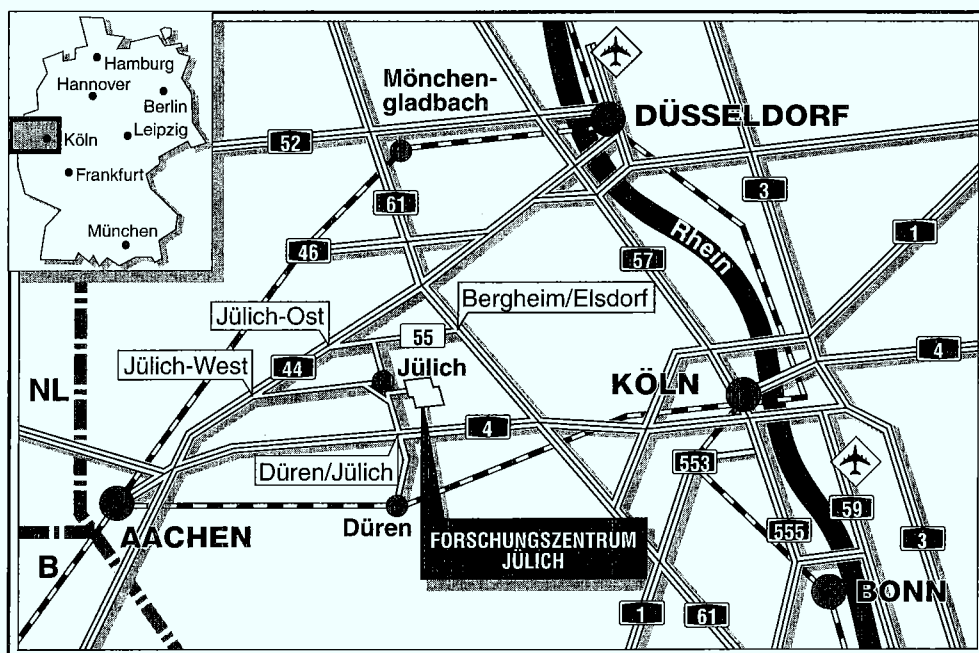


Institut für Nuklearchemie

**Radiochemische Untersuchungen zur
Proteinbindung und Knochenmeta-
stasenaffinität von Y(III)-Komplexen**

Bernd Neumaier



Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3236

ISSN 0944-2952

Institut für Nuklearchemie Jül-3236

D 38 (Diss. Universität Köln)

Zu beziehen durch : Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek

D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

Telefon: 02461/61-61 02 · Telefax: 02461/61-61 03 · Telex: 833556-70 kfa d

Radiochemische Untersuchungen zur Proteinbindung und Knochenmeta- stasenaffinität von Y(III)-Komplexen

Bernd Neumaier

Abstract

^{90}Y is used routinely for different radiotherapeutic applications like radiosynovio-thesis and palliative therapy of multiple bone metastases. But detailed information on the biochemical pathways of cationic and complexed radiometal is still missing and prevents a full utilization of its therapeutic potential.

The experiments here focus on the binding of radioyttrium (either in the form of no carrier added ^{88}Y and ^{86}Y , or as carrier added tracer using given amounts of $^{\text{nat}}\text{Y}(\text{III})$) to blood constituents. Systematic studies on the binding of radioyttrium to human serum albumin (HSA) as a model serum protein were carried out by gel- (GF) and ultrafiltration (UF). Binding of radioyttrium to HSA is low (5% determined by GF and 20 % by UF) in the presence of many endogenous anions (Cl^- , NO_3^- , F^- , HCO_3^- and OH^-) but increases significantly in the case of phosphate (80% (GF) and 95% (UF)). On the other hand the phosphate anion was bound significantly to HSA only in the presence of yttrium as was determined with ^{32}P labelled phosphate. An analysis of this ternary system showed that yttrium and phosphate are bound simultaneously to HSA in a stoichiometric ratio of 1:1. The formation constant of the postulated ternary complex was estimated to be $\log\beta = 10.9$ ($I = 0.15 \text{ M}$; $T = 25^\circ\text{C}$) determined by competitive experiments.

Concerning the chemical mode of this binding, the carboxylate groups of the peptide chain were found to be responsible for the binding of ^{88}Y and $[^{32}\text{P}]\text{PO}_4^{3-}$ to serum proteins as was deduced from studies with homopolyaminoacids. The number of binding sites for $\text{Y}(\text{III})$ and PO_4^{3-} on HSA and apo-transferrin was determined to be 14 or 7 which suprisingly corresponds exactly to the number of vicinal aspartic and glutamic acids in the two peptide chains of the serum proteins. Although all experimental correlations strongly speak in favour of a ternary complex formation, a colloidal system stabilized by macromolecular polyelectrolyts cannot be completely excluded.

An extension of the studies to other trivalent metals showed that the tendency to build a ternary complex is a function of their ionic radii. Whereas light and transition lanthanides with large radii have a distinct inclination toward the building of a ternary compound, this becomes lower when the radius of the metal decreases. Moreover, when the radius decreases further as in the case of metals of the III main group, no such ternary compound can be observed. This tendency deduced by indirect measurements with $[^{32}\text{P}]\text{PO}_4^{3-}$ could be confirmed in binding studies with ^{67}Ga , ^{139}Ce , ^{143}Pm , ^{145}Sm , ^{159}Dy , ^{169}Yb and ^{173}Lu .

The results obtained for the in vitro model were transferred to medical studies in order to analyse the in vivo behavior of radioyttrium in animal experiments and

PET-studies (the latter using the β^+ emitting ^{86}Y) with patients suffering from multiple bone metastases: after i.v. application of n.c.a. yttrium either as citrate or EDTMP complex the fate of the metal-ion depends on the stability of the injected complex. Strong Y(III)-complexes such as Y-EDTMP are rapidly excreted without significant retention in soft tissues. Complexes of medium stability are in part transchelated to serum constituents resulting in a more complex distribution pattern. A low molecular fraction is responsible for the accumulation of radiometal in bone and bone metastases and another high molecular one represents the ternary complex which predominantly accumulates in the liver.

As a conclusion from these bioinorganic studies the use of radiometal chelates in endoradiotherapy with metals having a small ionic radius (e.g. ^{166}Ho , ^{169}Er and ^{177}Lu) will be superior to those with a large one as the unwanted liver accumulation will be considerably reduced due to their low tendency to form ternary complexes with blood serum constituents.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Therapeutische Radionuklide	1
1.2	Strahlenbiologische Eigenschaften	2
1.3	Medizinische Anwendung von ^{90}Y	5
1.3.1	Schmerztherapie bei Knochenmetastasen	5
1.3.2	^{90}Y -Therapie mit Partikeln	8
1.3.3	Radioimmunotherapie	9
1.4	In vivo-Verhalten dreiwertiger Radionuklide	11
1.4.1	Organverteilung verschiedener Yttrium-Verbindungen	11
1.4.2	Vergleich der Bioverteilung von Yttrium und anderen dreiwertigen Metallen	12
1.4.3	Knochenaffinität dreiwertiger Metall-Ionen	14
1.4.4	Tumoraaffinität dreiwertiger Metall-Ionen	15
1.5	Physikochemischer Zustand dreiwertiger Metalle im Blut	17
1.6	Bindung von Yttrium und Lanthaniden an Serumproteine	18
2	Problemstellung	21
3	Experimentelles	24
3.1	Radionuklide	24
3.1.1	$^{86}\text{Y}/^{88}\text{Y}$	24
3.1.2	Spallationsproduzierte Radiolanthanide	25
3.1.3	^{67}Ga	26
3.1.4	Andere Radionuklide	27
3.2	Materialien	28
3.3	Methoden	30
3.3.1	Aktivitätsmessung	30
3.3.2	pH-Messung	31
3.3.3	Dialyse	32
3.3.4	Refraktometrie	32
3.3.5	Chromatographie verschiedener ^{88}Y -Komplexe	33
3.3.6	Trennung von proteingebundenem von nicht-gebundenem Radiometall	34

3.3.7	Radiometall-Proteinbindungsstudien	35
3.3.8	Tierexperimentelle Studien	40
3.3.9	PET- und radiochemische Studien mit [^{86}Y]Citrat und [^{86}Y]EDTMP an Patienten	42
3.3.10	In vitro-Knochenmodell-Studien	42

4 Ergebnisse und Diskussion

44

4.1	Untersuchungen zur pH-Stabilität von ^{88}Y -Komplexen	44
4.1.1	Radiopapierchromatographie	44
4.1.2	Radiopapierelektrophorese	47
4.2	Analyse des Blutserums von Knochenmetastasen-Patienten	52
4.3	Einfluß endogener Anionen auf die Bindung von Yttrium an HSA	53
4.4	Untersuchung des Yttrium-Phosphat-HSA-Systems	54
4.4.1	Bindung von [^{88}Y]Y(III) und [^{32}P]PO ₄ an HSA in Abhängigkeit von der Inkubationszeit	54
4.4.2	Bindung von [^{88}Y]Y(III) und [^{32}P]PO ₄ an HSA in Abhängigkeit vom Y(III)-Trägergehalt	56
4.4.3	Bindung von [^{88}Y]Y(III) und [^{32}P]PO ₄ an HSA in Abhängigkeit vom pH-Wert	58
4.4.4	Bindung von [^{88}Y]Y(III) und [^{32}P]PO ₄ an HSA in Abhängigkeit von der HSA-Konzentration	62
4.4.5	Bestimmung der Anzahl der Bindungsstellen für die simultane Bindung von [^{88}Y]Y(III) und [^{32}P]PO ₄ an HSA	64
4.4.6	Stabilität der ternären Verbindung gegenüber verschiedenen Komplexliganden	65
4.5	Untersuchung anderer Yttrium-Phosphat-Polyelektrolyt-Systeme	68
4.5.1	Bindung von [^{88}Y]Y(III) und [^{32}P]PO ₄ an Serumproteine in mit [^{32}P]PO ₄ markiertem Vollblutserum in Abhängigkeit vom Y(III)-Trägergehalt	68
4.5.2	Bindung von [^{88}Y]Y(III) und [^{32}P]PO ₄ an apo-Transferrin in Abhängigkeit vom Y(III)-Trägergehalt	70
4.5.3	Bindung von [^{88}Y]Y(III) und [^{32}P]PO ₄ an apo-Transferrin in Abhängigkeit von der apo-Transferrin-Konzentration	72
4.5.4	Bindung von [^{88}Y]Y(III) und [^{32}P]PO ₄ an Polyglutaminsäure in Abhängigkeit vom Y(III)-Trägergehalt	73
4.6	Einfluß dreiwertiger Metalle auf die Bindung von [^{32}P]PO ₄ an HSA	75

4.7	Bindung von [^{67}Ga] Ga(III) an Serumproteine	77
4.7.1	Bindung von [^{67}Ga] Ga(III) an HSA	77
4.7.2	Bindung von [^{67}Ga] Ga(III) an apo-Transferrin	78
4.8	Bindung von Radiolanthaniden an HSA	79
4.8.1	Einfluß von Phosphat auf die Bindung von Radiolanthaniden an HSA	79
4.8.2	Einfluß von Phosphat auf die Simultanbindung von ^{139}Ce , ^{143}Pm , und ^{173}Lu an HSA	81
4.9	Vergleich zwischen dem in vivo-Verhalten von [^{88}Y]Chlorid, [^{88}Y] Y(III) -Citrat und der ternären Verbindung zwischen [^{88}Y] Y(III) , [^{32}P] PO_4 und HSA	83
4.10	Vergleich des in vivo-Verhaltens von [^{86}Y]Citrat und [^{86}Y]EDTMP mittels PET-Studien an Patienten	85
4.11	Adsorption von [^{88}Y] Y(III) -Citrat, [^{88}Y] Y(III) -EDTA und [^{88}Y] Y(III) -EDTMP an Hydroxylapatit	88
4.12	Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse und Schlußfolgerung	92
4.12.1	Ergebnisse und Vergleich mit der Literatur	92
4.12.2	Quantifizierung der Bindungsverhältnisse	94
4.12.3	Modellvorstellungen zur ternären Verbindung zwischen Yttrium, Phosphat und Serumproteinen	95
4.12.4	Medizinische Schlußfolgerung	98
5	Zusammenfassung	102
6	Anhang	105
	Organkinetik von [^{88}Y]Chlorid, [^{88}Y] Y(III) -Citrat und der ternären Verbindung zwischen [^{88}Y] Y(III) , [^{32}P] PO_4 und HSA	105
7	Literaturverzeichnis	107
8	Danksagungen	

1 Einleitung

1.1 Therapeutische Radionuklide

Die Verwendung von therapeutischen Radionukliden ist zu einem integralen Bestandteil in der Krebstherapie geworden. Das Prinzip dieser Methode besteht aus einer Applikation der Radionuklide in ionischer Form oder mit tumorsuchenden Substraten, so daß eine präferentielle Einlagerung in mit Tumorzellen befallenes Gewebe resultiert. Diese Lokalisierung der Radionuklide auf das Tumorgewebe bewirkt, daß sich dort ausreichend hohe Strahlendosen zur Zerstörung der Tumorzellen unter optimalem Schutz gesunden Gewebes entfalten können.

Radionuklide mit therapeutischem Potential sind in erster Linie: α - (z.B.: ^{212}Bi und ^{211}At), β^- -Teilchen- (vgl. Tab.1.1) und Auger-Elektronen-Emitter (z.B.: ^{67}Ga , ^{125}I , ^{197}Hg etc.). Für therapeutische Zwecke eignen sich idealerweise Zerfallsprozesse, die nicht von γ -Emissionen begleitet werden, da γ -Strahlung kaum therapeutischen Nutzen besitzt und darüber hinaus zu erhöhter Strahlenbelastung von vom Zielgewebe weiter entfernten gesunden Organen führt.

β^- -emittierende Radionuklide werden bislang als einzige der oben genannten Teilchen-Emitter in der klinischen Routine eingesetzt. Dies liegt zum größten Teil an ihrer leichteren kommerziellen Verfügbarkeit, da sie bequem am Reaktor über (n, γ)-Prozesse herstellbar sind. Des weiteren stehen, bedingt durch die Variabilität in der β^- -Energie, für unterschiedliche Therapieprobleme geeignete β^- -Emitter mit den jeweils erforderlichen Reichweiten im Gewebe zur Verfügung. Die reaktorproduzierten β^- -Emitter sind allerdings nicht trägerfrei, woraus nachteilige geringe spezifische Aktivitäten resultieren. Trägerfreie β^- -Emitter sind jedoch durch indirekte (n, γ)- β^- -Folgeprozesse am Reaktor, Produktion am Zyklotron oder aber über kostengünstige Generatorsysteme, wobei das therapeutisch nutzbare Nuklid durch Zerfall des längerlebigen Mutternuklids entsteht, zugänglich. Gerade letztere Methode ist für einen routinemäßigen Einsatz von Radionukliden in der Therapie besonders günstig. In Tab.1.1 sind einige β^- -Emitter mit ihren wichtigsten Zerfallseigenschaften und ihrer jeweiligen Herstellungsrouten aufgelistet.

Tab.1.1: Übersicht über therapeutisch relevante β^- -Teilchen emittierende Radionuklide

Radionuklid	HWZ [d]	$E_{\beta^- \text{max}}$ [MeV]	Haupt- γ -Energien [keV]	Produktionsroute*
^{32}P	14,2	1,71	-	R
^{76}As	1,1	3,0	-	R
^{90}Y	2,7	2,27	-	G
^{105}Rh	1,48	1,0	319 (19%)	R
^{109}Pd	0,56	1,0	88 (3,6%)	R
^{111}Ag	7,45	1,0	342 (6,7%)	R
^{121}Sn	1,13	0,38	-	R
^{149}Pm	2,21	1,1	286 (2,9%)	R,Z
^{153}Sm	1,95	0,81	103 (28,3%)	R
^{165}Dy	0,096	1,34	95 (4%)	R
^{166}Ho	1,1	1,6	81 (6,3 %)	R
^{169}Er	9,6	0,34	-	R,Z
^{177}Lu	6,7	0,5	113 (6,4%) 208 (11%)	R
^{186}Re	3,7	1,07	137 (9%)	R,Z
^{188}Re	0,71	2,11	155 (15%)	R,G
^{199}Au	3,14	0,5	158 (36,9%) 208 (8,4%)	R

* R = reaktorproduziert; Z = zyklotronproduziert ; G = Generatorsystem

1.2 Strahlenbiologische Eigenschaften von ^{90}Y

Stimuliert durch den verstärkten Einsatz der Nukleartechnik in Industrie und Medizin in den fünfziger und sechziger Jahren, wurde das in vivo-Verhalten verschiedener radiotoxischer Spaltprodukte im Hinblick auf die Entwicklung von Dekontaminationsmethoden zur Entfernung von Radionukliden aus dem Körper nach versehentlicher Inkorporation verstärkt untersucht. Neben anderen war hierbei ^{90}Y als Tochternuklid des bei der Kernspaltung anfallenden ^{90}Sr von Interesse. Die Untersuchungen zielten darauf ab, die Organverteilung und Exkretion von ^{90}Y in einem gewissem Rahmen beeinflussen zu können. Schon früh wurde erwogen, dieses Radionuklid für therapeutische und diagnostische Zwecke nutzbar zu machen, falls es eine bevorzugte Organ- bzw. Tumoraaffinität besitzt [1,2]. Dabei wurde bald das therapeutische Potential von ^{90}Y erkannt, so daß es bereits 1958 in die Krebstherapie eingeführt wurde [3]. Auch heute gehört ^{90}Y zu einem der wich-

tigsten therapeutischen Nuklide in der nuklearmedizinischen Anwendung und Forschung. ^{90}Y -Radiotherapeutika werden in verschiedener chemischer Form (^{90}Y -markierte Komplexe, Chelate, Partikel, Kolloide und monoklonale Antikörper) für unterschiedliche Therapieprobleme eingesetzt. Dies liegt in erster Linie an den für die Radionuklidtherapie sehr geeigneten strahlenbiologischen Eigenschaften (Halbwertszeit und Zerfallsenergie), der leichten Verfügbarkeit und der Fähigkeit, mit geeigneten Liganden stabile Komplexe zu bilden.

1. Die Halbwertszeit von 2,7 d hat gegenüber längeren Halbwertszeiten den Vorteil, daß die Dosisabgabe in relativ kurzer Zeit erfolgt. Dies ermöglicht eine effektivere Behandlung von krankhaft verändertem Gewebe als äquivalente Dosen, die in niedrigeren Dosisraten verabreicht werden [4,5]. Auf der anderen Seite reicht die Halbwertszeit aus, um die Verteilung des Pharmakons im Körper und seine Lokalisierung im Zielgewebe zu ermöglichen, bevor das Radionuklid zerfallen ist.

2. Als reiner hochenergetischer β -Strahler zerfällt ^{90}Y mit einer Maximalenergie von $E_{\max} = 2,3 \text{ MeV}$ (vgl. Zerfallsschema Abb.1.1; alle Zerfallsdaten sind der Kompilation von Browne und Firestone [6] entnommen) und einer mittleren Energie von $E_m = 0,937 \text{ MeV}$. Die emittierten β -Teilchen besitzen eine mittlere Gewebedurchdringung von 2,5 mm mit einer maximalen Reichweite von ungefähr 11 mm [7]. Somit erreichen sie eine effektive Penetration des Tumorgewebes und eignen sich daher besonders zur Behandlung massiver Tumoren. Die fehlende γ -Strahlung begrenzt die radioaktive Strahlenwirkung lokal auf das Zielgewebe bzw. Targetorgan und reduziert die Strahlenbelastung des gesunden Gewebes. Das ist aus strahlenbiologischer Sicht ein idealer Zustand. Die fehlende γ -Strahlung bedeutet jedoch, daß quantitative Messungen sowohl der menschlichen Pharmakokinetik als auch der innerlichen Strahlungsdosen ^{90}Y -markierter Radiopharmazeutika in vivo nicht möglich sind. Dieses Problem läßt sich andererseits mit der Einführung des PET-Analogons ^{86}Y durch Rösch et al. [8] lösen. Dieser Ansatz erlaubt es, die Pharmakokinetik und Strahlendosen verschiedener ^{90}Y -Radiotherapeutika quantitativ zu evaluieren.

3. ^{90}Y ist bequem und kostengünstig in trägerfreier Form über ein $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ -Generatorsystem zugänglich (^{90}Sr ; $T_{1/2} = 28,5 \text{ a}$). Das dem Generatorsystem zugrunde liegende Zerfallsschema ist in Abb.1.1 wiedergegeben. Für seine Anwendung in der Endoradiotherapie sind an die $^{90}\text{Y}/^{90}\text{Sr}$ -Abtrennung höchste Ansprüche zu stellen. So muß das Maß der ^{90}Sr -Verunreinigung äußerst gering sein, um eine Akkumulation des langlebigen Nuklids im Skelett zu vermeiden. Daher wurde eine Vielzahl an radiochemischen Trennverfahren vorgeschlagen, zu denen Präzipitation, Solvent-Extraktion und Ionenaustausch gehören. Die letztere ist die aufgrund

ihrer leichten Durchführbarkeit die am häufigsten verwendete Trennmethode. So besteht ein kommerziell erhältliches Generatorsystem z.B. aus einer mit Kationenaustauscherharz (Dowex 50-X8) gefüllten Säule, auf der ^{90}Sr fixiert ist, und von der ^{90}Y mit Komplexbildnern wie Citrat, Oxalat oder EDTA periodisch „abgemolken“ werden kann [10].

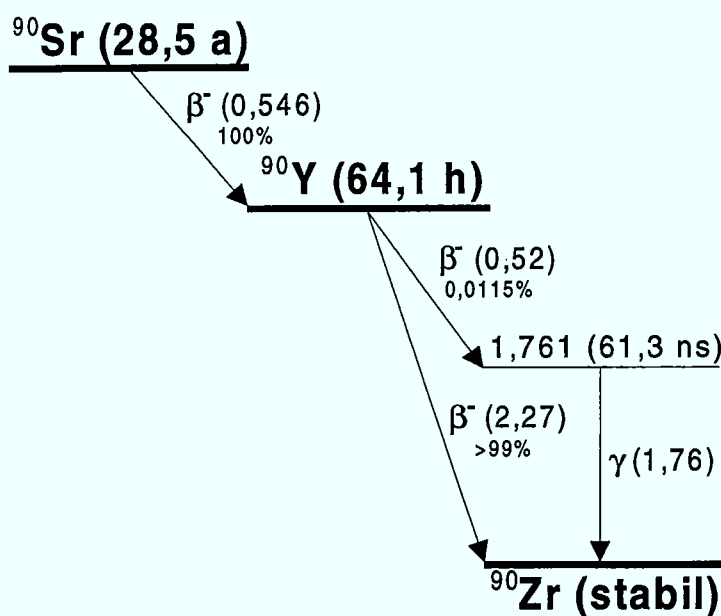


Abb.1.1: Zerfallsschema für ^{90}Sr (Energien in MeV) [9].

