumoren besonders ausgeprägt. Das erneute Tumorstadium nach Abschluss der PRRT fand betont am Tumorrand statt (Abbildung 4). Da die hypointensen Areale auch im Tumorzentrum der Kontrollgruppe zu finden sind, ist eine mögliche Erklärung eine zentrale Minderperfusion bedingt durch das rapide Wachstum dieses artifiziellen Tumormodells, das ab einer bestimmten Tumorstadium, besonders in der Kontrollgruppe, exponentiell zunahm. Bei schnell wachsenden Tumoren ist eine unzureichende Angiogenese beschrieben, welche sich primär in einer zentralen Minderperfusion äußert. Diese generelle wachstumsbedingte zentrale Perfusionsstörung erklärt damit die zentralen Nekrosen auch bei den Kontrolltieren, jedoch nicht den bei therapierten Tieren deutlicher ausgeprägten Gewebsuntergang, speziell in der  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR11 Gruppe.

Champion et al. (36) haben die Verteilung der Elektronendosis von homogen verteiltem Iod-131 in einer Kugel untersucht und fanden in den Randbereichen eine niedrigere Strahlendosis. Obwohl dieses Phänomen eine mögliche Erklärung für die von uns beobachteten Ergebnisse liefert, sind die Annahmen von Champion und Kollegen nur unter Vorbehalt auf unsere aktuelle Studie übertragbar. Zum einen haben wir für beide Radiopharmaka  $^{177}\text{Lu}$  als Betastrahler verwendet, welches eine deutlich geringere Reichweite der Elektronenstrahlung aufweist, und zum anderen sind die Autoren von einer homogenen Verteilung des Betastrahlers ausgegangen, die aber bei den Tumoren aufgrund der relativ inhomogenen Verteilung der SSTR so nicht nachzuweisen ist. Die ausgeprägteren Nekroseareale sind daher in erster Linie auf die höhere Tumorbindung von Radioaktivität (siehe Abbildung 7) und die von uns auch *in vitro* beobachtete höhere zellgebundene Aktivität von  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR11 und damit der höheren Menge und Dichte an zytotoxischen Betateilchen zurückzuführen. Hinzu kommt der *in vitro* beobachtete deutliche Zellzyklusarrest in der G2/M Phase. Die FDG-PET Messungen bestätigen diesen somit zu erwartenden deutlich geringeren Anteil an vitalem Tumorgewebe in den  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR11 therapierten Tumoren bei ähnlicher TumorgroÙe (Abbildung 5). Diese stärkere Zerstörung von vitalem Tumorgewebe durch den SSTR Antagonisten könnte insbesondere in hormonell aktiven NEN einen wesentlichen Vorteil für die symptomatische Therapie bedeuten. Eine weiterführende Untersuchung der SSTR Antagonisten, auch in ihrer nichtradioaktiven Form, als symptomatischer Therapieansatz bei funktionellen NEN wäre demnach interessant. Mittels  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Tekrotyd wurde zunächst vor Beginn der Therapie ein positiver Rezeptorbesatz auf allen inokulierten Tumoren nachgewiesen. Der gemessene Uptake zeigte sich jedoch in allen Therapiegruppen nach Abschluss der Therapie reduziert, besonders auch in der Kontrollgruppe (Therapie mit Kochsalzlösung; Tabelle 4). Einen Erklärungsansatz stellt die oben beschriebene zentrale Perfusionsstörung bei raschem Tumorwachstum und eine konsekutiv verringerte Bioverfügbarkeit im Tumor dar. Eine reduzierte Expression von SSTR auf Tumorzellen nach PRRT konnte zudem auch in anderen Arbeiten beobachtet werden (17, 37). In klinischen Studien wurde ein zunehmend reduziertes Therapieansprechen nach mehreren Therapiezyklen beobachtet (38). Interessanterweise zeigten in der aktuellen Studie die  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR11 therapierten Tumoren trotz des niedrigsten Anteils vitaler Zellen eine wesentlich geringere Reduktion des Nukliduptakes, was z.B. durch einen zunehmenden Uptake pro Zelle, etwa bei höherer SSTR-Expression posttherapeutisch

erklärt werden könnte. Während verschiedene Autoren Selektionsprozesse mit Entstehung aggressiver Zellklone durch die PRRT diskutieren (17, 38, 39), gibt es, nach eingehender Literaturrecherche, aktuell keine Studien, welche eine gesteigerte Rezeptorexpression nach PRRT beschreiben. Der Grund für unsere Beobachtung konnte im Rahmen dieser Studie nicht abschließend geklärt werden, zumal, da die SSTR2 Immunhistochemie von Tumormitte und –rand visuell einen ähnlichen Rezeptorbesatz in allen Gruppen vermuten lässt (Abbildung 6). Dabei muss jedoch angemerkt werden, dass die Immunhistochemie in dieser Studie eine eingeschränkte Aussagekraft hat. Es wurde lediglich exemplarisch eine einzelne Schicht aus der Tumormitte sowie dem Rand gefärbt, sodass die im MRT nachgewiesene Heterogenität des Tumors nicht hinreichend berücksichtigt wurde.

Eine ähnliche Tendenz lässt sich bei der Analyse des Uptakes der jeweiligen Radiopharmaka beobachten. Während in der  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC Gruppe der Uptake beim zweiten Zyklus signifikant reduziert war, zeigte sich für  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR11 ein konstanter bis eher gesteigerter Tumoruptake. Im Vergleich dazu zeigten die Nieren einen konstanten Uptake über beide PRRT Zyklen hinweg (Tabelle 3), sodass dementsprechend der Tumor-to-Kidney Quotient für die SSTR Antagonisten zum zweiten Zyklus hin anstieg (4-fach während des ersten Zyklus, 6-fach während des zweiten Zyklus). Da die Nieren unter anderem als therapielimitierende Organe gelten (40), ist ein möglichst hoher Tumor-to-Kidney Quotient erforderlich für eine erfolgreiche Therapie ohne ausgeprägte nephrotoxische Nebenwirkungen.

Neben der Niere wird auch das Knochenmark als therapielimitierend beschrieben (10). In einer kürzlich veröffentlichten Studie von Reidy-Lagunes et al. (15) zeigte sich eine deutlich erhöhte Inzidenz von Grad 4 hämatotoxischen Nebenwirkungen in einem kleinen Patientenkollektiv nach PRRT mit zwei Zyklen  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR11. Die Autoren reduzierten folglich die applizierte Aktivität um 50 % und beobachteten darunter keine weiteren höhergradigen hämatotoxischen Effekte. Dies liefert uns retrospektiv eine mögliche Erklärung für das unerwartete Versterben aller vier Tiere in unserer Aktivitätsstudie nach Gabe von 30 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR11 im Vergleich zu  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC, das bei gleicher Aktivität zu keinen Todesfällen führte. Obwohl wir aufgrund der fehlenden Blutentnahme der Tiere diese Theorie der erhöhten Knochenmarkstoxizität von  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR11 nicht verifizieren konnten, sollte bei zukünftigen Studien mit  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR11 die Aktivität vorsichtig dosiert werden.

Eine wesentliche Limitation der hier durchgeführten Studie ist die geringe Fallzahl. Aufgrund der sehr zeitaufwändigen multimodalen Bildgebungsverfahren konnte nur eine begrenzte Anzahl an Tieren zu gleichen Zeitpunkten untersucht werden. Eine häufige Wiederholung der Untersuchungen mit jeweils nur einigen wenigen Tieren pro Zeitpunkt war wiederum durch die sehr hohen Kosten für PET- und SPECT-Radiopharmazeutika limitiert. Obwohl dies eine Einschränkung der statistischen Aussagekraft mit sich brachte, konnten durch die multimodale Herangehensweise die getroffenen Aussagen durch verschiedene unterschiedliche Messungen bestätigt werden, sodass trotz einer geringen Fallzahl valide Aussagen getroffen werden konnten. Neben der umfangreicheren Analyse des Therapieansprechens *in vivo* stellt dies einen wesentlichen Vorteil der multimodalen Bildgebung als Mittel zur Therapievalidierung dar.