4. Y(III) verhält sich im Sinne des HSAB-Konzepts wie eine harte Säure. Da im Gegensatz zu den Übergangsmetall-Ionen keine Beteiligung der d-Elektronen an der Komplexbindung stattfinden kann, entfällt eine entsprechende Ligandenfeld-Stabilisierung und die Gesamtstabilität der Yttrium-Komplexe ist relativ gering. Mit Hilfe des Chelateffekts kann die Komplexstabilität jedoch erheblich erhöht werden, so daß Yttrium mit Chelatliganden aufgrund seiner hohen Koordinationszahl und seines hohen Ladung zu Radius-Verhältnisses ausgesprochen stabile Komplexe ausbildet. Diese Eigenschaft macht es zu einem potentiell geeigneten Radionuklid für die Radioimmunotherapie, da es über diese stabilen Chelate an Antikörpersysteme bzw. kleinere Peptide gekoppelt werden kann.

1.3 Medizinische Anwendung von ^{90}Y

1.3.1 Schmerztherapie bei Knochenmetastasen

Medizinische Aspekte

Krebserkrankungen an Brust und Lunge bei Frauen bzw. Prostata und Lunge bei Männern stellen heute den dramatischsten Teil der Krebsneuerkrankungen dar [11]. Zur Veranschaulichung der Verhältnisse ist in Abb.1.2 die Häufigkeit von Krebs in Abhängigkeit von Geschlecht und Körperstelle zusammengestellt.

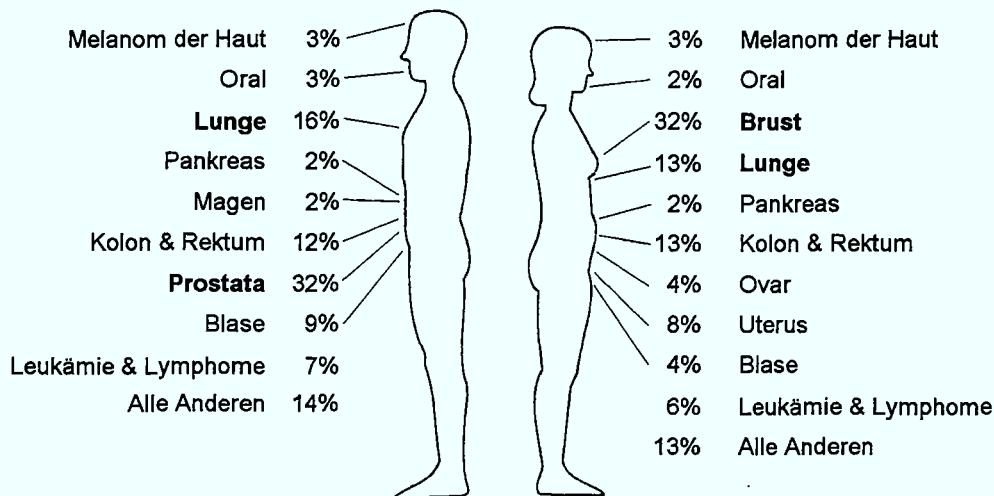


Abb.1.2: Häufigkeit von Krebsneuerkrankungen in Abhängigkeit von Geschlecht und Körperstelle [11].

Ungefähr bei 50% der Patienten mit primärem Brust-, Lungen- oder Prostatakrebs kommt es zur Ausbildung schmerzhafter multipler Skelettmetastasen [12,13], woraus deutlich wird, wie groß der Bedarf an therapeutischen Maßnahmen gegen diese Krebsform ist. Als Behandlungsmethode hat sich in vielen Fällen die Radiotherapie bewährt, da die ionisierende Strahlung ohne Bewußtseinsbeeinträchtigung narkotisierender Arzneimittel und anderer Nebenwirkungen sehr effektiv ist [13-15]. Obgleich mittels Radiotherapie kurative Verbesserungen nur in sehr geringem Umfang erreichbar sind, ist den erzielbaren palliativen Erfolgen ein hoher Stellenwert einzuräumen, da dem Patienten durch die Schmerzbeseitigung ein hohes Maß an Lebensqualität zurückgegeben werden kann.

Der Mechanismus der analgetischen Wirkung ionisierender Strahlung ist genauso wie die Schmerzentstehung weitgehend unbekannt. Werden die Knochenmetastasen mit hohen Dosen von 16 - 50 Gy bestrahlt, so findet im bestrahlten Knochen eine anfängliche Degeneration und Nekrose der Tumorzellen mit einem sich anschließenden Wachstum neuen Knochens statt [16]. Obgleich diese Effekte für ei-

ne Reparatur und Stabilisierung des beschädigten Knochens wichtig sind, stehen sie wahrscheinlich in keinem direkten Zusammenhang mit der analgetisierenden Wirkung ionisierender Strahlung. Der Grund hierfür liegt primär darin, daß eine Schmerzlinderung meistens sehr schnell nach der Knochenbestrahlung einsetzt, bevor der langsamer verlaufende Prozeß der Tumornekrose und Remineralisation des Knochens bereits einsetzen konnte. Auch kann schon mit geringen Strahledosen von nur 4 Gy, die zu keiner Tumorschrumpfung führen, eine signifikante Schmerzreduzierung erreicht werden [17].

Radionuklide für die Knochenmetastasentherapie

Der Einsatz von β^- -emittierenden Radionukliden für die Therapie multipler Knochenmetastasen begann in den vierziger Jahren mit ^{32}P und ^{89}Sr .

Phosphor-32: Nach intravenöser Applikation von ^{32}P als Orthophosphat wird es bevorzugt in schnell metabolisierende Regionen des Knochens eingebaut. Wenn auch in den meisten dokumentierten Fällen eine Schmerzlinderung herbeigeführt werden konnte, wird es heutzutage kaum noch benutzt, da die meisten Patienten nach der Behandlung an schweren Knochenmarksdepressionen litten [18]. Versuche, die Knochenmarkstoxizität durch den Einsatz anderer ^{32}P -Verbindungen wie ^{32}P -Pyrophosphat [19], ^{32}P -Diphosphonat [20] oder durch Prästimulation mit Androgenen und Parathormon [21] zu reduzieren, waren wenig erfolgreich, so daß weiter nach Isotopen mit geringerer Knochenmarkstoxizität gesucht wurde.

Strontium-89: Dabei bot sich ionisches ^{89}Sr an, weil es sich selektiver in Zonen reaktiven Knochenwachstums um die Metastase anreichert und das Knochenmark insgesamt eine geringere Dosis erhält. Es hat bis heute durch die Arbeiten von Firusian die weiteste Verbreitung zur erfolgreichen Behandlung schmerzhafter Knochenmetastasen gefunden [22,23]. In den Studien mit ^{89}Sr -Chlorid (z.B. Metastron, Amersham Healthcare, eines der erfolgreichsten kommerziellen Radiotherapeutika) konnte bei 77% der Patienten eine Schmerzlinderung beobachtet werden. Eine Limitierung für die klinische Anwendung von ^{89}Sr stellt jedoch die lange physikalische Halbwertszeit (50,5 d) dar, so daß die Suche nach geeigneteren Nukliden für die analgetische Therapie von Knochenmetastasen fortgesetzt wurde.

Yttrium-90: Sowohl Greiff [24] als auch Kutzner [25,26] konnten mit dem kommerziell erhältlichen [^{90}Y]Citrat (z.B. Medgenex Diagnostics; Düsseldorf) mit ^{89}Sr vergleichbare therapeutische Erfolge erzielen. In einer Pilottherapiestudie wurde nach Applikation von [^{90}Y]Citrat bei tolerierbaren reversiblen Blutbildveränderungen eine Schmerzlinderung von 95% der Patienten angegeben. Trägt man den Zerfallseigenschaften von ^{90}Y Rechnung, so ergeben sich zwangsläufig gravierende Vorteile

für seine Verwendung gegenüber ^{89}Sr (kürzere Halbwertszeit, leichtere Verfügbarkeit). Voraussetzung für den therapeutischen Erfolg ist auch hier eine hohe selektive Anreicherung des ^{90}Y -Radiotherapeutikums in den Knochenmetastasen im Verhältnis zum übrigen Knochen bzw. Knochenmark. Nachdem ein hoher Anreicherungsfaktor von 4:1 bis 10:1 bisher nur aus Tierversuchen abgeleitet werden konnte [27], zeigt eine quantitative Evaluierung der Pharmakokinetik von [$^{86/90}\text{Y}$]Citrat am Menschen mit multiplen Knochenmetastasen mit dem PET-Analogon ^{86}Y , daß das Verhältnis von Knochenmetastase zu normalem Knochen tatsächlich im Bereich von 3:1 bis 15:1 mit einem Durchschnittswert bei 8:1 liegt [28].

Samarium-153, Rhenium-186 und Holmium-166: Als potentiell geeignete Radionuklide für die Knochenmetastasentherapie wurden in letzter Zeit die reaktorproduzierten kurzlebigen Isotope ^{153}Sm , ^{186}Re und ^{166}Ho gekoppelt an Phosphonsäureliganden (EDTMP bzw. HEDP) einer klinischen Prüfung unterzogen [29-32]. Dies dürfte zum größten Teil darauf beruhen, daß ^{153}Sm und ^{186}Re neben der therapeutisch nutzbaren β^- -Strahlung auch relativ niederenergetische γ -Strahlen emittieren, die sich für Schichtaufnahmen mittels SPET (Single Photon Emission Tomography) eignen. Dies ermöglicht eine Verfolgung des in vivo-Schicksals der Radionuklidkomplexe und eine Abschätzung dosimetrischer Aspekte. Vom Standpunkt der in vivo-Dosimetrie ist der Einsatz derartiger Nuklide jedoch inkonsequent, da die den β^- -Zerfall begleitende γ -Strahlung zu unnötiger Strahlenbelastung gesunden Gewebes führt. Als vorteilhaft kann jedoch die niedrige β^- -Energie von ^{153}Sm angesehen werden, da die geringe Gewebedurchdringung von ungefähr nur 3 mm das Knochenmark entsprechend wenig belastet.

Arsen-76 und Zinn-117m: Aufgrund ihrer Strahlungseigenschaften und Knochenaffinität ist auch ein Einsatz von ^{76}As und $^{117\text{m}}\text{Sn}$ in Erwägung gezogen worden. In der klinischen Routine haben sie aber beide bislang keine breite Anwendung gefunden.

Die für die Therapie relevanten und potentiell relevanten Radionuklide sind in Tab.1.2 zusammengestellt.

Tab.1.2: β -Strahler für die Knochenmetastasentherapie

Nuklid	HWZ [d]	$E_{\beta\text{-max}}$ [MeV]	E_{γ} [keV] (Häufigkeit %)	Produktionsreaktion
^{32}P	14,3	1,7	keine	$^{31}\text{P}(n,\gamma)^{32}\text{P}$
^{76}As	1,1	2,97	559 (43)	$^{75}\text{As}(n,\gamma)^{76}\text{As}$
^{89}Sr	50,5	1,49	keine	$^{88}\text{Sr}(n,\gamma)^{89}\text{Sr}$
^{90}Y	2,7	2,3	keine	$^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ -Generator
$^{117\text{m}}\text{Sn}$	1,4	IT	159 (86)	$^{116}\text{Sn}^{(a)}(n,\gamma)^{117\text{m}}\text{Sn}$
^{153}Sm	1,93	0,81	103 (29,8)	$^{152}\text{Sm}^{(b)}(n,\gamma)^{153}\text{Sm}$
^{166}Ho	1,1	1,84	806 (6)	$^{165}\text{Ho}(n,\gamma)^{166}\text{Ho}$
^{186}Re	3,7	1,07	137 (9,2)	$^{185}\text{Re}^{(c)}(n,\gamma)^{186}\text{Re}$

^(a) angereichertes ^{116}Sn ; ^(b) angereichertes ^{152}Sm ; ^(c) angereichertes ^{185}Re

1.3.2 ^{90}Y -Therapie mit Partikeln

In der Lokalbehandlung von chronischen Gelenkentzündungen und Tumoren (insbesondere hepatischer Tumoren) hat sich als Alternative zu chirurgischen Eingriffen die intraartikuläre Therapie mit β -emittierenden Radionukliden bewährt. Dabei muß das applizierte Radionuklid nach seiner Injektion im kapillaren Bett des Tumors bzw. im entzündeten Gelenk verbleiben. Dies wird erreicht, indem das Radionuklid an Makromoleküle bzw. Teilchen assoziiert verabreicht wird. Zum Einsatz kommen hierbei Kolloide, Glasmikrosphären, Makroaggregate, Ionenaustauscherpartikel und Hydroxylapatit.

Radiosynoviorthese

Seit dem Einsatz von kolloidalem ^{198}Au in der Therapie von rheumatischen Gelenkentzündungen [33,34] hat die Radiosynoviorthese einen festen Platz in der klinischen Praxis. Je nach Größe des zu behandelnden Gelenks werden heute β -Strahler mit unterschiedlicher Energie eingesetzt. ^{90}Y eignet sich wegen seiner hochenergetischen β -Emission für das relativ große Kniegelenk, ^{169}Er ($E_{\beta\text{-max}} = 0,34$ MeV) für die kleinen Fingergelenke und ^{186}Re ($E_{\beta\text{-max}} = 1,07$ MeV) für die übrigen Gelenke (Schulter-, Hand-, Hüft-, Ellbogen- und Sprunggelenke). Die in kolloidaler Form vorliegenden Radionuklide verbleiben nach intraartikulärer Injektion im Gelenkspalt und bewirken nach Phagozytierung in den Synovialzellen eine Bestrahlung der Synovialmembran, von der häufig die entzündlichen und rheumatischen Beschwerden ausgehen. Durch die Bestrahlung kommt es zu Nekrosen der Zellen und zum Rückgang der entzündlichen Zellproliferation [35]. Ein Nachteil in der Benutzung kolloidaler Radionuklide ist allerdings die eventuell damit ver-

bundene Freisetzung von Aktivität aus dem Gelenk, in das das Radionuklid injiziert wurde, mit nachfolgender Strahlenbelastung gesunden Gewebes wie Lymphknoten und Leber. Daher konzentriert sich die Forschung auf bioabbaubare Partikel wie Ionenaustauscher und Hydroxylapatite oder Mikrosphären, deren Design keinen oder nur eine sehr geringe Aktivitätsfreisetzung aus dem mit dem Radionuklid behandelten Gelenk zuläßt.

Hepatische Radioembolisierung mit ^{90}Y

Obgleich die Leber bei externer Strahlentherapie relativ hohe Strahlendosen toleriert, reichen diese nicht aus, um bei Lebermetastasen- bzw. -krebs einen therapeutischen Effekt zu erzielen. Daher hat sich auch hier die Lokalisierung der Strahlung auf die Tumorzellen durch die Behandlung mit intraarteriell applizierten radioaktiven β^- -strahlenden Partikeln bewährt. Dabei macht man sich zunutze, daß die Blutversorgung des normalen Lebergewebes nur zu 20% über die Leberarterie und zu 80% über die Pfortader erfolgt. Demgegenüber wird der Blutbedarf des Tumorgewebes zu 100% durch die Leberarterie abgedeckt, in die auch die radioaktiven Partikel instilliert werden. In der Praxis werden zur hepatischen Radioembolisierung kommerziell erhältliche Glassphären, in deren Glasmatrix ^{89}Y eingebaut ist, verwendet. Bevor diese am Patienten zum Einsatz kommen, werden sie mit Neutronen bestrahlt, wobei durch (n, γ)-Reaktion ^{90}Y entsteht. Die aktivierten Sphären werden darauf in die zum Tumor führende Arterie injiziert. Aufgrund ihres großen Partikeldurchmessers werden sie im arteriellen Bett des Tumors gefangen und führen dort zur Bestrahlung der Tumorzellen [36,37]. Das Problem der Radionuklidfreisetzung aus den Partikeln, wie es besonders bei organischen Polymeren beobachtet wird, konnte durch den Einsatz von Glasmikrosphären minimiert werden.

1.3.3 Radioimmunotherapie

Als eine vielversprechende Methode zur Diagnose und Therapie von Krebs haben im letzten Jahrzehnt seit der Entwicklung der Hybridomtechnik die Radioimmunotherapie (RIT) und die Radioimmunoszintigraphie (RIS) mit monoklonalen Antikörpern (MoAb) enorm an Bedeutung gewonnen [38-40]. Monoklonale Antikörper haben die Eigenschaft, mit einer ausgesprochen hohen Spezifität an Bindungsstellen ihres korrespondierenden Antigens gebunden zu werden, die beispielsweise von Tumorzellen exprimiert werden. In der RIT werden MoAb mit unterschiedlichen Isotopen radioaktiv markiert. Von großem Interesse in der RIT sind Radiometalle, von denen ^{90}Y nach Wessels und Rogus [41] aufgrund der schon erörterten Strahlungs- und Komplexierungseigenschaften neben ^{67}Cu und ^{186}Re zu den am

besten geeigneten Therapienukliden gehört. Da die meisten Antikörper jedoch keine metallbindenden funktionellen Gruppen tragen, die in der Lage sind, stabile Bindungen auszubilden, muß eine metallbindende Gruppe kovalent an das Proteinmolekül gekoppelt werden. Dies wird mit bifunktionellen Chelatliganden erreicht, die einerseits kovalent an das Protein konjugiert sind und zum anderen mit dem Metall ein stabiles Chelat bilden. Für diese indirekte Markierung des Antikörpers eignen sich u.a. Polyaminopolycarboxylate wie EDTA oder DTPA, die eine kovalente Amidbindung mit einer ihrer Carboxylat-Gruppen und einer Amino-Gruppe des Antikörpers (zumeist Lysin) ausbilden. Probleme entstehen zum einen durch die in vivo-Instabilität der Radionuklid-MoAb-Verbindung und zum anderen durch die veränderten in vivo-Eigenschaften des markierten MoAbs. Die oft unzureichende Serumstabilität des Radioimmunkonjugats führt zur Freisetzung des Radionuklids und infolgedessen zu einer nicht mehr tumorselektiven Bioverteilung. Für die Seruminstabilität lassen sich drei Gründe anführen [42]:

1. Hydrolyse der kovalenten Bindung, an die der Chelator gebunden ist und nachfolgende Freisetzung der jeweiligen Chelatverbindung.
2. Unspezifische Bindung der Radionuklide an metallbindende Komplexbindungsstellen des MoAbs. Die schwach gebundenen Metallradionuklide werden dann im Serum schnell an andere Proteine aufgrund teilweise höherer Affinität übertragen.
3. Transkomplexierung der Radionuklide aus ihrer Koordinationsverbindung an Serumproteine und andere metallaffine Regionen im gesunden Gewebe, oder Verdrängung der Radionuklide aus ihrer Komplexverbindung durch physiologische chelatisierbare Metall-Ionen.

Aus diesen Gründen wurde nach mehrzähligen Liganden gesucht, die kinetisch stabilere Komplexe ausbilden. Als Beispiele für Liganden mit einer hohen Serumstabilität seien hier Makrozyklen (TETA, DOTA) [43], Biomakromoleküle (Desferrioxamin [44], Porphyrin [45]) und phenolische Aminocarbonsäuren (EDDHA [46]) genannt.

Eine weitere Möglichkeit, bessere Target zu Nicht-Target-Verhältnisse zu erreichen, ist die Verwendung von metabolisierbaren Chelat-Linkern. Dabei werden zwischen die Bindung von Antikörper und Chelat mehrere z.T. enzymatisch metabolisierbare chemische Bindungen eingeführt (z.B. Ester- oder Sulfidbindungen), um eine schnellere Clearance des Antikörpers zu erzielen [47,48]. Aus dem Einsatz von Ester-Linkern resultiert eine Abnahme der Hintergrundaktivität des Bluts, eine kürzere biologische Halbwertszeit und eine Zunahme des Tumor/Blut-Verhältnisses auf Kosten der absoluten Tumoraufnahme.

Selbst bei optimaler Reinheit, Stabilität, Radiomarkierung und Spezifität des MoAbs werden jedoch nur weniger als 1% des injizierten markierten MoAbs im Tumor fixiert. Da die Ausscheidungsrate für Antikörper sehr gering ist, verbleibt der Rest zum größten Teil im Blut, der Leber und der Niere. Demgegenüber werden die Antikörperfragmente Fab und $F(ab')_2$, die die für die Antikörper-Antigen Reaktion spezifischen Bindungsstellen tragen, wesentlich schneller über die Nieren ausgeschieden. Daraus resultiert ein höheres Target zu Nicht-Target-Verhältnis, wobei die Targetaufnahme des radioaktiv markierten Fragments durch die kürzere Verweilzeit im Blut reduziert wird [49]. In diesem Zusammenhang sind auch mit Radiometallen markierte Peptide zu nennen, die spezifisch an Rezeptoren in der Zellmembran gebunden werden und daher auch in der RIT eingesetzt werden. Diese zeichnen sich ebenfalls durch eine schnelle Blutclearance aus.

Die Diagnose vieler gewöhnlicher menschlicher Krebsarten mit monoklonalen Antikörpern ist in den letzten Jahren sehr erfolgreich gewesen und wird auch in Zukunft eine wesentliche Rolle in der Tumorerkennung spielen. Demgegenüber sind die bisher in der RIT erzielten Fortschritte noch weit von einer klinischen Routineanwendung entfernt, da in der RIT weitaus höhere Ansprüche an die Radioaktivitätsanreicherung im Tumorgewebe im Verhältnis zum gesunden Gewebe zu stellen ist.