#### *Schlussfolgerung:*

Die vorliegende Arbeit zeigt auf Basis der detaillierten Vorarbeiten zur Tumorbildgebung mittels MRT (28), dass die kombinierte multimodale Bildgebung mit Kleintier SPECT, PET und MRT ein geeignetes Instrumentarium für die *in vivo* Therapievalidierung einer PRRT an Mäusen darstellt. Während die Abschätzung eines Therapieeffektes ausschließlich anhand der Tumorgröße irreführend sein kann, bieten die verschiedenen Bildgebungsmodalitäten die Möglichkeit, neben Tumorgröße und Volumen weitere relevante, komplementäre Informationen zur Tumorcharakterisierung und zum Therapiemonitoring zu erheben wie z.B. Daten zu Tumurvitalität, Metabolismus und Rezeptorbesatz. Damit bietet die multimodale Bildgebung mit dedizierten Kleintierscannern bei Versuchstieren vergleichbare Möglichkeiten wie die Bildgebung im Rahmen des klinischen Stagings und Therapiemonitorings bei Patienten mit NEN.

Bezüglich des Vergleichs des neuen SSTR Antagonisten  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR1 mit dem klinisch etablierten Agonisten  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC fanden wir *in vitro* eine deutlich höhere Menge gebundener Aktivität sowie eine 6-fach höhere Affinität für den SSTR 2 für  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR11. Eine deutliche, aktivitätsabhängige Akkumulation von Tumorzellen in der G2/M Phase impliziert einen ausgeprägten zytotoxischen Effekt verglichen mit  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC. Passend hierzu konnten wir *in vivo* zeigen, dass  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-JR11 zu einer deutlich stärkeren Zerstörung von Tumorgewebe führt, eine eindeutige Volumenreduktion und eine längere Wachstumsverzögerung induziert sowie mit einem

signifikant längeren Überleben (median 207 vs. 126 Tage) assoziiert ist. Im Hinblick auf nephrotoxische Nebenwirkungen stellt sich der Antagonist mit einem vorteilhaften und über zwei Therapiezyklen hinweg konsistenteren Tumor-to-Kidney Quotienten dar. Insgesamt zeigt die vorliegende Arbeit somit einen deutlich besseren Therapieeffekt des radiomarkierten SSTR Antagonisten <sup>177</sup>Lu-DOTA-JR11 und empfiehlt das Radiopharmakon für weiterführende klinische Studien.

### 3.5 Literaturverzeichnis

1. Albrecht J, Exner S, Groetzinger C, Prasad S, Konietschke F, Beindorff N, Kuehl AA, Prasad V, Brenner W, Koziol E. Multimodal imaging of two-cycle PRRT with (177)Lu-DOTA-JR11 and (177)Lu-DOTATOC in an orthotopic neuroendocrine xenograft tumor mouse model. *J Nucl Med.* 2020.
2. Yao JC, Hassan M, Phan A, Dagohoy C, Leary C, Mares JE, Abdalla EK, Fleming JB, Vauthey JN, Rashid A, Evans DB. One hundred years after "carcinoid": epidemiology of and prognostic factors for neuroendocrine tumors in 35,825 cases in the United States. *J Clin Oncol.* 2008;26(18):3063-72.
3. Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie V-uS, Netzwerk Neuroendokrine Tumoren e V, Bundesorganisation Selbsthilfe NeuroEndokrine Tumoren e V, Deutsche Gesellschaft für Hamatologie und Medizinische Onkologie e.V uAIOdDKeV, Deutsche Gesellschaft für Allgemein- und Viszeralchirurgie e V, Deutsche Gesellschaft für C, Deutsche Gesellschaft für Endoskopie und Bildgebende V, Deutsche Gesellschaft für Nuklearmedizin e V, Deutsche Gesellschaft für Innere M, Deutsche Gesellschaft für E, Deutsche Gesellschaft für Palliativmedizin e V, Deutsche Röntgengesellschaft e V, Deutsche Gesellschaft für Pathologie e VBDP, Deutsche Gesellschaft für interventionelle R, Authors, Collaborators. [Practice guideline neuroendocrine tumors - AWMF-Reg. 021-27]. *Z Gastroenterol.* 2018;56(6):583-681.
4. Pavel M, O'Toole D, Costa F, Capdevila J, Gross D, Kianmanesh R, Krenning E, Knigge U, Salazar R, Pape UF, Oberg K, Vienna Consensus Conference p. ENETS Consensus Guidelines Update for the Management of Distant Metastatic Disease of Intestinal, Pancreatic, Bronchial Neuroendocrine Neoplasms (NEN) and NEN of Unknown Primary Site. *Neuroendocrinology.* 2016;103(2):172-85.
5. Hicks RJ, Kwekkeboom DJ, Krenning E, Bodei L, Grozinsky-Glasberg S, Arnold R, Borbath I, Cwikla J, Toumpanakis C, Kaltsas G, Davies P, Horsch D, Tiensuu Janson E, Ramage J, Antibes Consensus Conference p. ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Neoplasia: Peptide Receptor Radionuclide Therapy with Radiolabeled Somatostatin Analogues. *Neuroendocrinology.* 2017;105(3):295-309.