1.4 In vivo-Verhalten dreiwertiger Radionuklide

1.4.1 Organverteilung verschiedener Yttrium-Verbindungen

Durch die Extensivierung der Kernenergie in den vierziger und fünfziger Jahren wurde das Retentions- und Exkretionsverhalten unterschiedlicher Spaltprodukte intensiv erforscht. Daher stammen aus dieser Zeit die ersten systematischen Untersuchungen zur Bioverteilung der bei der Kernspaltung anfallenden Radioisotope der Lanthaniden und des chemisch verwandten Yttriums [50-58]. Ein direkter Vergleich der vielen Organverteilungsstudien mit unterschiedlichen Y-Isotopen (^{87}Y , ^{88}Y , ^{90}Y und ^{91}Y) von damals bis heute ist schwierig, da die Studien sich in der Applikationsart (i.p., i.v., oral etc.), dem Yttrium- bzw. Lanthanidenträgerzusatz und der chemischen Form (unterschiedliche Metall-Ligand-Komplexe) unterscheiden. Dennoch lassen sich generelle Trends aus dem umfangreichen Datenmaterial zusammenfassen.

Yttrium in ionischer Form als YCl_3

Wird Yttrium in ionischer trägerfreier Form i.v. bzw. i.p. appliziert, so stellt der Knochen das Haupttargetorgan dar. Hierbei wird angenommen, daß Y^{3+} durch Ionenaustauschprozesse an der Knochenoberfläche in die Hydroxylapatitstruktur des Knochens eingelagert wird. Erfolgt hingegen die Applikation mit sukzessiver Erhöhung des Trägerzusatzes, werden Leber und Milz, die Organe des Retikuloendothelialen Systems (RES), zum bevorzugten Akkumulationsgewebe [59]. Dies wird in der Regel ohne detaillierte chemische Prüfung auf die Bildung von Y(III)-Hydroxiden oder anderen unlöslichen bzw. kolloidalen Verbindungen zurückgeführt, die als Makromoleküle von den Zellen des RES, die hauptsächlich in der Leber, Milz und Knochenmark lokalisiert sind, aus dem Blutstrom durch Phagozytose eliminiert und gespeichert werden.

Yttrium-Chelate

Wird Yttrium in chelatisierter Form injiziert, so hängt das Organverteilungsmuster in starkem Maße von der Stabilität des gebildeten Yttrium-Komplexes ab. Während mittlere bis schwache Yttrium-Chelate (z.B. Y-Citrat oder Y-NTA) noch eine relativ hohe Retention sowohl im Knochen als auch im RES aufweisen, nimmt diese mit steigender Stabilität der Komplexe in beiden Kompartimenten ab [54-56]. Auch hier weisen geträgerte Yttrium-Chelate wiederum eine höhere Affinität zum RES auf. Starke Yttrium-Chelate wie z.B. Y-EDTA und Y-DTPA werden sehr schnell über die Nieren ausgeschieden, ohne wesentlich im RES oder Knochen akkumuliert zu werden. Um bei möglichst geringer Strahlenbelastung des RES dennoch eine therapeutisch ausreichend hohe Aktivität in Tumormetastasen deponieren zu können, müssen ^{90}Y -Komplexe mittlerer Stabilität wie ^{90}Y -Citrat eingesetzt werden, die einen Kompromiß zwischen der Strahlenexposition von Knochenmetastase und gesundem Gewebe ermöglichen.

Yttrium in Biokonjugaten

Im Fall ^{90}Y -markierter monoklonaler Antikörper hängt die Pharmakokinetik in erster Linie vom Typ des monoklonalen Antikörpers und in zweiter Linie von der Serumstabilität des Yttrium-Chelatorsystems, das an den Antikörper konjugiert ist, ab. Intakte Antikörperchelate zeigen eine sehr geringe Akkumulation im Knochen bei langsamer Blutclearance und bevorzugter Anreicherung in Leber, Milz und Nieren bzw. dem Tumor. Der Verlust von Y(III) ist hier indirekt proportional zur in vivo-Komplexstabilität. In vivo freigesetztes ionisches Y(III) bildet eine sekundäre Pharmakokinetik mit hoher Knochenaffinität und starker Retention im RES aus [60,61].

1.4.2 Vergleich der Bioverteilung von Yttrium und anderen dreiwertigen Metallen

Aufgrund der Ähnlichkeit von Yttrium in Ionengröße, Koordinationszahl und Wertigkeit mit den Elementen der dritten Hauptgruppe und vor allem den Lanthaniden sollte sich sein Bioverhalten in das der beiden Gruppen einordnen lassen. Ein Vergleich der Ionenradien von Yttrium mit den Lanthaniden macht den Grund für die analogen chemischen Eigenschaften und das daher ähnliche Bioverhalten direkt erkennbar. Aufgrund der Lanthanidenkontraktion haben Yttrium und das eine Periode tiefer stehende Holmium, bei dem die durch den Übergang in die nächst höhere Periode bewirkte Größenzunahme kompensiert ist, nahezu den gleichen Ionenradius von 0,9 Å. Zur Veranschaulichung der Verhältnisse sind die effektiven Ionenradien der dreiwertigen Kationen der Lanthaniden und des Yttriums für die Koordinationszahl 6 nach Shannon [62] in Abb.1.3 zusammengestellt.

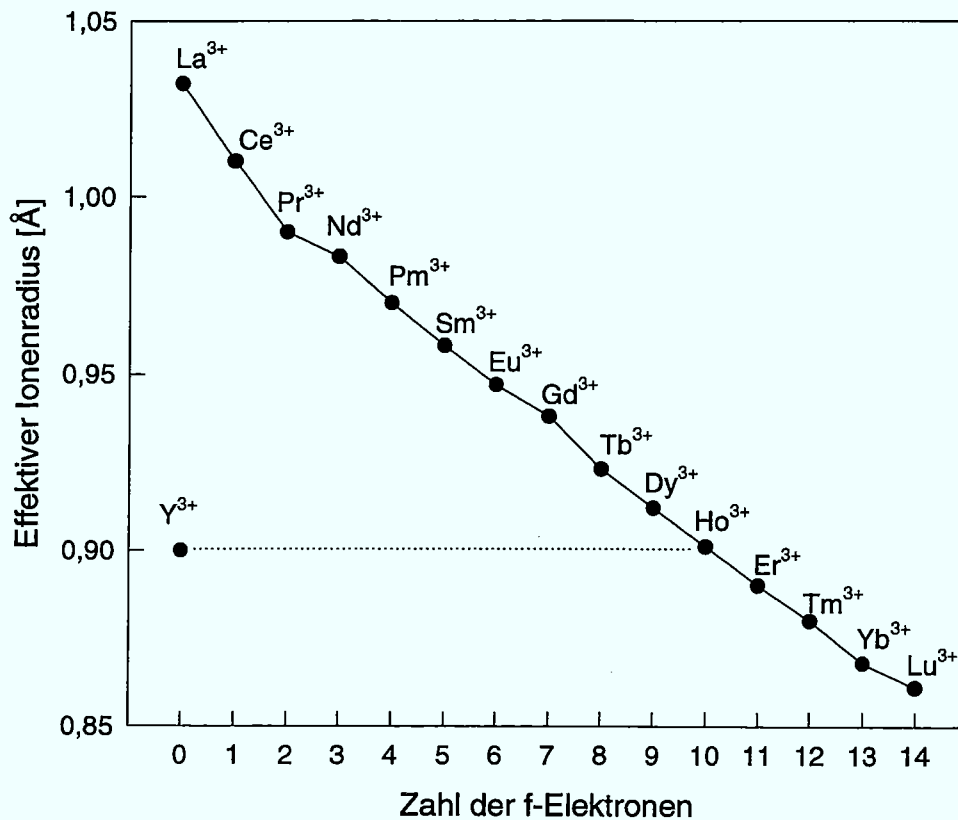


Abb.1.3: Effektive Ionenradien (für Koordinationszahl 6) von Y³⁺- und Ln³⁺-Ionen [62].

Die Lanthanide zeigen einen interessanten Zusammenhang zwischen ihrem Bioverhalten und dem Ionenradius, wobei die skelettale Deposition mit abnehmendem Ionenradius zunimmt [58,59]. Werden bei den schweren Lanthaniden (Tb-Lu) noch

50-60% der verabreichten Dosis im Skelett gefunden, so reduziert sich dieser Wert über 30-40% bei den Übergangslanthaniden auf 25% bei den leichten Vertretern. Die Leber zeigt ein genau umgekehrtes Retentionsverhalten: 50% bei den leichten und 15% bei den schweren Lanthaniden. Die unterschiedliche Akkumulation in Abhängigkeit vom Ionenradius korreliert mit der größeren Chelatstabilität der schwereren Lanthanide mit z.B. Citrat, die dadurch geringere Dissoziations Tendenzen im Blut besitzen und als intakter Komplex nicht von den Zellen des RES abgefangen werden. Yttrium reiht sich mit seinem Organverteilungsmuster bei den Übergangslanthaniden ein.

Die Elemente der dritten Hauptgruppe weisen ein von Yttrium und den Lanthaniden abweichendes Verhalten auf. Obgleich Gallium und Indium ebenfalls eine hohe Knochen- und Leberaffinität besitzen, läßt sich ihre Gewebeeinlagerung exogen durch Variation des Chelatliganden kaum beeinflussen [63]. Dieses Verhalten erklärt sich dadurch, daß im Blut eine sofortige Umkomplexierung von Gallium und Indium mit sehr hohen Stabilitätskonstanten an das Eisentransportprotein Transferrin erfolgt. Das ist der Grund für ihre im Vergleich zu den anderen dreiwertigen Metallen langsamere Blutclearance.

1.4.3 Knochenaffinität dreiwertiger Metall-Ionen

Wie in den vorhergehenden Abschnitten bereits erwähnt, stellt der Knochen eines der Hauptretentionskompartimente für intravenös applizierte dreiwertige Metall-Ionen dar. Daher werden diese auch als sogenannte „knochensuchende Elemente“ klassifiziert. Knochen besteht primär aus elastischen Faserproteinen (ca. 30%; hauptsächlich Kollagen) sowie aus in Glykoproteinen eingelagerten anorganischen Anteilen. Diese anorganischen Anteile bestehen hauptsächlich aus Hydroxylapatit der Zusammensetzung $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ neben geringeren Anteilen von CaCO_3 , Kieselsäure, MgCO_3 , anderen Metall-Ionen sowie Citrat als Bindemittel [64]. Das Knochenwachstum wird durch ein relatives Überangebot an Ca^{2+} und den entsprechenden Anionen wie Phosphat und Carbonat eingeleitet. Der Knochenabbau hingegen wird durch mehrkernige Riesenzellen (Osteoklasten) vollzogen, wobei u.U. Citrat als Chelatbildner eine wesentliche Rolle zukommt. Die Ursache für die hohe Knochenaffinität dreiwertiger Metall-Ionen ergibt sich daraus, daß diese Ionen aufgrund vergleichbarer Ionenradien (IR von La^{3+} - Lu^{3+} : 1,032-0,861 Å, Ca^{2+} : 1,0 Å) Calcium aufgrund ihrer höheren Ladung-zu-Radius-Verhältnisse in der Apatitstruktur des Knochens zu ersetzen vermögen. Dieser Substitutionsprozeß wird dadurch ermöglicht, daß das im Skelett eingelagerte Ca^{2+} durch parallel ablaufende Auf- und Abbauprozesse der Knochensubstanz im ständigen Austausch

mit gelösten Ca^{2+} -Ionen steht, so daß Y^{3+} bzw. Ln^{3+} anstelle von Ca^{2+} in die substitutionsanfällige Hydroxylapatitstruktur eingebaut werden können. Zudem wird der Einbau durch die sehr große Kristalloberfläche der Hydroxylapatitkristalle erleichtert. Die Einlagerung in den Knochen erfolgt über einen dreistufigen Prozeß, der sich nach Pfeiffer [65] in a.) Eintritt des Me-Ions in die Hydratationshülle des Apatitkristalls, b.) Adsorption an der Kristalloberfläche und c.) Einbau in das Kristallgitter unterteilen läßt.

1.4.4 Tumoraffinität dreiwertiger Metall-Ionen

Der Grund, der dreiwertige Metalle erst zu wichtigen Instrumenten der Nuklearmedizin macht, liegt in ihrer präferentiellen Akkumulation in bösartigem Gewebe. So ist beispielsweise der Einsatz von ^{67}Ga -Citrat zu einer klinischen Standardmethode in der Erkennung verschiedener Tumoren geworden [66]. In den letzten Jahren wurden weitere dreiwertige Radionuklide im Hinblick auf einen klinischen Einsatz in der Tumordiagnostik und -therapie untersucht [67-69]. Diese Studien lenkten das Interesse auf den Mechanismus der Tumorakkumulation dieser Nuklide. Verschiedene für das Tumorgewebe charakteristische Eigenschaften, die von den Stoffwechseleigenschaften normalen Gewebes abweichen, werden für die bevorzugte Lokalisation im Tumorgewebe diskutiert. So weisen Tumorzellen Veränderungen im pH-Milieu (hoher Milchsäureanteil), im Blutfluß und der Zusammensetzung der Stoffwechselprodukte auf [70]. Für ^{67}Ga wird angenommen, daß Transferrin eine Schlüsselrolle in der zellulären Aufnahme von Radiogallium im neoplastischen Gewebe zukommt. Gallium wird im Blut fast ausschließlich durch Transferrin transportiert. Es wird deshalb angenommen, daß sich auf den Tumorzellen Transferrin-Rezeptoren befinden, die die Radionuklidaufnahme bewirken [71-75]. Dies widerspricht allerdings Befunden, die in Versuchen mit Plasmafraktionen mit hohem und niedrigem Molekulargewicht aus mit ^{67}Ga -Citrat markiertem Blutplasma gewonnen wurden. Beide Fraktionen zeigen eine unterschiedliche Tumorspeicherung von ^{67}Ga in vivo, wobei diese für die niedermolekulare ^{67}Ga -Fraktion bedeutend höher ist, so daß Transferrin für die ^{67}Ga -Akkumulation von geringerer Wichtigkeit sein sollte [76,77]. Ein weiterer Negativbeweis für die Transferrin-vermittelte Radionuklidaufnahme stellt die gleichzeitige Gabe von ^{67}Ga und inaktivem Eisen dar. Hier wird eine höhere Tumorakkumulation gefunden, obgleich die Transferrin-Bindungsstellen mit Eisen beladen sind und folglich im Fall eines Transferrin-übermittelten Mechanismus eine geringere Radionuklidkonzentration im Tumor gefunden werden sollte [78].

Im Gegensatz zu Gallium sind für die potentiell für diagnostische und therapeutische Zwecke nutzbaren Radiolanthanide in mechanistischer Hinsicht wenige Studien durchgeführt worden. Ihre präferentielle Anreicherung im Tumorgewebe läßt sich nur aus empirischen Studien ableiten.

Es wird zum einen angenommen, daß Radiolanthanide, wie auch Radiogallium, an saure Mucopolysaccharide und Sulfonylglykoproteine, zu denen z.B. auch Heparin gehört, gebunden werden. Diese sind im Tumorgewebe in konzentrierter Form vorhanden. Mit ihren Sulfonsäuregruppen stellen sie gleichsam einen physiologischen Kationenaustauscher dar, der insbesondere für die dreiwertigen Radiometalle ein hohes Bindungsvermögen aufweist. Eine erhöhte Konzentrierung in den Fraktionen von Tumorphomogenaten, die besonders reich an sauren Mucopolysacchariden und sulfonierten Glykoproteinen sind, konnte exemplarisch für dreiwertige Metalle mit ^{111}In und den Radiolanthaniden ^{169}Yb und ^{167}Tm nachgewiesen werden [79-81]. Ein ähnlicher Mechanismus, der ebenfalls auf Ionenaustauschprozessen beruht, berücksichtigt die beträchtliche Anreicherung von Calcium und Magnesium in Tumorzellen [82,83]. Diesen Ionen kommt in der Zellproliferation und dem -wachstum eine Schlüsselrolle zu. Dreiwertige Metalle sind aufgrund ihres hohen Ladung-zu-Radius-Verhältnisses in der Lage, erfolgreich um die Bindungsstellen der zweiwertigen Ionen in Lipoproteinen, Nukleoproteinen, Phospholipiden und Nukleinsäuren zu konkurrieren. Diese Substitutionsprozesse sollen daher der Grund für deren hohe Anreicherungsfaktoren in neoplastischen bzw. entzündeten Geweben sein [84,85].

Eine andere Hypothese geht davon aus, daß Radiolanthanide und Yttrium nach ihrem Übertritt ins Blut zunächst durch Umkomplexierung an Trägeralbumine gebunden und in dieser Transportform in die Tumorzelle aufgenommen werden [86].

Schließlich werden für die gesteigerte Aufnahme dreiwertiger Metalle in pathologisch veränderte Knochengebiete, wie z.B. Knochenmetastasen, nach Pfeiffer folgende Faktoren angeführt [65]:

- gesteigertes Ionenangebot infolge erhöhter lokaler Durchblutung
- erleichtertes Eintreten von fremden Metall-Ionen durch veränderte elektrostatische Kräfte in der Hydratationshülle bzw. Kristalloberfläche
- erhöhte Adsorption infolge Vergrößerung der reaktionsfähigen Kristalloberfläche
- gesteigerter Knochenstoffwechsel mit erhöhter Neubildung von Apatitkristallen.

1.5 Physikochemischer Zustand dreiwertiger Metalle im Blut

Unterschiedliche Pharmakokinetiken ergeben sich primär daraus, in welcher pharmakologischen bzw. physikochemischen Form das Metall-Ion injiziert bzw. zum Targetgewebe transportiert wird. Blut stellt ein hochkomplexes System mit sehr vielen potentiellen Reaktionspartnern wie organischen und anorganischen Elektrolyten und Plasmaproteinen dar. Aufgrund der Vielzahl an Reaktionspartnern im Blut bildet sich ein Gleichgewicht zwischen verschiedenen Verbindungen mit Blutkomponenten aus, so daß das Radiometall in der Regel kaum durch einen einzigen physikochemischen Zustand charakterisierbar ist. Nach Catsch [87] stehen Radiometallen im Blut prinzipiell folgende Wechselwirkungsmöglichkeiten zur Verfügung:

Hydrolyse und Bildung schwerlöslicher Hydroxide

Diese Zustandsform spielt für dreiwertige Metalle eine große Rolle, da Hydrolysereaktionen der Form: $\text{Ln}^{3+} + x\text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{Ln}(\text{OH})_x^{3-x} + x\text{H}^+$ im physiologischen pH-Bereich in Abwesenheit starker Komplexbildner dominieren. Die Hydrolyseprodukte besitzen ausgesprochen hohe Sorptionseigenschaften. Darüber hinaus können die Reaktionsgleichgewichte in diesem pH-Bereich zur Bildung von Hydroxykolloiden oder Präzipitation schwerlöslicher Metallhydroxide führen.

Ausfallen schwerlöslicher Verbindungen mit körpereigenen Anionen

Neben Hydroxid-Ionen sind im Blut noch weitere Anionen vorhanden, die mit dreiwertigen Metallen schwerlösliche Verbindungen bilden können. Hierzu gehören vor allem Bicarbonat, Phosphat, Fluorid, Oxalat und Sulfat.

Reaktion mit körpereigenen Komplexbildnern

Neben der Bindung an Plasmaproteine muß auch die Möglichkeit der Chelat- bzw. Komplexbildung mit körpereigenen Liganden diskutiert werden. Dabei kommt als wesentlicher Komplexbildner aufgrund seiner hohen Konzentration im Blut in erster Linie Citrat in Frage. Des weiteren sind in diesem Zusammenhang noch Aminosäuren und andere organische Säuren (z.B. Milchsäure, Brenztraubensäure etc.) zu nennen.

Adsorption an und Komplexbindung durch Proteine

Proteinmakromoleküle, die sich aus den verschiedensten Aminosäuren mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen zusammensetzen, verfügen über ein großes Reservoir an potentiellen Bindungsstellen für Radiometalle. Für dreiwertige Metalle in erster Linie interessant sind hierbei Liganden, die über Sauerstoffdonoratome verfügen, da sie aufgrund des HSAB-Prinzips von Pearson als harte Säuren bevorzugt Bindungen mit harten Basen eingehen. Mögliche Liganden für dreiwertige

Metalle sind daher Carboxyl-, Hydroxyl- oder Tyrosyl-Gruppen mit den dazugehörigen Aminosäuren Asparagin- und Glutaminsäure, Serin und Threonin und schließlich Tyrosin. Neben relativ unspezifischen Wechselwirkungen von Metallen mit Proteinen liegen im Blut jedoch auch Metalloproteine mit einer hohen spezifischen und selektiven Bindungsaffinität für bestimmte Metalle vor. Beispiele hierfür sind z.B. das eisentransportierende Transferrin oder das als Cu-Speicher fungierende Coeruloplasmin. Für Lanthanide bzw. Yttrium sind solche spezifischen Transportproteine nicht bekannt.

Metall als freies Kation

Für dreiwertige Metalle dürfte diese Zustandsform aus den oben erläuterten Gründen (hohe Komplexbildungstendenz und Bildung schwerlöslicher Verbindungen) eine im Gegensatz z.B. zu den Erdalkalimetallen allenfalls untergeordnete Rolle spielen.

1.6 Bindung von Yttrium und Lanthaniden an Serumproteine

Trotz erheblicher Anstrengungen besteht keine Klarheit über die Art des in vivo-Transports von Lanthaniden (Ln) und den Elementen der dritten Nebengruppe (Sc, Y und La). Die in Tab.1.2 gezeigte Übersicht gibt in Kurzform die Ergebnisse der Bindungsstudien von Lanthaniden und Yttrium mit Serumproteinen bzw. Albumin wieder. Abgesehen von einer Arbeit von Gensicke, der in papierelektrophoretischen Untersuchungen keine Bindung von Radiolanthaniden und Radioyttrium an Serumproteine detektieren konnte und daher eine citratgebundene Transportform postulierte, gilt als sicher, daß Lanthanide und Yttrium teilweise an Plasmaproteine gebunden im Blutstrom vorliegen. Dies konnte in einer ganzen Reihe von Untersuchungen mit unterschiedlichen Methoden nachgewiesen werden. Neben der proteingebundenen wird jedoch auch eine der Gleichgewichtslage entsprechende niedermolekulare Metallfraktion, wobei es sich um Aminosäure- und Peptidaggregate handeln dürfte, gefunden. Unklar ist allerdings, welches Plasmaprotein die Vehikelfunktion für Yttrium und die Lanthanide im Blut ausübt. In nicht übereinstimmenden Ergebnissen wird α -Globulin [95] oder Albumin [86] die höhere Affinität für die Metalle zugesprochen. Interessant ist, daß in einer Arbeit von Schomäcker [86] neben der qualitativen Identifizierung von Albumin als alleinigem Transportprotein für Lanthanide auch Stabilitätskonstanten der Ln-Albumin-Komplexe bestimmt wurden, die mit abnehmenden Ionenradius des Lanthanids sehr stark über 5 Größenordnungen zunehmen. Da die schwereren Lanthanide auch eine höhere Tumoraaffinität aufweisen, leitet Schomäcker aus diesen Befunden eine albuminvermittelte Tumoranreicherung ab.