6. Bodei L, Kidd M, Paganelli G, Grana CM, Drozdov I, Cremonesi M, Lepensky C, Kwekkeboom DJ, Baum RP, Krenning EP, Modlin IM. Long-term tolerability of PRRT in 807 patients with neuroendocrine tumours: the value and limitations of clinical factors. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2015;42(1):5-19.
7. Falconi M, Eriksson B, Kaltsas G, Bartsch DK, Capdevila J, Caplin M, Kos-Kudla B, Kwekkeboom D, Rindi G, Kloppel G, Reed N, Kianmanesh R, Jensen RT, Vienna Consensus Conference p. ENETS Consensus Guidelines Update for the Management of Patients with Functional Pancreatic Neuroendocrine Tumors and Non-Functional Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *Neuroendocrinology*. 2016;103(2):153-71.
8. Strosberg J, El-Haddad G, Wolin E, Hendifar A, Yao J, Chasen B, Mittra E, Kunz PL, Kulke MH, Jacene H, Bushnell D, O'Dorisio TM, Baum RP, Kulkarni HR, Caplin M, Lebtahi R, Hobday T, Delpassand E, Van Cutsem E, Benson A, Srirajaskanthan R, Pavel M, Mora J, Berlin J, Grande E, Reed N, Seregni E, Oberg K, Lopera Sierra M, Santoro P, Thevenet T, Erion JL, Ruzsiewicz P, Kwekkeboom D, Krenning E, Investigators N-T. Phase 3 Trial of (177)Lu-Dotatate for Midgut Neuroendocrine Tumors. *N Engl J Med*. 2017;376(2):125-35.
9. Ginj M, Zhang H, Waser B, Cescato R, Wild D, Wang X, Erchegyi J, Rivier J, Macke HR, Reubi JC. Radiolabeled somatostatin receptor antagonists are preferable to agonists for in vivo peptide receptor targeting of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(44):16436-41.
10. Nicolas GP, Mansi R, McDougall L, Kaufmann J, Bouterfa H, Wild D, Fani M. Biodistribution, Pharmacokinetics, and Dosimetry of (177)Lu-, (90)Y-, and (111)In-Labeled Somatostatin Receptor Antagonist OPS201 in Comparison to the Agonist (177)Lu-DOTATATE: The Mass Effect. *J Nucl Med*. 2017;58(9):1435-41.
11. Dalm SU, Nonnekens J, Doeswijk GN, de Blois E, van Gent DC, Konijnenberg MW, de Jong M. Comparison of the Therapeutic Response to Treatment with a 177Lu-Labeled Somatostatin Receptor Agonist and Antagonist in Preclinical Models. *J Nucl Med*. 2016;57(2):260-5.

12. Beykan S, Dam JS, Eberlein U, Kaufmann J, Kjaergaard B, Jodal L, Bouterfa H, Bejot R, Lassmann M, Jensen SB. (177)Lu-OPS201 targeting somatostatin receptors: in vivo biodistribution and dosimetry in a pig model. *EJNMMI Res.* 2016;6(1):50.
13. Beykan S, Fani M, Jensen SB, Nicolas G, Wild D, Kaufmann J, Lassmann M. In Vivo Biokinetics of (177)Lu-OPS201 in Mice and Pigs as a Model for Predicting Human Dosimetry. *Contrast Media Mol Imaging.* 2019;2019:6438196.
14. Wild D, Fani M, Fischer R, Del Pozzo L, Kaul F, Krebs S, Fischer R, Rivier JE, Reubi JC, Maecke HR, Weber WA. Comparison of somatostatin receptor agonist and antagonist for peptide receptor radionuclide therapy: a pilot study. *J Nucl Med.* 2014;55(8):1248-52.
15. Reidy-Lagunes D, Pandit-Taskar N, O'Donoghue JA, Krebs S, Staton KD, Lyashchenko SK, Lewis JS, Raj N, Gonen M, Lohrmann C, Bodei L, Weber WA. Phase I Trial of Well-Differentiated Neuroendocrine Tumors (NETs) with Radiolabeled Somatostatin Antagonist (177)Lu-Satoreotide Tetraxetan. *Clin Cancer Res.* 2019;25(23):6939-47.
16. Fani M, Braun F, Waser B, Beetschen K, Cescato R, Erchegyi J, Rivier JE, Weber WA, Maecke HR, Reubi JC. Unexpected sensitivity of sst2 antagonists to N-terminal radiometal modifications. *J Nucl Med.* 2012;53(9):1481-9.
17. Feijtel D, Doeswijk R, Verkaik N, Haeck J, Chicco D, Angotti C, Konijnenberg M, de Jong M, Nonnekens JJT. Inter and intra-tumor somatostatin receptor 2 heterogeneity influences peptide receptor radionuclide therapy response. 2020;11(2):491-505.
18. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, Dancey J, Arbuck S, Gwyther S, Mooney M, Rubinstein L, Shankar L, Dodd L, Kaplan R, Lacombe D, Verweij J. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer.* 2009;45(2):228-47.

19. Seymour L, Bogaerts J, Perrone A, Ford R, Schwartz LH, Mandrekar S, Lin NU, Litiere S, Dancey J, Chen A, Hodi FS, Therasse P, Hoekstra OS, Shankar LK, Wolchok JD, Ballinger M, Caramella C, de Vries EGE, group Rw. iRECIST: guidelines for response criteria for use in trials testing immunotherapeutics. *Lancet Oncol.* 2017;18(3):e143-e52.
20. de Mestier L, Dromain C, d'Assignies G, Scoazec JY, Lassau N, Lebtahi R, Brixi H, Mitry E, Guimbaud R, Courbon F, d'Herbomez M, Cadiot G. Evaluating digestive neuroendocrine tumor progression and therapeutic responses in the era of targeted therapies: state of the art. *Endocr Relat Cancer.* 2014;21(3):R105-20.
21. Killion JJ, Radinsky R, Fidler IJ. Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice. *Cancer Metastasis Rev.* 1998;17(3):279-84.
22. Bibby MC. Orthotopic models of cancer for preclinical drug evaluation: advantages and disadvantages. *Eur J Cancer.* 2004;40(6):852-7.
23. Perren A, Couvelard A, Scoazec JY, Costa F, Borbath I, Delle Fave G, Gorbounova V, Gross D, Grossma A, Jense RT, Kulke M, Oeberg K, Rindi G, Sorbye H, Welin S, Antibes Consensus Conference p. ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Tumors: Pathology: Diagnosis and Prognostic Stratification. *Neuroendocrinology.* 2017;105(3):196-200.
24. Kayani I, Bomanji JB, Groves A, Conway G, Gacinovic S, Win T, Dickson J, Caplin M, Ell PJ. Functional imaging of neuroendocrine tumors with combined PET/CT using <sup>68</sup>Ga-DOTATATE (DOTA-DPhe<sup>1</sup>,Tyr<sup>3</sup>-octreotate) and <sup>18</sup>F-FDG. *Cancer.* 2008;112(11):2447-55.
25. Binderup T, Knigge U, Loft A, Federspiel B, Kjaer A. <sup>18</sup>F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography predicts survival of patients with neuroendocrine tumors. *Clin Cancer Res.* 2010;16(3):978-85.
26. Severi S, Nanni O, Bodei L, Sansovini M, Ianniello A, Nicoletti S, Scarpi E, Matteucci F, Gilardi L, Paganelli G. Role of <sup>18</sup>FDG PET/CT in patients treated with

<sup>177</sup>Lu-DOTATATE for advanced differentiated neuroendocrine tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2013;40(6):881-8.