Tab.1.2: Bindung von Yttrium und Lanthaniden an Serumproteine bzw. Albumin: Literaturüberblick

Autor	Methode	Me³⁺-Serum-Wechselwirkung	Me³⁺-Albumin-Wechselwirkung
Gensicke (1962) [88]	Elektrophorese	keine	-
Stern (1956) [89]	Ultrafiltration Dialyse	stark	schwach
Rosoff (1958) [90]	Ultrafiltration Dialyse	stark	schwach
Ekman (1961) [91]	Elektrophorese, Gelfiltration	stark	stark
Birnbaum (1970) [92]	Differenzspektrometrie	-	elektrostatisch über Carboxylat-Gruppen
Seidel (1970) [93]	Gelfiltration	stark	-
Reuben (1971) [94]	Protonenrelaxations- messung	-	4 Bindungsstellen für Gd
Rosoff (1979) [95]	Ultrafiltration Dialyse	stark	schwach
Sosnovsky (1986) [96]	Protonenrelaxations- messung	-	keine bzw. reversibel
Schomäcker (1988) [86]	Dialyse; Serum-Ethanol- fraktionierung	stark	stark; Albumin alleiniges Transportprotein für Y(III) und Lanthanide
Ohyoshi (1993)[97]	Konkurrenz- spektrophotometrie	-	Komplexbindung über Imidazolgruppen

Ebenfalls Unklarheit besteht über den Bindungsmechanismus von Lanthaniden an Serumproteine. Während Birnbaum et al. [92] durch Vergleich der Differenzspektren von Neodym und Albumin mit Neodym und verschiedenen Aminosäuren eine Bindung über Carboxylat-Gruppen des Biopolymers postuliert, macht Ohyoshi [97] durch konkurrenzspektrophotometrische Untersuchungen die Imidazol-Gruppen des Histidins im Albumin für die Bindung von Ytterbium und Gadolinium verantwortlich. Daß die weichen Stickstoffdonator-Atome der Imidazol-Gruppen eine höhere Affinität als die harten Sauerstoffdonator-Atome der Carboxylat-Gruppen haben sollen, erscheint aber aufgrund der Tendenz der Lanthaniden, als harte Säuren Bindungen elektrostatischer Natur einzugehen, eher unwahrscheinlich. Auch die Messung der Relaxationszeiten der Protonen in Wasser in Gegenwart von Gadolinium und Albumin führt zu unterschiedlichen Ergebnissen. Während Sosnovsky [96] aus seinen Messungen schließt, daß Gadolinium entweder nicht oder allenfalls reversibel an Albumin gebunden wird, kann Reuben [94] neben 4 Bin-

dungsstellen für Gadolinium an Albumin auch noch deren scheinbare Bindungs- bzw. Dissoziationskonstante bestimmen.

Wie kann es zu diesen widersprüchlichen Ergebnissen kommen? Eine eindeutige Beantwortung erscheint schwierig, doch dürfte der Einsatz unterschiedlicher Meßmethoden ein ganz entscheidender Punkt sein, da Proteinbindungsmeßmethoden immer in das labile Gleichgewicht zwischen proteingebundenem und nicht-gebundenem Metall eingreifen und dieses entsprechend verschoben wird. Darüber hinaus ist die Verwendung unterschiedlicher Proteinchargen ein weiteres wichtiges Kriterium, da die Bindungseigenschaften in empfindlicher Weise von den Herstellungsmethoden und Reinigungsprozessen abhängen. Aber selbst bei gleichen Isolierungs- und Reinigungstechniken können bei unterschiedlichen Proteinchargen verschiedene Bindungsparameter gefunden werden.

Ein weiterer Faktor, der bei der Bewertung der unterschiedlichen Ergebnisse berücksichtigt werden muß, ist der Fettsäuregehalt der Albuminpräparationen, weil dieser die gleichzeitige Bindung anderer Liganden stark beeinflussen kann. Der Fettsäuregehalt kann hierbei von 0,1 Mol/Mol Albumin bis 2 Mol/Mol Albumin variieren. Weiterhin werden die Bindungsdaten durch verschiedene experimentelle Parameter wie Albuminkonzentration, pH, Temperatur, Ionenzusatz etc. entsprechend modifiziert. Zudem wurden einige Plasmabindungsstudien nach vorheriger Zugabe von Antikoagulantien wie z.B. Heparin durchgeführt, was zu einer Verfälschung der Meßergebnisse führt, da die Antikoagulantien selbst mit ihren sulfonsauren Gruppen eine hohe Affinität zu dreiwertigen Metallen besitzen.

2 Problemstellung

Der Einsatz von ^{90}Y -Komplexen in der palliativen Schmerztherapie multipler Knochenmetastasen ist in den letzten Jahren zu einer wichtigen Behandlungsform in der Nuklearmedizin geworden, da sich ^{90}Y gegenüber anderen Radionukliden durch seine ausgesprochen günstigen Strahlungseigenschaften und leichte Verfügbarkeit auszeichnet. Inhaltlich setzt die Optimierung von ^{90}Y -Radiotherapeutika jedoch dezidierte Kenntnisse des in vivo-Verhaltens des Metall-Ions im Blut voraus. Die Anwendung osteotroper ^{90}Y -Komplexe stützt sich bisher jedoch nur auf den empirischen Befund, daß der Einbau von ^{90}Y bevorzugt in die Knochenmetastasen erfolgt.

Nach der Überführung von Radiometallen in den Blutkreislauf entstehen in Abhängigkeit von der Komplexstabilität der applizierten Radiometallverbindung und der Komplexbildungstendenz körpereigener Anionen und Proteine verschiedene im Gleichgewicht stehende Metallfraktionen im Blut. Diese besitzen jeweils unterschiedliche Affinitäten zu den verschiedenen Körperorganen und -geweben. Die Verteilungsmöglichkeiten des Radiometalls sind in dem in Abb.2.1 dargestellten Schema zusammengefaßt.

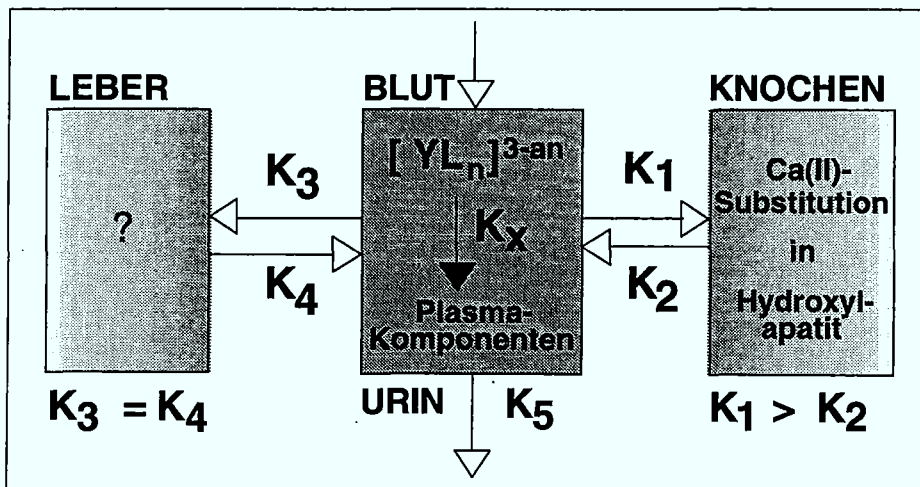


Abb.2.1: Kompartiment-Modell zur Bioverteilung von Yttrium nach seinem Eintritt als Chelatkomplex in das Blutgefäßsystem.

Die Hauptretentionskompartimente stellen hierbei Knochen bzw. Knochenmetastase, Leber und Niere dar. Während das Me(III) -Ion nach seiner Einlagerung in die Knochenstruktur dort fest fixiert wird und für eine Rückreaktion nicht mehr zur Verfügung steht, übernimmt die Leber eine Art Depotfunktion für das Me(III) -Ion, wodurch es nach seiner primären Adsorption in diesem Organ dem Blutkreislauf

nach und nach wieder zur Verfügung gestellt wird. Die Aufteilung auf die verschiedenen Gewebekompartimente ist dabei in entscheidender Weise davon abhängig, ob und in welchem Ausmaß dreiwertige Metalle an Plasmaproteine gebunden werden, da diese neben einer Vehikelfunktion auch noch von essentieller Bedeutung für die Einlagerung in bestimmte Gewebe sind.

Eine genaue Kenntnis der Transportform des Radionuklids ist eine grundlegende Voraussetzung, um das Verhalten der Radiometallverbindungen beispielsweise durch Modifizierung der Liganden in gewünschter Weise beeinflussen zu können. Das genaue Verständnis der Me-Blut-Interaktion kann aber erst die Basis für eine exogene Steuerung und einer damit verbundenen Optimierung der Yttrium-Anreicherung im Zielgewebe schaffen. Bisher ist das vorliegende Wissen zu diesem Fragenkomplex für einen gezielten Eingriff in die Yttrium-Pharmakokinetik noch zu lückenhaft.

Die Klärung der chemischen Transportform im Blut erscheint aber auch vor dem Hintergrund von Interesse, daß mit der Anwendung von a.) über Me-Ligand-Komplexen markierten monoklonalen Antikörpern in der RIT oder b.) mit Radiometallen markierten Partikeln in der intraartikulären Therapie oftmals eine Abgabe des Radiometalls in den Blutpool aufgrund mangelnder Serumstabilität der Verbindungen einhergeht. Auch für diese Fälle ist der Hauptaspekt der Arbeit relevant, der in der bio- und physikochemischen Analyse der Yttrium-Wechselwirkung mit Serumproteinen bestehen sollte.

Zu Beginn der Arbeit sollten verschiedene therapeutisch relevante Yttrium-Komplexe synthetisiert und mittels physikochemischer Methoden (Radiopapier-elektrophorese und Radiopapierchromatographie) charakterisiert werden. Im nächsten Schritt sollte dann das physiologische Verhalten von Radioyttrium bzw. seiner Komplexe im Blut im Mittelpunkt stehen. Ergebnisse auf diesem Gebiet sollten abschließend auch für andere dreiwertige Metalle, speziell für Radio-lanthanide, überprüft werden. Dies sollte zur Klärung beitragen, inwieweit unter Umständen andere Elementparameter einen Einfluß auf die Transportform des Radiometalls besitzen. Hieraus sollten sich konzeptionelle Schlußfolgerungen für den Einsatz anderer therapeutisch relevanter Radiometalle zur Behandlung von Knochenmetastasen ableiten lassen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt, der zu einer effizienteren Ausschöpfung des therapeutischen Potentials dreiwertiger Metalle beitragen kann, ist die Klärung der Frage, wie die Aufnahme der Radionuklide in die Gewebekompartimente in mechanistischer Weise erfolgt. Aufgrund der Knochenaffinität dreiwertiger Metalle vor allem im Hinblick auf ihre präferentielle Einlagerung in die in den Knochen liegenden

Knochenmetastasen, ist der Mechanismus des Einbaus in die Hydroxylapatitstruktur von großem Interesse. Als bisher nicht belegbare Hypothese wird dabei eine nichtisotope Ca^{2+} -Substitution durch dreiwertige Metalle angenommen [98]. Des weiteren steht zur Diskussion, daß dreiwertige Me-Ionen auf der anorganischen Oberfläche des Knochens unlösliche Phosphat-Salze bilden und durch diese Reaktion mit der Knochenoberfläche in den Knochen eingebaut werden [99]. Die Prüfung dieser Hypothesen sollte durch den Einsatz von Hydroxylapatit erfolgen, der eine in vitro-Simulation der Ablagerung verschiedener Yttrium-Komplexe erlaubt.

3 Experimentelles

3.1 Radionuklide

3.1.1 $^{86}\text{Y}/^{88}\text{Y}$

Zur Herstellung von ^{86}Y ($T_{1/2} = 14,7 \text{ h}$; β^+ 32%) und ^{88}Y ($T_{1/2} = 106,7 \text{ d}$; γ) wurden SrCO_3 -Tabletten (300 mg; $\varnothing$ 13 mm) gepreßt, wobei für ^{86}Y angereichertes $^{86}\text{SrCO}_3$ (Technabexport Moskau, ^{86}Sr -Anreicherung 96,3%) und für ^{88}Y SrCO_3 natürlicher Isotopenzusammensetzung (^{84}Sr : 0,56%; ^{86}Sr : 9,86%; ^{87}Sr : 7,0%; ^{88}Sr : 82,58%) verwendet wurde. Die Tabletten wurden in einen Aluminiumtargethalter überführt und mit Al-Folien (insgesamt 700 μm dick) als Absorberfolien abgedeckt, um durch Energiedegradierung des Protonenstrahls die für die jeweilige Kernreaktion optimale Protonenenergie zu erhalten. Das Target wurde dann in einem Targetkopf mit 4π -Wasserkühlung am Kompaktzyklotron CV 28 des Forschungszentrums Jülich GmbH mit Protonen bestrahlt. Für die Kernreaktion $^{86}\text{Sr}(p,n)^{86}\text{Y}$ lag die günstigste Produktionsenergie im Bereich von 14→10 MeV, wodurch die Bildung radionuklidischer Verunreinigungen durch die bei höher werdenden Energien einsetzende $^{86}\text{Sr}(p,2n)$ -Reaktion noch relativ gering waren. Die Bestrahlungsdauer betrug bei einem Strahlstrom von 4 μA 4 h, wodurch ca. 30 mCi ^{86}Y erzeugt werden konnten. Die ^{88}Y -Produktion erfolgte im Energiebereich von 18→10 MeV, da hier die Produktion von kurzlebigeren Nebenprodukten, wie ^{85}Y , $^{85\text{m}}\text{Y}$, ^{87}Y und $^{87\text{m}}\text{Y}$ aufgrund der langen Halbwertszeit von ^{88}Y keine große Rolle spielte. Die Ausbeute für ^{88}Y lag nach einer Bestrahlungsdauer von 5 h bei 5 μA bei ca. 200 μCi .

An die Bestrahlung schloß sich die radiochemische Abtrennung der Y-Isotope vom Sr-Targetmaterial und den störenden Isotopen ^{83}Rb und ^{85}Sr an. Das Trennschema ist in Abb. 3.1 dargestellt [100]. Das SrCO_3 -Target wurde in 0,5 mL HCl gelöst und mit 8 mL H_2O verdünnt. Nach Zusatz von 2 mg La(III) wurden die Y-Isotope zusammen mit $\text{La}(\text{OH})_3$ durch Zugabe von Ammoniak in der Hitze gefällt. Nach Abzentrifugieren des Niederschlags wurde dieser gewaschen, erneut in 1-2 Tropfen HCl gelöst und auf 10 mL verdünnt. Zu dieser Lösung wurde dann Aminex A5 gegeben, welches nach Sorption der Y(III)- und La(III)-Kationen abzentrifugiert wurde. Das beladene Harz wurde danach auf eine kleine Ionenaustauschersäule (4x40 mm), die ebenfalls mit Aminex A5 gefüllt war, transferiert. Die Säule wurde zuerst mit 0,07 M α -Hydroxyisobuttersäure (α -HIB) gespült, um eventuelle Fe-Verunreinigungen zu entfernen und danach $^{86/88}\text{Y}$ mit 0,15 M α -HIB von der Säule eluiert, wobei der La-Träger quantitativ auf der Säule verblieb. Die in wenigen Tropfen α -HIB gesammelte Aktivität wurde mehrmals mit HClO_4 abgeraucht und

zur Abtrennung von α -HIB über eine kleine Kationenaustauschersäule, gefüllt mit Dowex 50W-X8, mit HCl (0,15 M HCl: Sorption der Y-Isotope; 6 M HCl: Elution der Y-Isotope) gereinigt.

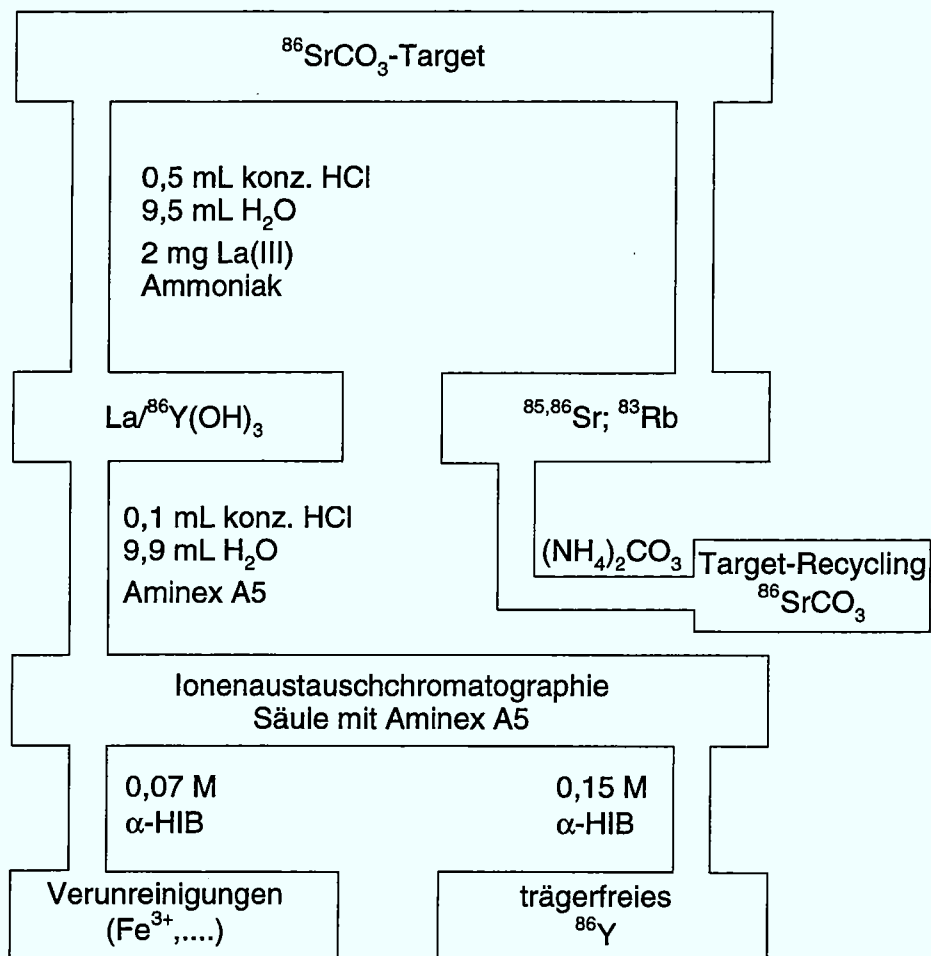


Abb.3.1: Fließschema des radiochemischen Abtrennungsverfahrens für ^{86}Y (^{88}Y -Abtrennung verläuft analog).

3.1.2 Spallationsproduzierte Radiolanthanide

Für die in Abschnitt 4.8 beschriebenen Experimente wurden trägerfreie Radiolanthanide eingesetzt, die im VIK Dubna (Rußland) zur Verfügung gestellt wurden. Die Produktion erfolgte über die Bestrahlung von Tantaltargets mit 660 MeV Protonen. Zur Abtrennung der Radiolanthanide wurde das Target in einem 12 M HF - 1M HNO_3 -Gemisch gelöst und die Radiolanthanidfluoride durch Zugabe von La(III) und Kationenaustauscherharz Aminex A-5 (Biorad) als inertem Kollektor mitgefällt [101]. Die an dem Austauscherharz adsorbierten Radiolanthanide und Lanthan

wurden auf eine kleine Aminex A-5 Säule (3x70 mm) überführt. Danach wurden die Radiolanthanide bei 40°C und einem Fluß von 3 cm/min nacheinander mit stufenweiser Konzentrationserhöhung von α -HIB (pH 4,5) von 0,085 M für Lu bis 0,475 M für La von der Säule eluiert. Das Volumen, in der sich die voneinander separierten Radioelemente befanden, betrug ca. 200-250 μ L. Diese wurden dann ebenfalls zur Abtrennung von α -HIB über eine kleine Austauschersäule mit Dowex 50W-X8, wie für $^{86/88}\text{Y}$ bereits beschrieben, gereinigt.

Die verwendeten trägerfreien Lanthanidisotope sind in Tab.3.1 mit ihren wichtigsten Zerfallsdaten aufgelistet.