27. Exner S, Prasad V, Wiedenmann B, Grotzinger C. Octreotide Does Not Inhibit Proliferation in Five Neuroendocrine Tumor Cell Lines. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:146.

28. Albrecht J, Polenz D, Kuhl AA, Rogasch JMM, Leder A, Sauer IM, Babos M, Mocsai G, Beindorff N, Steffen IG, Brenner W, Koziolok EJ. Diffusion-weighted magnetic resonance imaging using a preclinical 1 T PET/MRI in healthy and tumor-bearing rats. *EJNMMI Res*. 2019;9(1):21.

29. Friedrich S, Brunner E, Pauly M. Permuting longitudinal data in spite of the dependencies. *Journal of Multivariate Analysis*. 2017;153(C):255-65.

30. Noguchi K, Gel YR, Brunner E, Konietzschke F. nparLD: An R Software Package for the Nonparametric Analysis of Longitudinal Data in Factorial Experiments. 2012. 2012;50(12):23 %J *Journal of Statistical Software*.

31. Pozzari M, Maisonneuve P, Spada F, Berruti A, Amoroso V, Cella CA, Laffi A, Pellicori S, Bertani E, Fazio N. Systemic therapies in patients with advanced well-differentiated pancreatic neuroendocrine tumors (PanNETs): When cytoreduction is the aim. A critical review with meta-analysis. *Cancer Treat Rev*. 2018;71:39-46.

32. Partelli S, Bertani E, Bartolomei M, Perali C, Muffatti F, Grana CM, Schiavo Lena M, Doglioni C, Crippa S, Fazio N, Zamboni G, Falconi M. Peptide receptor radionuclide therapy as neoadjuvant therapy for resectable or potentially resectable pancreatic neuroendocrine neoplasms. *Surgery*. 2018;163(4):761-7.

33. Baum RP, Kluge AW, Kulkarni H, Schorr-Neufing U, Niepsch K, Bitterlich N, van Echteld CJ. [(177)Lu-DOTA](0)-D-Phe(1)-Tyr(3)-Octreotide ((177)Lu-DOTATOC) For Peptide Receptor Radiotherapy in Patients with Advanced Neuroendocrine Tumours: A Phase-II Study. *Theranostics*. 2016;6(4):501-10.

34. Ho KS, Poon PC, Owen SC, Shoichet MS. Blood vessel hyperpermeability and pathophysiology in human tumour xenograft models of breast cancer: a comparison of ectopic and orthotopic tumours. *BMC Cancer*. 2012;12:579.
35. Jardim-Perassi BV, Huang S, Dominguez-Viqueira W, Poleszczuk J, Budzevich MM, Abdalah MA, Pillai SR, Ruiz E, Bui MM, Zuccari D, Gillies RJ, Martinez GV. Multiparametric MRI and Coregistered Histology Identify Tumor Habitats in Breast Cancer Mouse Models. *Cancer Res*. 2019;79(15):3952-64.
36. Champion C, Zanotti-Fregonara P, Hindie E. CELLDOSE: a Monte Carlo code to assess electron dose distribution--S values for <sup>131</sup>I in spheres of various sizes. *J Nucl Med*. 2008;49(1):151-7.
37. Schiavo Lena M, Partelli S, Castelli P, Andreasi V, Smart CE, Pisa E, Bartolomei M, Bertani E, Zamboni G, Falconi M, Doglioni C. Histopathological and Immunophenotypic Changes of Pancreatic Neuroendocrine Tumors after Neoadjuvant Peptide Receptor Radionuclide Therapy (PRRT). *Endocr Pathol*. 2020;31(2):119-31.
38. Yordanova A, Mayer K, Brossart P, Gonzalez-Carmona MA, Strassburg CP, Essler M, Ahmadzadehfar H. Safety of multiple repeated cycles of (<sup>177</sup>)Lu-octreotate in patients with recurrent neuroendocrine tumour. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2017;44(7):1207-14.
39. Graf J, Pape U-F, Jann H, Denecke T, Arsenic R, Brenner W, Pavel M, Prasad V. Prognostic Significance of Somatostatin Receptor Heterogeneity in Progressive Neuroendocrine Tumor Treated with Lu-177 DOTATOC or Lu-177 DOTATATE. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2020;47(4):881-94.
40. van Essen M, Krenning EP, Kam BL, de Jong M, Valkema R, Kwekkeboom DJ. Peptide-receptor radionuclide therapy for endocrine tumors. *Nat Rev Endocrinol*. 2009;5(7):382-93.

#### **4. Eidesstattliche Versicherung**

„Ich, Jakob Albrecht, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Direkter Vergleich der Peptid Rezeptor Radionuklidtherapie an Neuroendokrinen Neoplasien mit <sup>177</sup>Lu-DOTATOC und <sup>177</sup>Lu-DOTA-JR11 im Kleintiermodell mittels multimodaler Bildgebung* selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Erstbetreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## 5. Anteilserklärung

### **Multimodal Imaging of 2-Cycle PRRT with <sup>177</sup>Lu-DOTA-JR11 and <sup>177</sup>Lu-DOTATOC in an Orthotopic Neuroendocrine Xenograft Tumor Mouse Model.**

**Albrecht J**, Exner S, Grötzinger C, Prasad S, Konietschke F, Beindorff N, Kühl AA, Prasad V, Brenner W, Koziol EJ. J Nucl Med. 2021 Mar;62(3):393-398. doi: 10.2967/jnumed.120.250274. Epub 2020 Aug 28. PMID: 32859703

#### Ausführliche Anteilserklärung:

1. Planung und Miterstellung des Tierversuchsantrages
2. Planung und Durchführung der Vorbereitungsversuche. Daraus sind entstanden:
  - a. Die Operationstechnik wie in Material und Methoden beschrieben.
  - b. Die letztlich verwendeten Bildgebungsprotokolle (Material und Methoden) sowie Tabelle 1, Tabelle 2 und die Publikation 1) von Albrecht et al. wie in Punkt 8. aufgeführt.
  - c. Das Therapieschema (Dosierung, Intervall) sowie Abbildung 2.
3. Die praktische Durchführung sämtlicher Operationen sowie der überwiegenden Anzahl der Bildgebungen.
4. Auswertung und Interpretation der Bilddaten sowie die Durchführung der deskriptiven Statistik. Daraus sind entstanden:
  - a. Abbildung 2, 3, 4, 5 und 7.
  - b. Tabelle 2 und 3.
5. Manuskripterstellung und Einreichen der Publikation.

---

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

---

Unterschrift des Doktoranden

## 6. Auszug aus der Journal Summary List (ISi Web of KnowledgeSM)

### Multimodal Imaging of 2-Cycle PRRT with <sup>177</sup>Lu-DOTA-JR11 and <sup>177</sup>Lu-DOTATOC in an Orthotopic Neuroendocrine Xenograft Tumor Mouse Model.

**Albrecht J**, Exner S, Grötzinger C, Prasad S, Konietschke F, Beindorff N, Kühl AA, Prasad V, Brenner W, Koziolk EJ. J Nucl Med. 2021 Mar;62(3):393-398. doi: 10.2967/jnumed.120.250274. Epub 2020 Aug 28. PMID: 32859703

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2018** Selected Editions: SCIE,SSCI  
 Selected Categories: **“RADIOLOGY, NUCLEAR MEDICINE and MEDICAL IMAGING”** Selected Category Scheme: WoS  
**Gesamtanzahl: 129 Journale**

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	JACC-Cardiovascular Imaging	8,801	10.975	0.026160
2	MEDICAL IMAGE ANALYSIS	7,694	8.880	0.013370
3	IEEE TRANSACTIONS ON MEDICAL IMAGING	19,545	7.816	0.024990
4	RADIOLOGY	54,641	7.608	0.061300
5	JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE	27,551	7.354	0.037990
6	EUROPEAN JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE AND MOLECULAR IMAGING	15,406	7.182	0.024760
7	CLINICAL NUCLEAR MEDICINE	4,922	6.498	0.007680