Tab. 3.1: Zerfallsdaten der eingesetzten Radiolanthanide

Nuklid	Halbwertszeit	Haupt- γ -Energien [keV]	Häufigkeit [%]
^{139}Ce	137,62 d	165,9	80,4
^{143}Pm	265,05 d	742,0	38,5
^{145}Sm	340,28 d	61,2	13,0
^{159}Dy	143,52 d	58,2	4,0
^{169}Yb	32,02 d	63,1	43,7
		197,9	34,9
		177,2	21,4
^{173}Lu	1,37 a	272,0	13,0
		78,6	7,8

3.1.3 ^{67}Ga

^{67}Ga ($T_{1/2} = 78,3$ h; EC) wurde a.) von Amersham Buchler als ^{67}Ga -Citrat bezogen (spez. Aktivität >10 mCi/ μg Ga) und b.) selbst am CV 28 durch Bestrahlung von Zn-Targets in trägerfreier Form hergestellt.

a.) ^{67}Ga -Citrat von Amersham mußte vor seiner Verwendung einem Reinigungsprozess unterworfen werden, um zum einen Citrat, welches die Proteinbindungsstudien in erheblichem Maße stören würde, und zum anderen Eisen zu entfernen. Das Eisen machte sich beim Eindampfen der ^{67}Ga -Citratlösung durch seine Gelbfärbung bemerkbar. Zudem wurde es mit gelbem Blutlaugensalz $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, welches mit Fe^{3+} einen tiefblauen Niederschlag bildet, als Berliner Blau nachgewiesen. Zur Reinigung wurde der Rückstand nach dem Eindampfen in 6 M HCl aufgenommen und mit wenigen Zn-Körnchen versetzt, um Fe^{3+} zu Fe^{2+} zu reduzieren. Die Lösung wurde dann auf eine kleine Säule mit Dowex 1-X8 gegeben. Mit 6 M HCl wurde gespült, Citrat dadurch entfernt und mit 1 M HCl die ^{67}Ga -Aktivität eluiert. Fe^{2+} und Zn^{2+} verblieben quantitativ auf der Säule.

b.) Die Produktion von ^{67}Ga erfolgte über die Kernreaktion $^{\text{nat}}\text{Zn}(p,xn)^{67}\text{Ga}$. Die hierzu benötigten Zn-Targets wurden durch Pressen von Zn-Pulver bei 10 t/cm^2 hergestellt (500 mg Zn; $\varnothing$ 13 mm). Die Zn-Preßlinge wurden wie für $^{86/88}\text{Y}$ bereits beschrieben in einen Aluminiumtargethalter überführt, mit Al-Folien abgedeckt und für 6 h am Kompaktzyklotron CV 28 des Forschungszentrums Jülich GmbH mit $4\text{ }\mu\text{A}$ bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurde das erzeugte ^{67}Ga und ebenfalls entstandenes ^{66}Ga ($T_{1/2} = 9,4\text{ h}$; β^+) vom Zn-Targetmaterial mittels Kationenaustauschchromatographie abgetrennt. Hierzu wurde das Zn-Target in 8 M HCl gelöst und diese Lösung auf eine kleine, mit Dowex 50W-X8 (200 mesh; H^+ -Form) gefüllte Säule (7x30 mm) gegeben, die zuvor mit 8 M HCl konditioniert worden war. Während die Ga-Isotope auf der Säule verblieben, wurde Zn vom Austauscherharz nicht adsorbiert und durch mehrmaliges Spülen mit 8 M HCl entfernt. Darauf wurde ^{67}Ga mit 4 M HCl von der Säule eluiert und die Gesamtaktivität in ca. 5 mL aufgefangen. Auch hier war wiederum eine Abtrennung von Eisen erforderlich. Dazu wurde die aktive Ga-Lösung eingeeengt, in 8 M HCl aufgenommen und mit 10 mg KI zur Reduktion von Fe^{3+} zu Fe^{2+} versetzt. Diese Lösung wurde dann erneut über die Kationenaustauschersäule gegeben, wobei Fe^{2+} im Gegensatz zu Gallium nicht sorbiert wurde und mit 8 M HCl entfernt werden konnte. ^{67}Ga bzw. ^{66}Ga wurde dann wiederum mit 4 M HCl von der Säule eluiert.

3.1.4 Andere Radionuklide

^{18}F ($T_{1/2} = 1,83\text{ h}$; β^+ 99%) wurde durch 17 MeV-Protonenbestrahlung von ^{18}O -angereichertem Wasser am Babyzyklotron des Instituts für Nuklearchemie des Forschungszentrums Jülich GmbH über die Kernreaktion $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$ als n.c.a. $^{18}\text{F}^-$ aq. hergestellt.

^{32}P ($T_{1/2} = 14,3\text{ d}$; β^-) wurde in trägerfreier Form als Orthophosphat in salzsaurer Lösung von Amersham Buchler bezogen.

^{35}S ($T_{1/2} = 87,5\text{ d}$; β^-) wurde als Sulfat in wäßriger Lösung mit einer spezifischen Aktivität von 24,3-40,5 Ci/mg Schwefel ebenfalls von Amersham Buchler bezogen.

3.2 Materialien

Blutserum

Zur Gewinnung bzw. Untersuchung von Serum wurde Patienten venöses Blut abgenommen und dieses in Monovetten (Sarstedt) gesammelt. Die Verwendung von Serum hat gegenüber Plasma den Vorteil, daß keine Antikoagulantien zugegeben werden müssen, die in den durchgeführten Metallproteinbindungsstudien aufgrund ihrer Metallbindungskapazität die Bindungsgleichgewichte empfindlich gestört hätten. Nach der Gerinnung des Bluts nach ca. 10 min wurde das Serum durch 10 minütige Zentrifugation bei 4000 Upm von den Zellbestandteilen des Blutplasmas und Fibrinogen bzw. Fibrin abgetrennt. Durch die Benutzung von Monovetten wird eine verzögerte Gerinnung (Bildung von Fibrinfäden) während der Serumanalysen verhindert.

Humanserumalbumin (HSA)

Als Modellserumprotein wurde HSA eingesetzt. Serumalbumin gehört mit seinem Molekulargewicht von 69000 zu den kleinsten Plasmaeiweißkörpern. Mit einem Anteil von 60% an der Plasmaeiweißmenge (35-45 g/L) ist es das Hauptserumprotein im menschlichen Blutplasma, in dem es als Depot- und Transportprotein für viele endogene und exogene Verbindungen fungiert [102-104]. Dazu gehören z.B. Farbstoffe, Medikamente, Fettsäuren, längerkettige Alkohole, Bilirubin und anorganische Ionen. Darüber hinaus ist es leicht und preiswert aus Blutplasma zu isolieren (Ethanolfraktionierung bei tiefen Temperaturen nach Cohn) und zeichnet sich durch hohe Stabilität z.B. gegen drastische pH- oder Temperaturänderungen aus. Diese hohe Stabilität und gute Löslichkeit ergibt sich aus den vielen Disulfidbindungen und der hohen Gesamtladung, ca. 185 ionische Gruppen pro Molekül bei pH 7. Aus diesen Gründen wird HSA häufig als Modellprotein in chemischen und physikalischen Studien eingesetzt. Für HSA charakteristisch ist sein geringer Tryptophan- und Methionin-Gehalt und sein hoher Gehalt an Cystein und den geladenen Aminosäuren Asparagin- und Glutaminsäure, Lysin und Arginin. Obgleich die Nettoladung im physiologischen pH-Bereich negativ ist, bindet Albumin bevorzugt negativ geladene Liganden. Im Zusammenhang mit der Bindung von Kationen sei erwähnt, daß Albumin für zweiwertige Übergangsmetallionen spezifische Bindungsstellen besitzt, wohingegen Ionen mit geschlossenen Elektronenschalen (z.B. Ca, Mg usw.) unspezifisch über elektrostatische Kräfte an Carboxylat-Gruppen des Albumins gebunden werden [105-107].

HSA wurde von Sigma bezogen und zwar einmal in gereinigter fettsäurefreier Form (HSA-Anteil > 99%) und einmal als Cohn-Fraktion V in lyophilisierter Form

(HSA 95-98%; Rest β - und γ -Globuline). Da beide Albuminfraktionen keine signifikanten Unterschiede in ihrem Bindungsverhalten aufwiesen, wurde zumeist auf die preisgünstigere Cohn-Fraktion V zurückgegriffen. Zur Entfernung von niedermolekularen Verunreinigungen wurde es zumeist einer Dialyse unterworfen (vgl. Abschnitt 3.3.3).

Humanserumtransferrin

Serumtransferrin ist ein einkettiges Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 79570 und einer Konzentration im Blutplasma von 2,95 g/L, dessen Aufgabe der Transport von Eisen-Ionen zwischen Stellen für die Aufnahme, Nutzung und Speicherung ist [108-110]. Transferrin bindet eine Vielzahl von Metallionen mit sehr unterschiedlichen Bindungskonstanten und ist daher auf vielen Feldern der Biochemie und Pharmakologie von Interesse. Serumtransferrin besitzt zwei gleiche spezifische Metallbindungsstellen, die eine hohe Bindungsaffinität zu Eisen haben. Charakteristisch für Transferrine ist, daß für die Bildung eines stabilen Metall-Proteinkomplexes ein synergistisches Anion erforderlich ist [111]. Unter physiologischen Bedingungen übernimmt Bicarbonat diese Funktion. Somit wird Eisen im Blut als ternärer Fe^{3+} -Anion-Transferrin Komplex transportiert. Eine Metallbindung in Abwesenheit von Bicarbonat oder einem anderen geeigneten Ersatzanion ist im allgemeinen zu schwach, um beobachtet zu werden [112-114]. Aufgrund dieser interessanten Metallbindungseigenschaften wurde Serumtransferrin in die Proteinbindungsstudien dreiwertiger Metalle einbezogen.

Human apo-Transferrin (apo steht für metallfreies Protein, da die beiden Metallbindungsstellen des Transferrins normalerweise z.T. mit Eisen belegt sind) wurde ebenfalls von Sigma (Siderophilin, eisenarm ca. 98%) bezogen. Da es aber stark mit Chelatbildnern und anderen Agenzien verunreinigt war, wurde es wie in Abschnitt 3.3.3 beschrieben, einer dreitägigen Dialyse unterworfen.

Modellmakromoleküle

Um das Bindungsverhalten einzelner potentieller Bindungspartner für Metalle im Albuminmolekül studieren zu können, wurden Homopolymere ausgewählt, die in ihrer Kette jeweils nur eine Aminosäure mit einer ausgewählten funktionellen Gruppe tragen. Da für dreiwertige Metalle die Wechselwirkung mit Carboxylat-Gruppen am wahrscheinlichsten erschien, wurde Poly-D-glutaminsäure (Aldrich; MG: 50.000-100.000) als Modellpolyaminosäure eingesetzt. Zum Vergleich wurden Bindungsstudien mit Poly-L-lysin Hydrobromid (ebenfalls Aldrich; MG: 70.000-150.000) durchgeführt.

Komplexliganden

Zur Herstellung verschiedener Yttrium-Komplexe und für Verdrängungsstudien wurden Nitrilotriessigsäure (NTA), Dinatriumdihydrogenethylendiamintetraacetat (EDTA), Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA) und (N-(2-Hydroxyethyl)-ethylendiamin-N, N, N-triessigsäure (HEDTA) bezogen von Merck, α -Hydroxyisobuttersäure (HIB) von Fluka und Ethylendiamin-N, N, N',N'-tetrakis-methylenphosphonsäure (EDTMP) von INC Biochemicals verwendet.

Hydroxylapatit

Als in vitro-Modell für Knochenadsorptionsmessungen wurde Bio-Gel HTP Hydroxylapatit (CaP) zur Chromatographie von Proteinen und Nukleinsäuren von Bio-Rad Laboratories verwendet. Die Oberfläche des kristallinen Hydroxylapatits betrug ungefähr 50 m²/g.

Versuchstiere

Die in den tierexperimentellen Studien eingesetzten NMRI-Mäuse waren ca. 4-6 Wochen alt und besaßen ein durchschnittliches Gewicht von 25 g.

Patienten

Zur in vivo-Evaluierung von [⁸⁶Y]Citrat und [⁸⁶Y]EDTMP mittels PET wurden insgesamt 10 Patienten mit primärem Prostatakrebs, die multiple Knochenmetastasen entwickelt hatten, herangezogen.

3.3 Methoden

3.3.1 Aktivitätsmessung

Die relative Aktivitätsbestimmung der Papierstreifen von Papierelektrophorese und Papierchromatographie und der Fraktionen von Gelfiltration und Ultrafiltration erfolgte an einem Auto-Gamma-Zählsystem (Cobra™, Modell 5002, Packard Instrument Company), wozu für das jeweilige Nuklid ein geeignetes Energiefenster gewählt wurde. Im Fall der Simultanmessung von ³²P und ⁸⁸Y wurde für die Messung der Bremsstrahlung von ³²P ein niederenergetisches (60-200 keV) und für die Messung der γ -Linie bei 1836 keV von ⁸⁸Y ein hochenergetisches (1600-2000 keV) Fenster eingestellt. Wie aus der Abb.3.2 ersichtlich, erreicht die Bremsstrahlung eine Maximalenergie von ca. 1100 keV, so daß im Energiebereich von 1600-2000 keV allein die γ -Linie von ⁸⁸Y bei 1836 keV gemessen wurde. Der Anteil von ⁸⁸Y im niederenergetischen ³²P-Fenster konnte durch vorherige Messung einer reinen ⁸⁸Y-Probe bestimmt werden, so daß der ⁸⁸Y-Beitrag zur ³²P-Aktivität im 60-200 keV-Fenster rechnerisch eliminiert werden konnte.

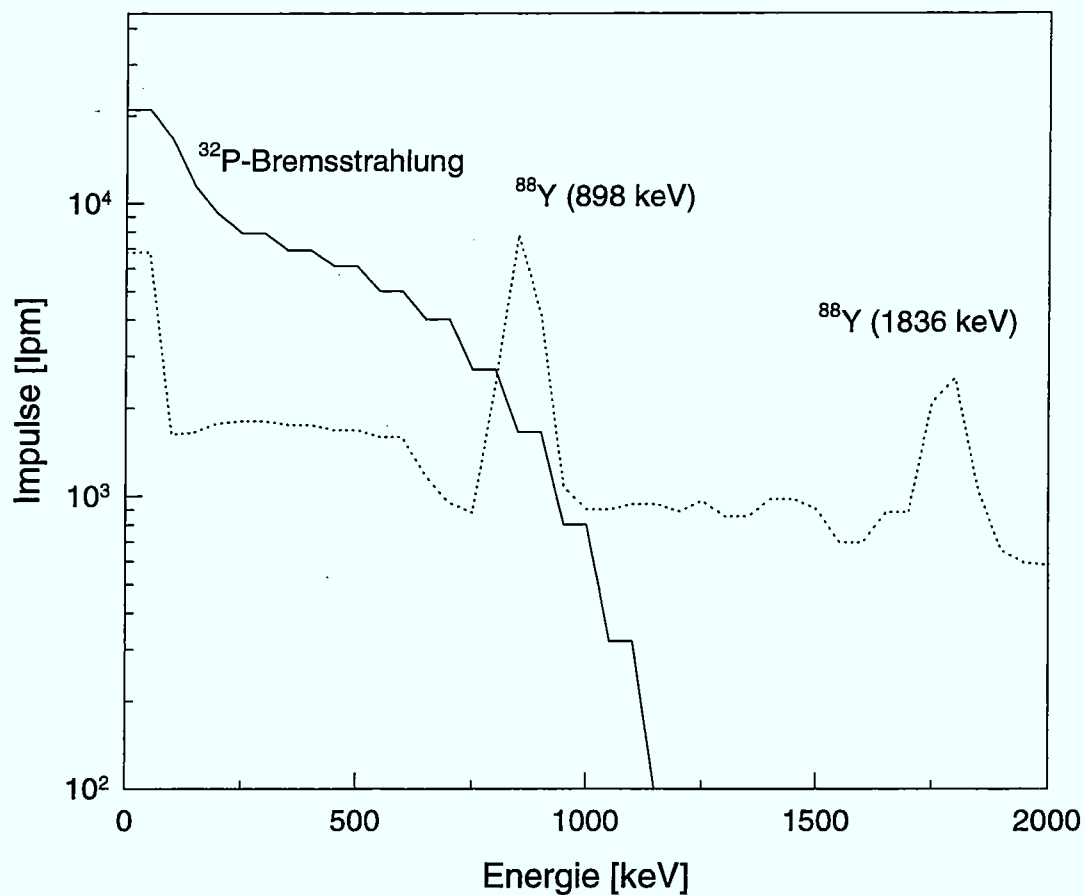


Abb.3.2: Bremsstrahlungsspektrum von ^{32}P und γ -Spektrum von ^{88}Y , gemessen am Auto-Gamma-Zählsystem Cobra™, Modell 5002.

Quantitative Aktivitätsmessungen bzw. Analysen komplexer Gemische verschiedener γ -Emitter wurden an kalibrierten Ge(Li)- und HPGe-Detektoren durchgeführt. Die Messung des niederenergetischen β^- -Strahlers ^{35}S erfolgte nach Eindampfen der durch Gelfiltration erhaltenen Fraktionen auf Teflonplättchen an einem Glok-kenzählrohr.

3.3.2 pH-Messung

Die Messung der pH-Werte wurde mit einem pH-Meter der Firma Knick durchgeführt, wobei verschiedene Elektroden verwendet wurden. Der pH-Wert von Proteinlösungen wurde mit einer zuvor kalibrierten Biotrode von Hamilton und der pH-Wert von Puffer- und sonstigen Lösungen mit einer Minitrode der Firma Schott-Geräte GmbH bestimmt.

3.3.3 Dialyse

Niedermolekulare Verunreinigungen (z.B. komplexbildende Substanzen) der Humanserumalbumin- und apo-Transferrin-Chargen wurden mittels Dialyse entfernt. Dazu wurden die Proteine in H₂O gelöst und in einem Dialyseschlauch von Sigma (Molekularausschlußgewicht = 12.000-14.000) für 96 h bei 4°C gegen mehrmals gewechseltes bidestilliertes Wasser dialysiert. Vor der Dialyse wurde der pH-Wert der jeweiligen Proteinlösung mit NaOH auf ca. pH 9 eingestellt, um die negativ geladenen Chelatverunreinigungen von dem bei diesem pH ebenfalls stark negativ geladenen Proteinmolekül effektiv entfernen zu können. Wurde der pH zuvor nicht adaptiert, sank er während der Dialyse so stark ab (auf ca. pH 5,1), daß die Abtrennung von den Chelatbildnern nicht quantitativ möglich war. Nach der Dialyse wurden die Proteinlösungen über einen Sterilfilter (0,22 µm; Millipore) filtriert und bei -20°C im Gefrierschrank aufbewahrt.

3.3.4 Refraktometrie

Die Konzentrationsbestimmung der HSA- bzw. apo-Transferrinlösungen nach der Dialyse erfolgte refraktometrisch. Dazu wurde der Brechungsindex n_D der Proteinlösungen an einem Refraktometer der Fa. Carl Zeiss bei 22°C gemessen. Die jeweilige Proteinkonzentration konnte dann aus den zuvor ermittelten Eichgeraden abgelesen werden. In Abb.3.3 ist die Eichgerade für Albumin wiedergegeben.

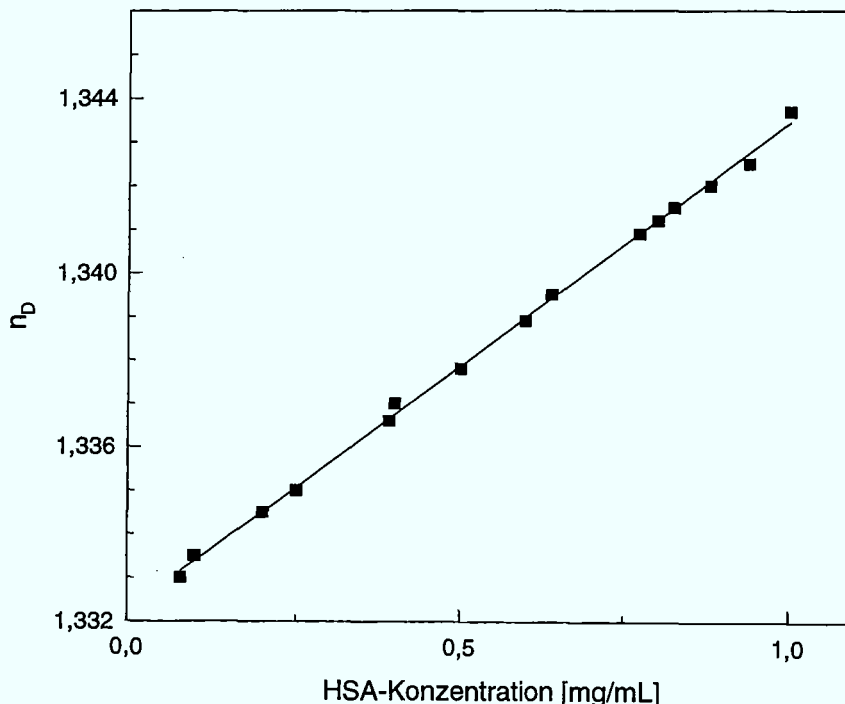


Abb.3.3: Brechungsindex bei 22°C in Abhängigkeit von der Albumin-Konzentration.

3.3.5 Chromatographie verschiedener ^{88}Y -Komplexe

Synthese verschiedener ^{88}Y -Komplexe

Die Synthese der ^{88}Y -Komplexe erfolgte durch Verdampfen einer trägerfreien ^{88}Y -Stammlösung auf einem Teflonplättchen und Aufnahme des Metalls in der jeweiligen Ligandlösung (Ligandenkonzentration = 0,029 M). Diese war zuvor durch Lösen einer entsprechenden Menge des Liganden in H_2O und Einstellen des pH-Werts auf 7,0 mit NaOH hergestellt worden.

Radiopapierchromatographie (RC)

Eine mit geringem apparativen Aufwand durchführbare analytische Methode, die Aufschluß über die radiochemische Reinheit und Hinweise auf die Stabilität von Metallkomplexen liefert, ist die aufsteigende Papierchromatographie. Zur Analyse der zu untersuchenden radioaktiven Metallkomplexe wurde ein geringes Volumen (5 μL) der Komplexlösung mit einer Kapillare auf einen 2 cm breiten Papierstreifen (MN 261; Macherey und Nagel) 2 cm oberhalb des Papieranfangs aufgebracht und dieser nach dem Trocknen zur Entwicklung in eine bis zu einer Höhe von 1 cm mit Laufmittel (Pyridin:Ethanol:Wasser 1:2:4) gefüllte Chromatographiekammer gehängt. Nachdem die Laufmittelfront eine Höhe von 12 cm erreicht hatte, wurden die Papierstreifen aus der Kammer genommen, getrocknet, in 1 cm breite Streifen geschnitten und die Radioaktivitätsverteilung am γ -Counter bestimmt.

Radiopapierelektrophorese (RE)

Eine weitere schnell durchführbare Methode zur Charakterisierung von radioaktiven Metallkomplexen, die darüber hinaus auch Aufschluß über den Ladungszustand liefert, ist die Papierelektrophorese. Dazu wurde eine geringe Menge (5 μL) des zu analysierenden radioaktiven Metallkomplexes auf einen vorher mit der jeweiligen Grundelektrolytlösung getränkten 2 cm breiten Papierstreifen (MN 260, Macherey und Nagel), der in einer Elektrophoresekammer lag und dessen Enden jeweils in eine Elektrolytlösung aus TRIS-acetat Puffer (0,075 M) tauchten, aufgebracht. Die Startposition der Komplexe wurde 2 cm von der Kathode entfernt gewählt, da alle untersuchten Komplexe eine negative Ladung aufwiesen und in Richtung Anode wanderten. In die Elektrolytlösung tauchten zwei Platinelektroden, an die eine Spannung von 400 Volt angelegt wurde. Die Elektrophoresedauer betrug 2 h. Nach dieser Zeit wurden die Papierstreifen getrocknet, in Streifen geschnitten und am γ -Counter die Aktivitätsverteilung des Pherogramms ermittelt.

3.3.6 Trennung von proteingebundenem von nicht-gebundenem Radiometall

Die Analyse von Radiometall-Proteingemischen wurde mittels Gelfiltration und Ultrafiltration durchgeführt. Beide Methoden sollten eine Trennung von proteingebundenem von nicht-gebundenem Metall ermöglichen, ohne die sensiblen Gleichgewichte zwischen gebundenem und freiem Metall allzusehr zu stören.

Gelfiltration

Diese flüssigchromatographische Methode beruht auf den unterschiedlichen Molekülgrößen der zu trennenden Moleküle. Die Separation wird durch ein Trenngel definierter Porengröße erreicht. Während große Moleküle (z.B. Proteine) das Trenngel ungehindert passieren können, werden kleinere Moleküle (z.B. Metallionen und -Komplexe), die in die Poren des Gels eindringen können, zurückgehalten und erscheinen verzögert im Eluat. In den hier beschriebenen Versuchen wurden Glassäulen (1x25 cm) mit Sephadex G-25 (Pharmacia; Trennbereich MG: 1000-5000) gefüllt. Zum Teil wurden auch Fertigsäulen PD-10 (Pharmacia) eingesetzt, die ebenfalls mit Sephadex G-25 gefüllt waren. Als Eluens wurde TRIS-acetat-Puffer (pH 7,0) benutzt. Die mit Tris-Puffer nicht eluierbare Aktivität wurde mit 5%-iger EDTA-Lösung von der Säule gespült. Die Elutionsgeschwindigkeit, die mit einer peristaltischen Pumpe reguliert wurde, betrug 0,5 mL/min. An die Säule schloß sich ein UV-Detektor an, der eine Kontrolle des Elutionsverhaltens der Proteine bei 286 nm ermöglichte. Mittels Fraktionensammler wurden pro Fraktion 1 bzw. 0,5 mL (abhängig vom Säulenvolumen) aufgefangen und die Aktivitätsverteilung am γ -Counter bestimmt.

Ultrafiltration

Hier basiert die Trennung von proteingebundenem und nicht-gebundenem Radiometall auf einem Siebmechanismus. Niedermolekulare Probenbestandteile sind in der Lage, durch die Poren der Trennmembran zu permeieren, wohingegen Makromoleküle die Membran nicht durchdringen können und auf der Retentatseite zurückbleiben. In den Bindungsstudien wurden Mikrokonzentratoren von Amicon (Microcon-30) benutzt, die für Moleküle bis zu 30.000 Dalton passierbar sind. Die gering bindenden, anisotropen hydrophilen Membranen der Ultrafiltrationseinheiten vom Typ YM besitzen eine mittlere Porenweite von 2,1 nm. Die zu analysierenden Proben (160 μ L) wurden in die Mikrokonzentratoren pipettiert und für 30 min in einer Zentrifuge mit starrem Rotor zentrifugiert. Darauf wurden Retentat, Permeat und Membran am γ -Counter gemessen und die Aktivitätswerte entsprechend ihrer Retentat- bzw. Permeatvolumina korrigiert.

3.3.7 Radiometall-Proteinbindungsstudien

Der Hauptaspekt der Arbeit bestand in der Untersuchung der Bindung von Radiometallen und Anionen (z.T. radioaktiv markiert) an Serumproteine. Dies erforderte eine intensive Untersuchung der Bindungsverhältnisse verschiedener Protein- (Humanserumalbumin, apo-Transferrin und Vollblutserum) bzw. Modellpolyelektrolytsysteme (Polylysin und Polyglutaminsäure) durch die systematische Variation folgender experimenteller Parameter:

Art des endogenen Anions

(Chlorid, Bicarbonat, Citrat, Fluorid, Sulfat und Phosphat, wobei die drei letzteren radioaktiv markiert waren) bei konstanter HSA- (10 mg/mL), [^{88}Y]Y(III)-Träger- ($1 \cdot 10^{-4}$ M) und Anionen-Träger-Konzentration ($1 \cdot 10^{-4}$ M) (vgl. Abschnitt 4.3).

Inkubationszeit

bei konstanter HSA- (10 mg/mL), [^{88}Y]Y(III)-Träger- $1 \cdot 10^{-4}$ M und [^{32}P]PO₄-Träger-Konzentration ($1 \cdot 10^{-4}$ M) (vgl. Abschnitt 4.4.1).

[^{88}Y]Y(III)-Trägergehalt

bei konstanter HSA- (1 mg/mL) und [^{32}P]PO₄-Träger-Konzentration ($1 \cdot 10^{-4}$ M) (vgl. Abschnitt 4.4.2).

pH-Wert

bei konstanter HSA- (10 mg/mL), [^{88}Y]Y(III)-Träger- ($1 \cdot 10^{-4}$ M) und [^{32}P]PO₄-Träger-Konzentration ($1 \cdot 10^{-4}$ M) (vgl. Abschnitt 4.4.3).

HSA-Konzentration

bei konstanter [^{88}Y]Y(III)-Träger- ($1 \cdot 10^{-4}$ M) und [^{32}P]PO₄-Träger-Konzentration ($1 \cdot 10^{-4}$ M) (vgl. Abschnitt 4.4.4).

Konzentration verschiedener Komplexligenanden

(Nitrilotriacetat, Citrat und α -Hydroxyisobutyrat) bei konstanter HSA- (1 mg/mL), [^{88}Y]Y(III)-Träger- ($1 \cdot 10^{-4}$ M) und [^{32}P]PO₄-Träger-Konzentration ($1 \cdot 10^{-4}$ M) (vgl. Abschnitt 4.4.6).

[^{88}Y]Y(III)-Trägergehalt

a.) in mit [^{32}P]PO₄ markiertem Vollblutserum (vgl. Abschnitt 4.5.1), b.) bei konstanter apo-Transferrin- (1 mg/mL) und [^{32}P]PO₄-Träger-Konzentration ($1 \cdot 10^{-4}$ M) (vgl. Abschnitt 4.5.2) und c.) bei konstanter Polyglutaminsäure- (1 mg/mL) und [^{32}P]PO₄-Träger-Konzentration ($1 \cdot 10^{-4}$ M) (vgl. Abschnitt 4.5.4).

Apo-Transferrin-Konzentration

bei konstanter [^{88}Y]Y(III)-Träger- ($1 \cdot 10^{-4}$ M) und [^{32}P]PO₄-Träger-Konzentration ($1 \cdot 10^{-4}$ M) (vgl. Abschnitt 4.5.3).

Art des dreiwertigen Me-Ions

(Ga, Sc, In, Lu, Yb, Tm, Er, Y, Dy, Gd, Sm, Eu, Nd, Pr, Ce und La) bei konstanter HSA- (10 mg/mL, wobei auf undialysiertes HSA zurückgegriffen wurde, um die wahren Verhältnisse im Blut besser simulieren zu können), [^{32}P]PO₄-Träger- ($1 \cdot 10^{-4}$ M) und Me(III)-Träger-Konzentration ($1 \cdot 10^{-4}$ M) (vgl. Abschnitt 4.6).

Art des endogenen Anions

(Chlorid, Bicarbonat, Citrat, Sulfat und Phosphat) bei konstanter HSA- (10 mg/mL), [^{67}Ga]Ga(III)-Träger- ($5 \cdot 10^{-5}$ M) und Anionen-Träger-Konzentration ($1 \cdot 10^{-4}$ M) (vgl. Abschnitt 4.7.1).

[^{32}P]PO₄-Träger-Konzentration

(mit und ohne PO₄ ($1 \cdot 10^{-4}$ M)) bei trägerfreiem ^{67}Ga bzw. konstanter [^{67}Ga]Ga(III)-Träger- ($1 \cdot 10^{-4}$ M) und apo-Transferrin-Konzentration (1 mg/mL) (vgl. Abschnitt 4.7.2).

Art des Radiolanthanids

(^{139}Ce , ^{145}Sm , ^{159}Dy , ^{169}Yb und ^{173}Lu) (trägerfrei bzw. geträgert ($1 \cdot 10^{-4}$ M)) ohne und mit [^{32}P]PO₄-Träger ($1 \cdot 10^{-4}$ M) bei konstanter HSA-Konzentration (10 mg/mL) (vgl. Abschnitt 4.8.1).

[^{32}P]PO₄-Träger-Konzentration

(mit und ohne PO₄ ($1 \cdot 10^{-4}$ M)) bei trägerfreiem Radiolanthanidgemisch aus ^{139}Ce , ^{143}Pm und ^{173}Lu und konstanter HSA-Konzentration (10 mg/mL) (vgl. Abschnitt 4.8.2).

Präparation der zu analysierenden Protein-Metall-Anionen-Gemische

Die Präparation erfolgte immer nach dem gleichen Prinzip, variiert wurden Konzentrationen und Zusammensetzungen. Zuerst wurde die Proteinkonzentration der dialysierten Proteinlösungen (HSA bzw. apo-Transferrin) refraktometrisch bestimmt (vgl. Abschnitt 3.3.4). Darauf wurde die Proteinlösung gemäß der Versuchskonzentration verdünnt und mit NaCl eine Ionenstärke von 0,15 M eingestellt. Da alle Bindungsstudien, außer der pH-Abhängigkeit, bei einem konstanten pH von 7,0 durchgeführt wurden, mußte eine bestimmte Menge an NaOH bzw. HCl zur pH-Adaption zum Protein-Metall-Anion-Gemisch zugegeben werden. Diese Menge wurde in einem Vorversuch ermittelt, indem 150 µL der Proteinlösung mit 10 µL Me(III)-Trägerlösung und 10 µL Anion-Trägerlösung versetzt wurde. Die

Konzentration des Proteins, des Me(III)- und Anionen-Trägers wurde dabei so gewählt, daß die jeweils für den Versuch erforderliche Konzentration nach Verdünnen auf 320 µL erreicht wurde. Von dieser Lösung wurde dann die zur Einstellung von pH 7,0 benötigte Menge NaOH bzw. HCl (Konzentration der Base bzw. Säure zwischen 0,001 - 0,1 M) ermittelt. Analog wurde auch bei der Variation des Komplexliganden verfahren, wobei in diesem Fall der pH in Anwesenheit des jeweiligen Komplexliganden adaptiert wurde. Für die Messung der pH-Abhängigkeit wurde die Protonenkonzentration durch Zugabe unterschiedlicher Mengen an NaOH bzw. HCl zur Protein-Me-Anion-Mischung variiert. Für die Proteinanalysenlösung selbst wurden 150 µL isotonischer Proteinlösung mit der im Vorversuch ermittelten Menge an isotonischer NaOH bzw. HCl versetzt und auf 300 µL aufgefüllt. Nachdem diese Lösung gut durchmischt worden war, wurden 150 µL abpipettiert und mit 5 µL isotonischer Me-Trägerlösung und 5 µL isotonischer Anionen-Trägerlösung inkubiert. Es resultierte eine Inkubationslösung mit den geforderten Konzentrationen, einer Ionenstärke von 0,15 M (wobei der Beitrag des Proteins zur Ionenstärke vernachlässigt wurde) und einem pH von 7,0.

Die Inkubationszeit der Lösungen betrug in der Regel 22-23 h. Die langen Inkubationszeiten waren für quantitative Messungen erforderlich, da der proteingebundene Me- bzw. Anionen-Anteil bei einer Verlängerung der Inkubationszeit von 1 auf 22 h von etwa 65% um etwa 15% auf 80% (vgl. Abschnitt 4.4.1) zunimmt. Bei Experimenten, bei denen qualitative Aspekte im Vordergrund standen, konnten die Inkubationszeiten auf 1-2 h gekürzt werden. Danach wurden die Proteinlösungen mittels Gelfiltration bzw. Ultrafiltration hinsichtlich proteingebundenem Radiometall bzw. radioaktiv markiertem Anion untersucht. Dies geschah in der Weise, daß die gesamte Inkubationslösung zur Analyse auf die Gelsäule gegeben bzw. in die Ultrafiltrationseinheiten pipettiert wurde und die Lösungen, wie oben beschrieben, analysiert wurden.

Fehlerquellen

Die Verwendung der Proteinchargen direkt vom Hersteller, d.h. ohne diese einer vorherigen Reinigung durch Dialyse zu unterziehen, wie dies in den in der Literatur beschriebenen Bindungsstudien oftmals praktiziert wird, kann zu gravierenden Fehlinterpretationen der Meßergebnisse führen. Im folgenden sei dies an instruktiven Beispielen exemplarisch anhand von HSA und apo-Transferrin erläutert.

a.) HSA

Zum Vergleich sind in Abb.3.4 die Proteinbindungswerte für [^{88}Y]Y(III) in Abhängigkeit von der Y(III)-Träger-Konzentration für dialysiertes und unbehandeltes HSA wiedergegeben. Während der proteingebundene ^{88}Y -Anteil im Fall des dialysierten

Albumins über den gesamten Bereich bis $1 \cdot 10^{-4}$ M mehr oder weniger konstant bleibt, steigt er demgegenüber mit zunehmender Y(III)-Trägerdosis bei nicht dialysiertem HSA erst langsam an und erreicht erst bei $7 \cdot 10^{-5}$ M sein Maximum. Die Diskrepanz zwischen beiden Experimenten dürfte darauf beruhen, daß die nicht dialysierte HSA-Fraktion als Verunreinigung nicht unerhebliche Mengen an Citrat enthält. Da Citrat aufgrund seines Komplexbildungsvermögens eine Verdrängung von Yttrium aus seiner Proteinbindungsform (vgl. Abschnitt 4.4.6) bewirken kann, resultiert hieraus der geringere proteingebundene $[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)}$ -Anteil für nicht dialysiertes HSA bei niedriger Y(III)-Trägerkonzentration. Eine Erhöhung der Y(III)-Trägerkonzentration bewirkt schließlich gemäß dem Massenwirkungsgesetz einen Anstieg an nicht-citratgebundenem Y(III), welches dann für die Bindung an HSA zur Verfügung steht. Die Kontamination der Albuminfraktion mit Citrat dürfte auf den Herstellungsprozeß zurückzuführen sein, da die Isolierung des Albumins und der anderen Serumproteine zumeist aus citratisiertem Blutplasma erfolgt.

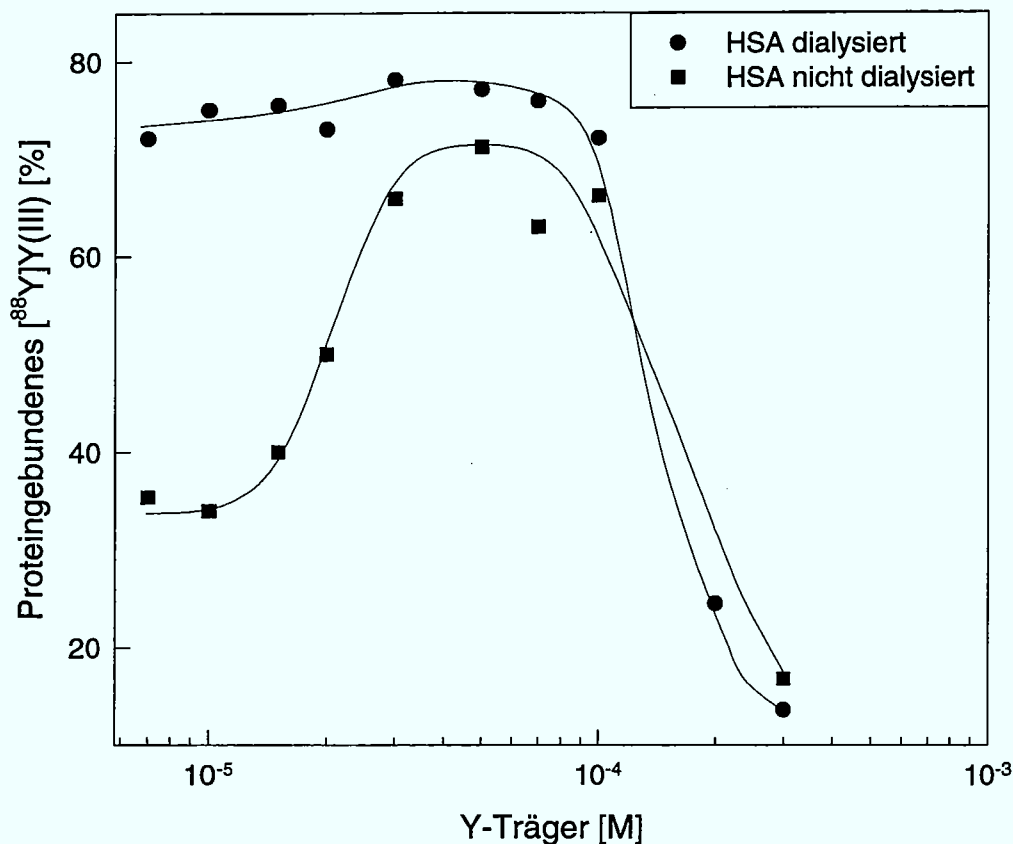


Abb.3.4: Vergleich der Bindung von $[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)}$ an dialysiertes bzw. nicht dialysiertes HSA in Abhängigkeit vom Y(III)-Trägergehalt; HSA 1 mg/mL, PO_4 -Träger $1 \cdot 10^{-4}$, $I = 0,15$ M, pH 7,0, Inkubationszeit 23 h.

Die Gegenwart von Citrat in den Proteinchargen macht sich auch durch einen direkten Vergleich der bei der Gelfiltration erhaltenen Aktivitätsverteilungen bemerkbar (vgl. Abb.3.5). Insbesondere in den Studien, in denen ^{67}Ga eingesetzt wurde, ist das Problem der Citrat-Verunreinigung der HSA-Charge besonders augenfällig. Dort erscheint im Gegensatz zum durch Dialyse gereinigten HSA im niedermolekularen Bereich ein Aktivitätspeak, der auf die Bildung von $^{67}\text{Ga}[\text{Ga(III)}]\text{-Citrat}$ zurückzuführen ist. Das Aktivitätsprofil des dialysierten HSA zeigt hingegen, daß mittels Dialyse Citrat fast restlos entfernbar ist, so daß $^{67}\text{Ga}[\text{Ga(III)}]$ fast vollständig proteingebunden vorliegt.

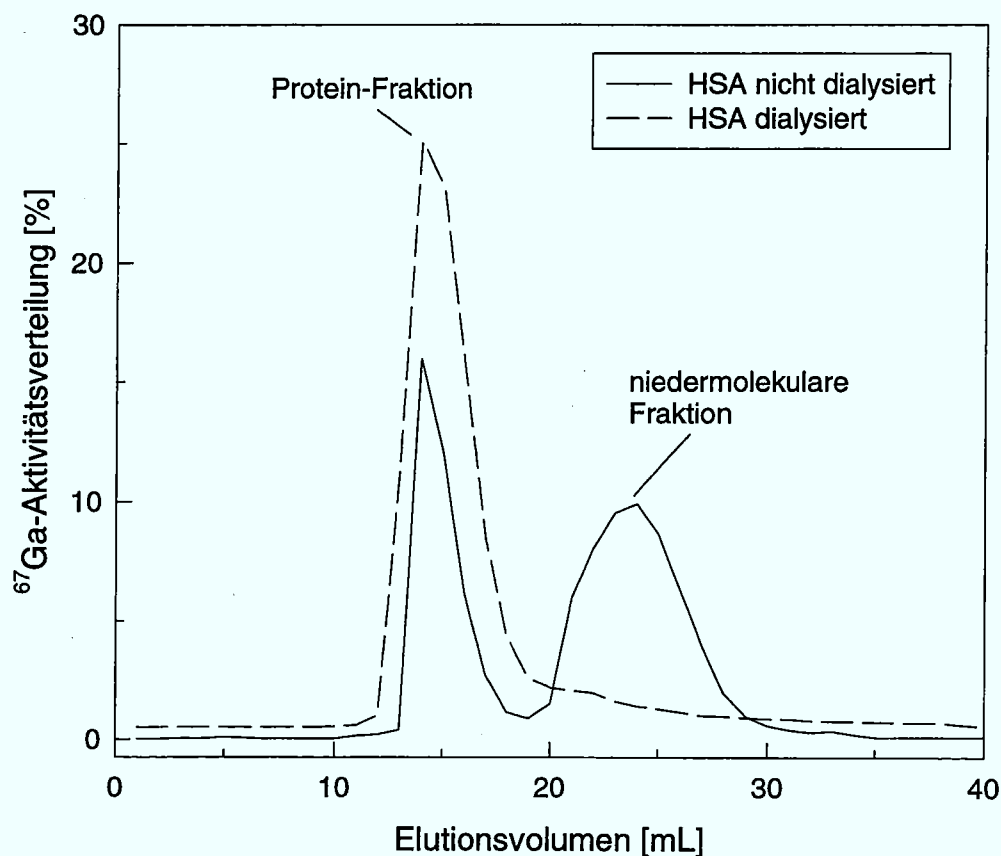


Abb.3.5: Vergleich der ^{67}Ga -Aktivitätsverteilung zwischen dialysiertem und nicht dialysiertem HSA; HSA 10 mg/mL, $^{67}\text{Ga}[\text{Ga(III)}]\text{-Träger}$ $1 \cdot 10^{-4}$ M, $I = 0,15$ M, pH 7,0, Inkubationszeit 1 h.

b.) apo-Transferrin

Bei apo-Transferrin ist eine Reinigung besonders wichtig. Setzt man apo-Transferrin direkt ohne vorherige Dialyse in die Bindungsstudien mit Yttrium ein, so wird gefunden, daß ca. 70% des Yttriums in der Lösung an apo-Transferrin gebunden wird. Dies hätte fälschlicherweise zu dem Schluß führen

können, daß Y(III) mit apo-Transferrin eine stabile binäre Verbindung ausbildet, wie sie auch für andere dreiwertige Kationen (Fe(III), In(III), Ga(III) usw.) gefunden wird. Mit dialysiertem Transferrin kann hingegen nur eine sehr geringe Tendenz zur Ausbildung einer Yttrium-Proteinbindung (ca. 2% proteingebunden) detektiert werden. Der proteingebundene [^{88}Y]Y(III)-Anteil läßt sich jedoch durch Phosphat-Zusatz unter Ausbildung einer ternären Verbindung zwischen Yttrium, Phosphat und apo-Transferrin auf ungefähr 70% steigern. Dies läßt darauf schließen, daß die nicht dialysierte apo-Transferrin-Charge geringe Mengen Phosphat enthält, die eine binäre Verbindungsbildung zwischen Yttrium und apo-Transferrin vortäuscht, obgleich in Wirklichkeit eine ternäre Verbindung vorliegt. Aus den Abhängigkeiten läßt sich die Phosphat-Kontamination der Protein-Charge mit ungefähr 0,09 Gewichtsprozent angeben. Die Phosphat-Verunreinigung ist wahrscheinlich auf die Verwendung von Phosphatpuffern beim Herstellungsprozeß zurückzuführen.