## **6. Druckexemplare der Publikation**

<https://doi.org/10.2967/jnumed.120.250274>











## **7. Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



## 8. Publikationsliste

### 1) Diffusion-weighted magnetic resonance imaging using a preclinical 1 T PET/MRI in healthy and tumor-bearing rats.

**Albrecht J**, Polenz D, Kühl AA, Rogasch JMM, Leder A, Sauer IM, Babos M, Mócsai G, Beindorff N, Steffen IG, Brenner W, Koziolok EJ. *EJNMMI Res.* 2019 Feb 22;9(1):21. doi: 10.1186/s13550-019-0489-6.

### 2) Relationship of Renal Function in Mice to Strain, Sex and <sup>177</sup>Lutetium-Somatostatin Receptor Ligand Treatment.

Mohan AM, Lukas M, **Albrecht J**, Dorau-Rutke V, Koziolok EJ, Huang K, Prasad S, Brenner W, Beindorff N. *Nuklearmedizin.* 2020 Sep;59(5):381-386. doi: 10.1055/a-1103-1661. Epub 2020 Feb 19.

### 3) The role of visceral adiposity in the severity of COVID-19: Highlights from a unicenter cross-sectional pilot study in Germany.

Petersen A, Bressemer K, **Albrecht J**, Thieß HM, Vahldiek J, Hamm B, Makowski MR, Niehues A, Niehues SM, Adams LC. *Metabolism.* 2020 Sep;110:154317. doi: 10.1016/j.metabol.2020.154317. Epub 2020 Jul 14.

### 4) Multimodal Imaging of 2-Cycle PRRT with <sup>177</sup>Lu-DOTA-JR11 and <sup>177</sup>Lu-DOTATOC in an Orthotopic Neuroendocrine Xenograft Tumor Mouse Model.

**Albrecht J**, Exner S, Grötzinger C, Prasad S, Konietschke F, Beindorff N, Kühl AA, Prasad V, Brenner W, Koziolok EJ. *J Nucl Med.* 2021 Mar;62(3):393-398. doi: 10.2967/jnumed.120.250274. Epub 2020 Aug 28. PMID: 32859703

### 5) Is lung density associated with severity of COVID-19?

Bressemer KK, Adams LC, **Albrecht J**, Petersen A, Thieß HM, Niehues A, Niehues SM, Vahldiek JL. *Pol J Radiol.* 2020 Oct 30;85:e600-e606. doi: 10.5114/pjr.2020.100788. eCollection 2020.

**6) Does the proteasome inhibitor bortezomib sensitize to DNA-damaging therapy in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms? - A preclinical assessment in vitro and in vivo.**

Briest F, Koziolok EJ, **Albrecht J**, Schmidt F, Bernsen MR, Haeck J, Kühl AA, Sedding D, Hartung T, Exner S, Welzel M, Fischer C, Grötzinger C, Brenner W, Baum RP, Grabowski P. *Neoplasia*. 2020 Nov 24;23(1):80-98. doi: 10.1016/j.neo.2020.11.004. Online ahead of print.

**Kongressbeiträge:**

Posterpräsentation: WMIC 2016 (annual meeting; World Molecular Imaging Congress), New York City, USA: „Hybrid-PET/MRI imaging: Orthotopic neuroendocrine tumors of the pancreas show great differences in tumor perfusion and growth compared to subcutaneous tumors“

## **9. Danksagung**

Mein außerordentlicher Dank geht an meine Betreuer Prof. Dr. med. W. Brenner und Dr. sc. hum. Eva J. Koziolok für die stetige Ansprechbarkeit und Unterstützung sowie die konstruktive Kritik und Förderung des Projektes.

Des Weiteren danke ich PD Dr. med. V. Prasad für die Überlassung des Forschungsthemas, Dr. med. vet. N. Beindorff für die technisch-praktische Unterstützung an den Großgeräten sowie allen weiteren Autoren des Projekts für die freundliche und kooperative Zusammenarbeit.

Zuletzt danke ich auch meiner Familie für die emotionale Unterstützung während der intensiven Arbeitszeit an der Dissertation.