Herstellung von [^{32}P]PO₄-markiertem Humanserum

Zur Übertragung der in vitro-Modellversuche auf in vivo-Verhältnisse wurde ein Experiment mit [^{32}P]PO₄-markiertem Humanserum durchgeführt. Dazu wurde n.c.a. [^{32}P]Orthophosphat auf einem Teflonplättchen eingedampft und die zurückgebliebene [^{32}P]PO₄-Aktivität in frischem Vollblutserum aufgenommen.

Herstellung der radioaktiven Trägerlösungen

Dazu wurden die trägerfreien radioaktiven Me- bzw. Anionen-Stammlösungen auf einem Teflonplättchen bis zur Trockne eingedampft und die Aktivität in der jeweiligen Trägerlösung variabler Konzentration aufgenommen. Die Me-Trägerlösungen wurden durch Verdünnen einer Me(III)-Stammlösung erhalten, deren Ionenstärke mit NaCl auf 0,15 M eingestellt wurde. Die Stammlösung war zuvor durch Lösen einer entsprechenden Menge Metalloxids in konzentrierter HCl, anschließend dem Einengen bis fast zur Trockne und Aufnehmen des Rückstands in leicht salzsau-rem Wasser (pH 4-5) gewonnen worden. Die Anionen-Trägerlösungen wurden durch das Lösen entsprechender Na-Salze (NaCl, NaH₂PO₄, Na₃Citrat, NaHCO₃, NaF und Na₂SO₄) in H₂O hergestellt.

3.3.8 Tierexperimentelle Studien

Im Zuge der Untersuchungen wurden Tierexperimente mit NMRI-Mäusen durchgeführt. Die Versuche waren nach § 8 Abs.1 des Tierschutzgesetzes vom Regierungspräsidenten Köln unter der Nr. 23.203.2 KFA 9/93 genehmigt. Die Studien sollten einen Vergleich zwischen der ^{88}Y -Organaufnahme und dem Ausmaß der ^{88}Y -Serumproteinbindung von [^{88}Y]Chlorid, [^{88}Y]Y(III)-Citrat und der ternären Verbindung zwischen [^{88}Y]Y(III), [^{32}P]PO₄ und HSA ermöglichen. Dazu wurde

$[^{88}\text{Y}]\text{Chlorid}$, $[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)-Citrat}$ und ein Gemisch aus $[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)}$, $[^{32}\text{P}]\text{PO}_4$ und HSA präpariert.

$[^{88}\text{Y}]\text{Chlorid}$

Zur Herstellung einer trägerfreien $^{88}\text{YCl}_3$ -Lösung wurde eine trägerfreie salzsaure ^{88}Y -Stammlösung auf einem Teflonplättchen eingedampft und in isotonischer NaCl-Lösung aufgenommen. Die Injektionslösung hatte eine Ionenstärke von 0,15 M und einen pH-Wert von 5,5.

$[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)-Citrat}$

Für die $[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)-Citrat-Lösung}$ wurden 200 μL einer $\text{Na}_3\text{Citrat-Lösung}$ ($2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) mit 100 μL $[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)-Trägerlösung}$ und 400 μL NaCl-Lösung (0,2625 M) durchgemischt, so daß eine Finallösung mit folgenden Eigenschaften resultierte: $[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)-Träger}$ ($1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$), Citrat ($5,7 \cdot 10^{-4} \text{ M}$), $I = 0,15 \text{ M}$ und pH 6,5.

Ternäre Verbindung zwischen $[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)}$, $[^{32}\text{P}]\text{PO}_4$ und Humanserumalbumin

Für die ternäre Verbindung wurden 450 μL dialysierte isotonische HSA-Lösung (21,3 mg/mL) mit 45 μL isotonischer HCl (0,01 M) zur pH-Adaption und 405 μL isotonischer NaCl-Lösung gemischt. Zu dieser Proteinlösung wurden dann 30 μL $[^{32}\text{P}]\text{PO}_4^-$ ($3,2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) und 30 μL $[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)-Trägerlösung}$ ($3,2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) gegeben, so daß eine Finallösung mit folgenden Eigenschaften vorlag: HSA (10 mg/mL), $[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)-Träger}$ ($1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$), $[^{32}\text{P}]\text{PO}_4\text{-Träger}$ ($1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$), $I = 0,15 \text{ M}$ und pH 7,0. Diese Lösung wurde erst nach einer Inkubationszeit von 24 h in den Tierversuchen eingesetzt, nachdem zuvor eine Qualitätskontrolle mittels Gelfiltration durchgeführt worden war, wobei 82% des $[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)-Anteils}$ und 18% des $[^{32}\text{P}]\text{PO}_4\text{-Anteils}$ proteingebunden vorlagen.

Messung der Organkinetiken

Von beiden Lösungen wurden pro Versuchstier 50 μL über die Schwanzvene intravenös injiziert. Die Tiere wurden nach 5, 10, 20, 60 bzw. 240 Minuten (pro Meßzeit 2 Tiere) getötet, die Organe entnommen, gewogen und die ^{88}Y -Organverteilung bestimmt. Eine simultane Bestimmung der $[^{32}\text{P}]\text{PO}_4$ -Organverteilung der ternären Verbindung war nicht möglich, da die β^- -Emission von ^{32}P erst nach Auflösung der Organe quantitativ erfaßbar gewesen wäre. Da hier in erster Linie nur das Verhalten von ^{88}Y von Interesse war, wurde auf diese aufwendige und zeitraubende Prozedur verzichtet.

Zudem wurden die Blutproben im Fall von $[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)-Citrat}$ und der ternären Verbindung im Hinblick auf proteingebundenes ^{88}Y einer Serumanalyse mittels Gelfiltration unterzogen.

3.3.9 PET- und radiochemische Studien mit [^{86}Y]Citrat und [^{86}Y]EDTMP an Patienten

Zur Evaluierung des pharmakokinetischen Verhaltens von ^{90}Y -Komplexen wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizin des Forschungszentrums Jülich PET-Messungen mit dem β^+ -emittierenden ^{90}Y -Analogon ^{86}Y an Knochenmetastasen-Patienten durchgeführt. ^{86}Y wurde dabei wie unter Abschnitt 3.1.1 beschrieben am Kompaktzyklotron CV 28 des Forschungszentrums Jülich produziert und radiochemisch abgetrennt. Zur Synthese des [^{86}Y]Citrat-Komplexes wurde die abgetrennte ^{86}Y -Aktivität in 3 mL einer wäßrigen Na_3Cit -Lösung (7,5 mg/mL) und 2 mL NaCl -Lösung (5,1 mg/mL) aufgenommen, so daß eine Lösung mit folgenden Eigenschaften erhalten wurde: Citrat-Konzentration 0,017 M, Ionenstärke 0,17 M und pH 7,4. Zur Synthese des EDTMP-Komplexes wurde die ^{86}Y -Aktivität in 2 mL einer EDTMP-Lösung (21,8 - 36,6 mg/mL; pH 7,4) aufgenommen und zum Erreichen der Isotonie 1 mL NaCl -Lösung entsprechender Konzentration zugegeben. Die ^{86}Y -Komplexe wurden steril filtriert und einer radiochemischen Qualitätskontrolle mittels RC und RE unterworfen. Die radiochemische Reinheit der Komplexe wurde zu > 98% bestimmt. Die Untersuchung der Radiopharmaka auf Pyrogenfreiheit erfolgte mittels Standardmethoden.

4-5 mL der ^{86}Y -Komplexe wurden Patienten mit primärem Prostatakrebs, die multiple Knochenmetastasen entwickelt hatten, intravenös appliziert. Gleichzeitig wurden dynamische PET-Messungen (Scanditronix/GE-Scanner PC 4096-15WB) gestartet, bis 40-90 min p.i. fortgesetzt und später 4 Ganzkörper-Scans im Zeitraum von 3-76 h p.i. aufgenommen. Die Messungen konzentrierten sich auf Leber und einzelne Metastasen in der Wirbelsäule.

Zur Ermittlung der Blutclearance wurden venöse Blutproben nach 1, 3, 5, 10, 20, 40, 60, 120 und 240 min p.i. entnommen und mittels Gel- und Ultrafiltration hinsichtlich ihres proteingebundenen ^{86}Y -Anteils analysiert (vgl. Abschnitt 4.2). Zur Evaluierung der Gesamtkörperretention wurde der ausgeschiedene Urin periodisch gesammelt. Sowohl Blut- als auch Urin-Proben wurden γ -spektrometrisch ausgewertet. Die Aktivität des Blutpools ergab sich aus der zu jedem Zeitpunkt gemessenen Aktivität des Blut-Aliquots, wobei diese Aktivität auf das gesamte vom Gewicht und Alter abhängige abgeschätzte Blutvolumen [115] extrapoliert wurde. Die so berechnete Blutaktivität wurde dann auf die gesamte injizierte Aktivität (%ID) normalisiert. Die kumulative ^{86}Y -Gesamtexkretion wurde durch die Messungen der verschiedenen Urinaliquots, multipliziert mit dem insgesamt ausgeschiedenen Urinvolumen, erhalten. Die Gesamtkörperretention ergab sich aus der Differenz zwischen Gesamtkörperaktivität und kumulativer Urinexkretion.

3.3.10 In vitro-Knochenmodell-Studien

Um in vitro die Knochenaffinität therapierelevanter ^{88}Y -Komplexe studieren zu können, wurden Adsorptionsmessungen von $[\text{}^{88}\text{Y}]\text{Y(III)-Citrat}$, $[\text{}^{88}\text{Y}]\text{Y(III)-EDTMP}$ und $[\text{}^{88}\text{Y}]\text{Y(III)-EDTA}$ an Hydroxylapatit (CaP) in Abhängigkeit von der Komplexkonzentration durchgeführt.

Herstellung der Komplexlösungen

Für alle drei Komplexe wurde eine inaktive Stammlösung hergestellt, die 0,16 M Y(III)-Träger, 0,48 M des jeweiligen Liganden und 0,15 M NaCl enthielt. Um eine klare Lösung zu erhalten, mußte im Fall der EDTMP- und EDTA-Lösung der pH mit 1 M NaOH auf 7,0 eingestellt werden (im sauren Gebiet: Niederschlagsbildung durch die protonierte Säure; im alkalischen Gebiet: Niederschlagsbildung durch Y(OH)_3). Das Verhältnis von Yttrium zu Komplexligand betrug jeweils 1:3. Durch Verdünnen der Stammlösung konnte die Yttrium- bzw. Ligandkonzentration variiert werden. Die aktiven ^{88}Y -Komplexlösungen wurden durch Verdampfen einer trägerfreien ^{88}Y -Lösung auf einem Teflonplättchen und anschließender Aufnahme der Aktivität in der jeweiligen geträgerten Yttrium-Ligandlösung erhalten.

Adsorptionsmessung der markierten Komplexe

Um bei allen Adsorptionsmessungen konstante Versuchsbedingungen zu gewährleisten, mußten in einem Vorversuch die zur pH 7-Einstellung erforderlichen Mengen NaOH bzw. HCl bestimmt werden. Hierzu wurde in einem Plastikröhrchen $10,0 \pm 0,1$ mg CaP eingewogen, dazu 1420 μL isotonische Kochsalzlösung und 80 μL inaktive Y(III)-Komplexlösung gewünschter Konzentration gegeben. Danach wurde der pH mittels NaOH bzw. HCl adaptiert.

Im Aktivversuch wurden zu den 10 mg CaP 1500 μL isotonische NaCl-Lösung gegeben und 1 h stehen gelassen. Danach wurden die zur pH 7-Einstellung im Vorversuch ermittelten Mengen an NaOH bzw. HCl und 80 μL der aktiven $[\text{}^{88}\text{Y}]\text{Y(III)-Komplexlösung}$, von der die Adsorption zu bestimmen war, zugegeben und mit isotonischer NaCl-Lösung auf 2000 μL aufgefüllt. Die Plastikröhrchen wurden dann mit Gummistopfen verschlossen und auf einer Schüttelapparatur 30 min geschüttelt. Darauf wurde das Gemisch bei 3500 Upm 5 min zentrifugiert, so daß sich CaP am Boden absetzte. Von der überstehenden Lösung wurde ein Aliquot von 1000 μL abgenommen und ebenfalls in ein Plastikröhrchen überführt. Aus der Aktivitätsmessung des Aliquots der überstehenden Lösung und des CaP inklusive der zurückgebliebenen Lösung am γ -Counter konnte dann der an CaP adsorbierte $[\text{}^{88}\text{Y}]\text{Y(III)-Anteil}$ evaluiert werden.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Untersuchungen zur pH-Stabilität von ^{88}Y -Komplexen

Als eine Erklärung für die verstärkte Akkumulation von dreiwertigen Metallen im Tumor wird ein im Vergleich zum gesunden Körpergewebe niedrigeres pH-Milieu diskutiert, welches zu einer Dissoziation des applizierten Radiometall-Komplexes und damit zu einer Speicherung des Radiometalls im Tumor führt. Daher ist von Interesse, wie sich unterschiedlich stabile Yttrium-Komplexe gegenüber pH-Wert-Änderungen verhalten. Darüber hinaus lassen sich Aussagen über die Komplexstabilität der untersuchten Verbindungen machen. Zudem kann geprüft werden, inwieweit sich Radiopapierchromatographie (RC) und Radiopapierelektrophorese (RE) für die Qualitätskontrolle von Yttrium-Radiokomplexen eignen, da beide Methoden in der nuklearmedizinischen Praxis aufgrund ihrer leichten Durchführbarkeit häufig eingesetzte Verfahren sind.

Untersucht wurden in einer Meßserie verschieden stabile Yttrium-Komplexe, die in Tab.4.1 mit Angabe ihrer Komplexstabilitätskonstanten aufgeführt sind.

Tab.4.1: Stabilitätskonstanten verschiedener Yttrium-Komplexe [116,117]

Komplexligand	Komplexverbindung	Stabilitätskonstante $[\log\beta]$ Ionenstärke (I) = 0,1 M; 25°C
Cit ^(a)	$[\text{Y}(\text{Cit})]$	7,87 (I = 0,05 M)
	$[\text{Y}(\text{Cit})_2]^{3-}$	11,2 (I = 0,05 M)
NTA ^(b)	$[\text{Y}(\text{NTA})]$	11,42
	$[\text{Y}(\text{NTA})_2]^{3-}$	20,41
HEDTA ^(c)	$[\text{Y}(\text{HEDTA})]$	14,75
EDTA ^(d)	$[\text{Y}(\text{EDTA})]^-$	18,08
DTPA ^(e)	$[\text{Y}(\text{DTPA})]^{2-}$	22,05

^(a)Cit: Citrat, ^(b)NTA: Nilotriacetat, ^(c)HEDTA: (N-(2-Hydroxyethyl)-ethylendiamin-N,N,N-triacetat, ^(d)EDTA: Ethylendiamintetraacetat, ^(e)DTPA: Diethylentriaminpentaacetat.

4.1.1 Radiopapierchromatographie

Die Komplexe mit Citrat, NTA, EDTA und DTPA wurden wie in Abschnitt 3.3.5 unter Methoden beschrieben der papierchromatographischen Analyse unterzogen. Die pH-Werte der zu untersuchenden Komplexe wurden nicht adaptiert, da sich in Vorversuchen gezeigt hatte, daß das Laufverhalten der Komplexe nur vom pH-Wert des Laufmittels abhängig ist. Das bedeutet, daß das Laufmittel, wenn es auf dem Papier mit dem Komplex in Kontakt kommt, die chemische Umgebung des Komplexes derart verändert, so daß diese zu einer entsprechenden Modifizierung des Komplexes führt. Diese Modifizierung ist somit unabhängig von dem pH-Wert,

bei dem der Komplex synthetisiert wurde. In Abb.4.1 und Abb.4.2 sind die Radiochromatogramme von [^{88}Y]Citrat und [^{88}Y]NTA stellvertretend für die anderen Aminopolycarboxylat-Komplexe (EDTA und DTPA) in Abhängigkeit vom pH wiedergegeben.

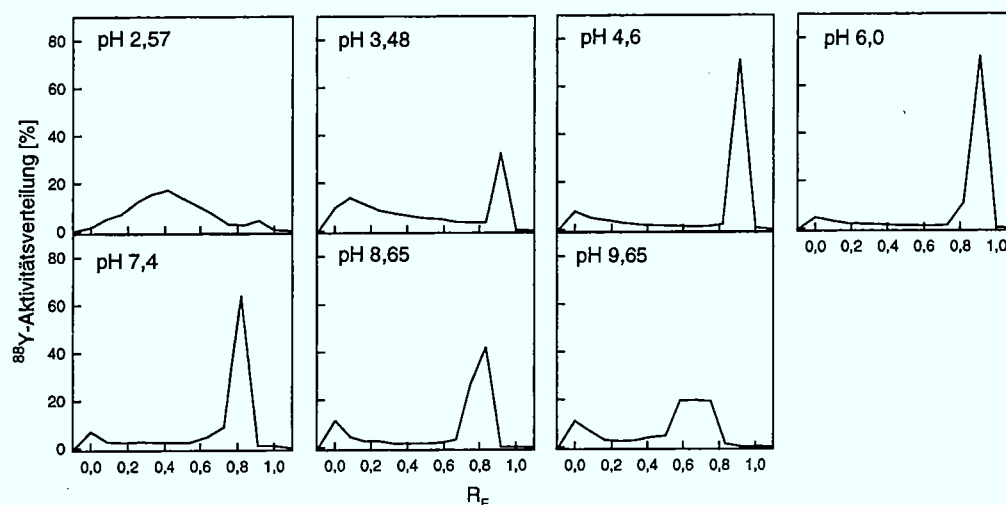


Abb.4.1: Radiochromatogramme von [^{88}Y]Citrat bei verschiedenen Laufmittel-pH-Werten; Laufmittel: 1:2:4 Pyridin,Ethanol,Wasser, Chromatographiepapier MN 261 (Macherey und Nagel).

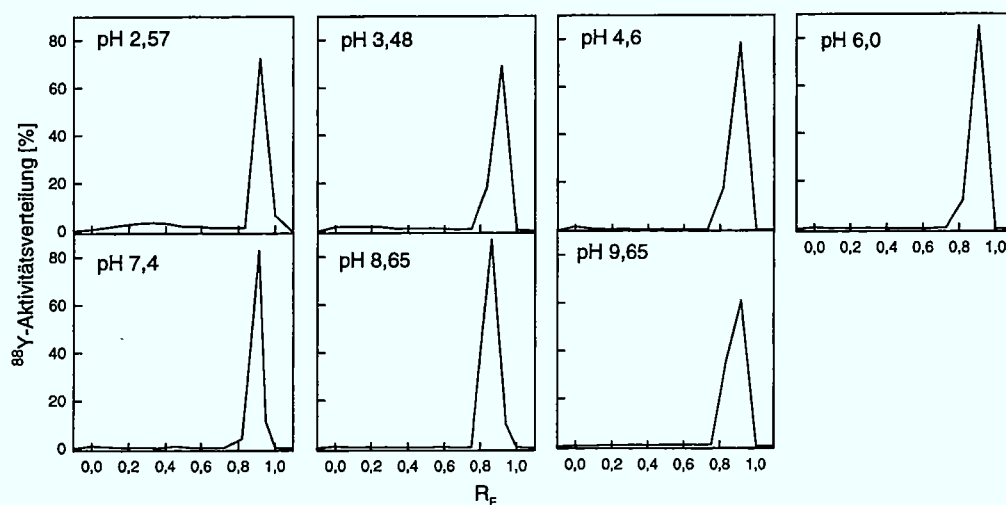


Abb.4.2: Radiochromatogramme von [^{88}Y]NTA bei verschiedenen Laufmittel-pH-Werten; Laufmittel: 1:2:4 Pyridin,Ethanol,Wasser, Chromatographiepapier MN 261 (Macherey und Nagel).

Bei einem Vergleich der Radiochromatogramme der beiden Komplexe fällt sofort auf, daß [^{88}Y]Citrat mit der Änderung des pH's eine starke Veränderung im Chromatographieverhalten zeigt. Die Auswirkungen der pH-Änderung auf das Laufverhalten des NTA-Komplexes sind dagegen sehr gering. Gleiches wird auch bei den beiden anderen Aminopolycarboxylaten EDTA und DTPA gefunden. Die höhere

pH-Sensibilität des $[^{88}\text{Y}]\text{Citrat}$ -Komplexes läßt sich damit begründen, daß der Dicitrato-Komplex, der aufgrund des Ligandenüberschusses präferentiell gebildet werden sollte, eine deutlich geringere Komplexstabilität ($\log\beta = 11,2$) besitzt als die anderen untersuchten Komplexe. Im einzelnen lassen sich die Radiochromatogramme des $[^{88}\text{Y}]\text{Citrat}$ -Komplexes wie folgt interpretieren. Bei pH 2,6 wird neben einem breiten Aktivitätspeak bei $R_F = 0,4$ ein kleiner Aktivitätspeak (ca. 5% der ^{88}Y -Gesamtaktivität) bei $R_F = 0,9$ gefunden, wobei es sich um $\text{Y}[(\text{Cit})_2]^{3-}$ handeln dürfte. Die nur in geringem Ausmaß gebildete bzw. während der Chromatographie stabil gebliebene Menge an $\text{Y}[(\text{Cit})_2]^{3-}$ sollte sich mit der im sauren Bereich geringeren Cit^{3-} -Konzentration erklären lassen. In diesem pH-Bereich dominieren die protonierten Ligand-Spezies HCit^{2-} , H_2Cit^- und H_3Cit , die Komplexe geringerer Stabilität ausbilden. Mit zunehmendem pH nimmt der Aktivitätspeak bei $R_F = 0,9$ sukzessive zu, was auf einen Anstieg des vollständig deprotonierten Cit^{3-} -Liganden zurückzuführen ist. Im neutralen pH-Bereich werden dann bei einem R_F -Wert von 0,9 ca. 80% der ^{88}Y -Aktivität gefunden. Die Restaktivität verteilt sich bis auf den kleinen Peak am Startfleck nahezu gleichmäßig über das gesamte Chromatogramm (ca. 2-5% ^{88}Y -Aktivität auf jedem Streifen). Dies bedeutet, daß es auch in diesem Bereich zu einer ständigen Dissoziation des Komplexes durch Hydrolyse, Wechselwirkung mit dem Chromatographiepapier oder Verdrängung von ^{88}Y aus seiner Komplexverbindung durch den Verdünnungseffekt im Laufmittelmilieu kommt. Wird dem Laufmittel-Gemisch Citrat zugesetzt, so daß die Citrat-Konzentration 0,029 M beträgt, so läßt sich eine komplette Mobilisierung des Citrat-Komplexes erreichen. Die gesamte ^{88}Y -Aktivität erscheint ohne Schwanzbildung bei $R_F = 0,9$. Weiterer pH-Anstieg führt schließlich zu einer Verbreiterung des $[\text{Y}(\text{Cit})_2]^{3-}$ -Peaks und einer Verringerung des R_F -Wertes, was sich mit einer zunehmenden Verdrängung des ^{88}Y aus seiner Komplexverbindung durch Hydrolyse bzw. der Bildung von Hydroxo-Citrato-Mischkomplexen erklären läßt. Gleichfalls wird durch die Zunahme der Hydrolysereaktionen im alkalischen Gebiet ein Anstieg der ^{88}Y -Aktivität am Startfleck detektiert.

Bei den im Vergleich zu $[^{88}\text{Y}]\text{DTPA}$ schwächeren ^{88}Y -Aminopolycarboxylaten EDTA und NTA kann nur bei den extremsten pH-Werten von 2,6 und 9,6 eine geringe Veränderung der Radiochromatogramme gegenüber den Chromatogrammen im neutralen pH-Bereich detektiert werden. So beträgt bei pH 2,6 der prozentuale ^{88}Y -Aktivitätsanteil im Hauptpeak bei $R_F = 0,9$ nur noch 80%. Der Rest der Aktivität verteilt sich mit der Ausbildung eines leichten Maximums bei $R_F = 0,4$ auf niedrigere R_F -Werte. Dies ist ähnlich wie bei $[^{88}\text{Y}]\text{Citrat}$ darauf zurückzuführen, daß die Lösung mit abnehmendem pH an der vollständig deprotonierten Liganden-Spezies

mit der höheren Zahl zur Bindung befähigter Carboxylat-Gruppen und damit höherer Komplexierungskraft verarmt. Dies hat zur Folge, daß Komplexe mit niedrigerer Komplexstabilität gebildet werden, da potentielle Ligatortome der Carboxylat-Gruppen und Amino-Gruppen des mehrzähligen Liganden durch Protonierung blockiert werden. Bei pH 9,65 ist sowohl für $[^{88}\text{Y}]\text{NTA}$ als auch für $[^{88}\text{Y}]\text{EDTA}$ eine leichte Peakverbreiterung und Verschiebung zu niedrigeren R_F -Werten auszumachen, was auf partielle Hydrolyse der Komplexe mit zunehmender Dauer der Chromatographie zurückzuführen ist. Der nochmals um einige Größenordnungen stabilere $[^{88}\text{Y}]\text{DTPA}$ Komplex zeigt hingegen weder im sauren noch im alkalischen Gebiet Zersetzungserscheinungen bzw. das Vorliegen anderer Komplexspezies.

Diese Untersuchungen zeigen, daß die Radiopapierchromatographie für stabile Komplexe ein geeignetes Verfahren zur Qualitätskontrolle darstellt, hingegen für labile Komplexe wie $[^{88}\text{Y}]\text{Citrat}$ die Interpretation der Chromatogramme hinsichtlich qualitativer und quantitativer Aspekte schwierig ist.

4.1.2 Radiopapierelektrophorese

Die Papierelektrophorese greift relativ drastisch in die sensitiven Komplexgleichgewichte ein. In erster Linie sind hierbei die Auswirkungen des angelegten elektrischen Feldes und die Verdünnungseffekte des Komplexmilieus durch die Reaktion mit dem Grundelektrolyten auf dem Chromatographiepapier zu nennen. Die Elektropherogramme der verschiedenen Yttrium-Komplexe in Abhängigkeit vom Elektrolyt-pH sind in Abb.4.3 zusammengestellt.

Es fällt auf, daß die Komplexe mit geringer bis mittlerer Stabilität ein komplizierteres ^{88}Y -Aktivitätsverteilungsmuster ergeben, wohingegen die stabilen Komplexe über den ganzen pH-Bereich eine nahezu identische Aktivitätsverteilung aufweisen. Eine genaue Interpretation der jeweiligen Elektropherogramme ist jedoch schwierig, da mit der Papierelektrophorese keine quantitative Angabe über die Struktur und Stöchiometrie des Yttrium-Komplexes hinsichtlich Anzahl und Protonierungsgrad der von Y(III) gebundenen Liganden gemacht werden kann. Dies liegt nicht zuletzt an der Fähigkeit von Yttrium, Komplexe mit Koordinationszahlen von 6 bis maximal 9 auszubilden. So steigt die Stabilität von Yttrium-Komplexen, wenn die Zähnigkeit der Liganden größer als 6 ist (z.B. Yttrium-DTPA (8 Koordinationsstellen) $\log K = 22,05$ gegenüber Yttrium-EDTA (6 Koordinationsstellen) $\log K = 18,08$). Die Bestimmung der Koordinationszahl ist jedoch außerordentlich schwierig, so daß die Struktur der Koordinationssphäre vieler Yttrium-Komplexe unbekannt ist. Im alkalischen Bereich wird die Situation noch unübersichtlicher, da hier die Bildung von Mischkomplexen zwischen Chelat-Ligand und Hydroxid-Ionen mit

Yttrium nicht mehr ausgeschlossen werden kann. Schließlich kann es bei hoher Hydroxid-Ionenkonzentration zu einer kompletten Verdrängung des Chelat-Liganden aus dem Komplex und letztlich zur Bildung von schwerlöslichem $Y(OH)_3$ kommen.

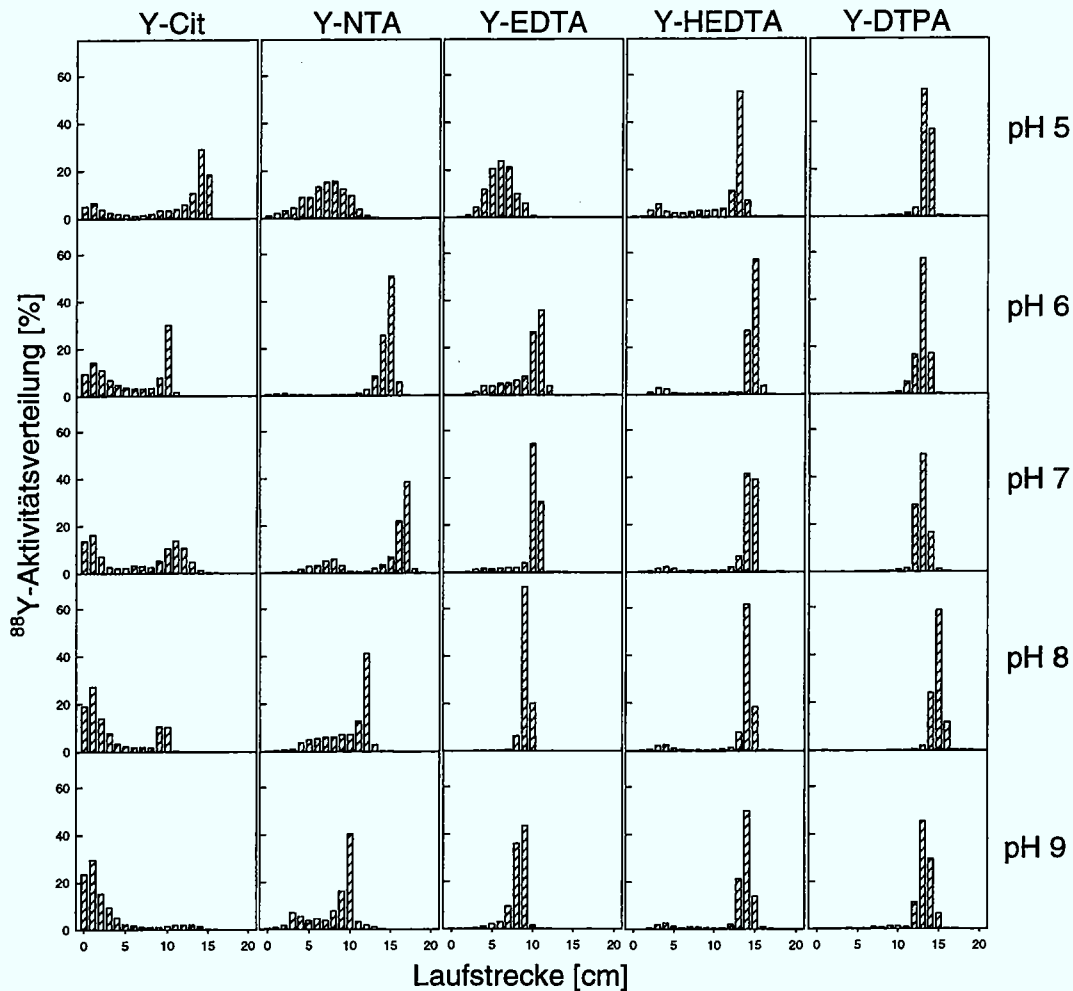


Abb.4.3: Radioelektropherogramme von $[^{88}Y]Citrat$, $[^{88}Y]NTA$, $[^{88}Y]EDTA$, $[^{88}Y]HEDTA$ und $[^{88}Y]DTPA$ bei pH 5, 6, 7, 8 und 9; Grundlektrolyt TRIS-acetat 0,075 M, Spannung 400 V, Elektrophoresedauer 2 h, Chromatographiepapier MN 260 (Macherey und Nagel).

^{88}Y -Citrat zeigt wie bei der RC bedingt durch seine geringe Stabilität die höchste Hydrolysetendenz und Freisetzung von ^{88}Y aus seiner Komplexverbindung während der Elektrophorese. Dies hat zur Folge, daß die ^{88}Y -Aktivität neben der Akkumulation in den Peaks mehr oder weniger über das gesamte Elektropherogramm verschmiert ist. Interessant ist, daß der Dicitrato-Komplex bei pH 5 die größte Stabilität aufweist (Laufstrecke 14 cm). Daß es sich hierbei um $[Y(Cit)_2]^{3-}$ handelt, kann daraus gefolgert werden, daß man durch Hinzufügen von Citrat (0,029 M) zum Grundlektrolyten bei pH 7 ebenfalls bei einer Laufstrecke von

14 cm einen scharfen ^{88}Y -Aktivitätspeak ohne Zersetzungs- und Hydrolyseprodukte erhält, der sicher dem Dicitrato-Komplex zuzuordnen ist. Die um einige Größenordnungen stabileren Aminopolycarboxylat-Komplexe von ^{88}Y mit NTA und EDTA legen demgegenüber bei pH 5 geringere Laufstrecken zurück. Diese relativ hohe Stabilität der α -Hydroxypolycarbonsäure mit Yttrium mag seine Ursache darin haben, daß die Carboxylat-Gruppen von Citrat im Vergleich zu den Carboxylat-Gruppen der Aminopolycarboxylate höhere pK-Werte besitzen und daher stabilere Komplexe ausbilden können. Mit steigendem pH kommt es hingegen zu einer zunehmenden Hydrolyse von Y(III), so daß bei pH 9 die gesamte ^{88}Y -Aktivität als $\text{Y}(\text{OH})_3$ am Startfleck verbleibt.

^{88}Y NTA, welches bei der RC über nahezu den gesamten betrachteten pH-Bereich stabil ist, zeigt bei der RE ein komplexeres Chromatographieverhalten. Bei pH 5 wird ein breiter Aktivitätspeak im niedrigen Laufstreckenbereich gefunden. Die geringe elektrophoretische Mobilität bei pH 5 im Vergleich zu ^{88}Y Citrat läßt sich damit begründen, daß das N-Donatoratom des NTA-Liganden ($\text{pK} = 9,65$) infolge Protonierung blockiert ist und NTA daher nur drei seiner vier Ligandatome zur Komplexbildung nutzen kann. Die schwachen Basizitäten der Carboxylat-Gruppen von NTA im Vergleich zu Citrat, die sich aus den pK-Werten ableiten lassen (NTA: $\text{pK}_1 = 0,8$; $\text{pK}_2 = 1,8$; $\text{pK}_3 = 2,48$ gegenüber Cit: $\text{pK}_1 = 2,87$; $\text{pK}_2 = 4,35$; $\text{pK}_3 = 5,69$), bedingen die geringere Komplexbildungskraft von NTA in diesem pH-Bereich. Bei pH 6 und 7 wird erwartungsgemäß ein scharfer Peak beobachtet, wobei die elektrophoretische Mobilität des gebildeten Komplexes recht hoch ist (Entfernung vom Startfleck 16-17 cm). Jedoch lassen sich schon bei pH 7 Anzeichen für die Bildung einer weniger negativ geladenen Komplexspezies bzw. die zunehmende Zersetzung des Komplexes während der Elektrophorese erkennen. Nimmt man die präferentielle Bildung eines $[\text{Y}(\text{NTA})_2]^{3-}$ -Komplexes an, der sich durch eine hohe Komplexstabilität von immerhin $\log \beta = 20,43$ auszeichnet, so erscheint das Auftauchen einer anderen Komplexspezies bei pH 7 bemerkenswert, wobei es sich u.U. um Hydroxo-NTA-Mischkomplexe handeln könnte.

^{88}Y HEDTA zeigt ein relativ einheitliches Chromatographieverhalten ohne gravierende Unterschiede zwischen den Pherogrammen. Allerdings geht dem Hauptaktivitätspeak bei 14 cm ein mehr oder weniger geringes Aktivitätstailing bei 3-4 cm voraus. Die daraus ableitbare hohe Stabilität mag darauf zurückzuführen sein, daß das Yttrium-Ion von zwei HEDTA-Liganden mit hoher Stabilität chelatisiert wird, wohingegen die Anlagerung eines weiteren sechszähligen Liganden bei EDTA aus sterischen Gründen nicht möglich ist. Die Komplexbildung des dreiwertig positiv geladenen Yttrium-Ions mit mehr als einem maximal dreifach negativ gela-

denen Liganden folgt allein schon aus der Tatsache, daß der Komplex im elektrischen Feld wandert und folglich eine negative Ladung aufweisen muß. Darüber hinaus läßt sich die geringe Zersetzungstendenz bei pH 5 möglicherweise auch auf die im Vergleich zu EDTA höheren pK-Werte des HEDTA-Liganden für die Carboxylat-Gruppen zurückführen und der daraus folgenden höheren Affinität zu der harten Säure Y(III).

Trotz der hohen Stabilität des 1:1-Chelats von Yttrium mit EDTA ($\log K = 18,08$) wird für den $[^{88}\text{Y}]\text{EDTA}$ -Komplex bei pH 5,0 eine geringe elektrophoretische Mobilität gefunden. Das Pherogramm zeigt eine breite Aktivitätsverteilung über 8 Fraktionen bei einer Entfernung vom Startfleck von 6 cm. Dieser Befund dürfte, wie oben für NTA erläutert, darauf zurückführbar sein, daß die geringe Komplexbildungskraft der Carboxylat-Gruppen, die sich aus den pK-Werten ableiten läßt, durch die N-Donoratome nicht kompensiert werden kann, da diese infolge Protonierung bei niedrigen pH-Werten blockiert sind. Die hohe Stabilität der Aminopolycarboxylat-Komplexe ist aber gerade auf die Beteiligung von N-Donoratomen an der Chelatisierung zurückzuführen. Bei höheren pH-Werten wird die Destruktion der $[^{88}\text{Y}]\text{EDTA}$ -Verbindung daher vernachlässigbar. Die elektrophoretische Mobilität des $[^{88}\text{Y}]\text{EDTA}$ -Komplexes ist bemerkenswerterweise auch im pH-Bereich von 6-8 deutlich niedriger als für alle anderen untersuchten Komplexe (Laufstrecke von nur ca. 9 cm; andere Komplexe 13-15 cm). Dies läßt vermuten, daß sich der einfach geladene $[\text{Y}(\text{EDTA})]^-$ Komplex bildet, wohingegen alle anderen ^{88}Y -Komplexe höhere negative Ladungen und demzufolge höhere elektrophoretische Mobilitäten aufweisen.

Der $[^{88}\text{Y}]\text{DTPA}$ -Komplex zeigt aufgrund seiner hohen Komplexstabilität und der hohen Zahl zur Koordination befähigter Atome (insgesamt acht) über den ganzen pH-Bereich eine einheitliche Aktivitätsverteilung. Die im Vergleich zu $[^{88}\text{Y}]\text{EDTA}$ und $[^{88}\text{Y}]\text{NTA}$ um mehrere Größenordnungen höhere Komplexstabilität infolge des Chelateffekts macht sich vor allem im Radiochromatogramm bei pH 5,0 bemerkbar, da hier im Gegensatz zu $[^{88}\text{Y}]\text{EDTA}$ und $[^{88}\text{Y}]\text{NTA}$ die gesamte ^{88}Y -Aktivität im Hauptpeak bei einer Laufstrecke von 14,5 cm erscheint und keine Dissoziation des Komplexes beobachtet wird. Dies mag auf die im Vergleich zu NTA und EDTA höhere Basizität der Carboxylat-Gruppen zurückzuführen sein; die Y(III)-Carboxylat-Wechselwirkung bewirkt so eine effektivere Dehydratisierung des Yttrium-Ions, so daß die Amino-Gruppen des Liganden mit dem Yttrium-Ion in Wechselwirkung treten können, ohne zusätzlich Hydratationswasser verdrängen zu müssen.

Die Diskussion der einzelnen Radiochromatogramme zeigt, daß RE und RC nur bedingt für die Qualitätskontrolle von Yttrium-Radiopharmaka geeignet sind. Insbesondere im Fall von [^{88}Y]Citrat und auch in begrenzterem Umfang für [^{88}Y]NTA reicht die Stabilität der gebildeten Komplexe nicht aus, um ihre Zersetzung durch die Wechselwirkung mit dem Laufmittel bzw. der Elektrolytlösung zu verhindern. Vor allem bei der Papierelektrophorese ist der Eingriff in die Komplexgleichgewichte gravierend. Hier zeigt allein der [^{88}Y]DTPA- und mit gewissen Einschränkungen der [^{88}Y]HEDTA-Komplex unabhängig vom pH ein einheitliches Aktivitätsverteilungsmuster. Teilweise unerwartet und schwierig interpretierbar ist hingegen die elektrophoretische Mobilität der anderen Yttrium-Komplexe. Aus den erhaltenen Abhängigkeiten läßt sich folgern, daß die Koordinationssphäre (Art, Anzahl und Zähigkeit der gebundenen Liganden) des Yttrium-Komplexes ein wesentlich wichtigeres Kriterium zur Beurteilung der Komplexstabilität darstellt als die aus den Komplexbildungskonstanten der Chelate ableitbaren Stabilitäten.

Überträgt man die mit beiden Methoden erzielten Zusammenhänge auf das in vivo-Verhalten der Komplexe, so läßt sich für die labileren Komplexe [^{88}Y]Citrat und in geringerem Ausmaß für [^{88}Y]NTA im Blutpool eine teilweise Zersetzung aufgrund der sehr verdünnten Ligandenumgebung erwarten. Dadurch kann es entweder zu einer Umkomplexierung des Metall-Ions an endogene Liganden bzw. Proteine oder Adsorption an bzw. Einlagerung in Körpergewebe mit hoher Metall-Ionenaffinität kommen. Eine geringe Abgabe von Yttrium an das Körpergewebe infolge von Trans-Chelierung ist hingegen bei den Liganden mit hoher Komplexstabilität zu erwarten, da das Komplexierungsvermögen körpereigener Komplexliganden bzw. die Gewebeaffinitäten nicht ausreichen, um eine Dissoziation dieser Komplexe herbeizuführen, die dann relativ schnell über die Nieren ausgeschieden werden. In bezug auf die Tumoraaffinität der Yttrium-Komplexe läßt sich feststellen, daß der Einfluß des pH's auf die bevorzugte Einlagerung von dreiwertigen Radiometallen in Tumorgewebe - wenn diese These überhaupt berechtigt sein sollte - nur sehr gering ist, da der teilweise erniedrigte Gewebe-pH der Tumorzellen von im Extremfall pH 5,6 nicht ausreicht, um eine signifikante Destruktion der Komplexe mit anschließender wie auch immer gearteter Speicherung des Metall-Ions in den Zellen zu bewirken.

4.2 Analyse des Blutserums von Knochenmetastasen-Patienten

Im Rahmen einer Kooperation mit dem Institut für Medizin des Forschungszentrums Jülich GmbH wurden zur Quantifizierung von ^{90}Y -Radiopharmaka PET-Studien mit Hilfe des PET-Analogons ^{86}Y an Knochenmetastasen-Patienten durchgeführt. Die Analyse von Blutproben dieser Patienten sollte Aufschluß darüber geben, ob und in welchem Ausmaß Radioyttrium an Proteinkomponenten des Bluts gebunden wird. Nach Abtrennung des Serums, welches fast die komplette ^{86}Y -Aktivität des Bluts enthielt, wurden Serumproben der Patienten nach i.v. Applikation von ^{86}Y Citrat und ^{86}Y EDTMP mittels Gelfiltration untersucht. Die Gelchromatogramme für ^{86}Y Citrat und ^{86}Y EDTMP sind in Abb.4.4 dargestellt.

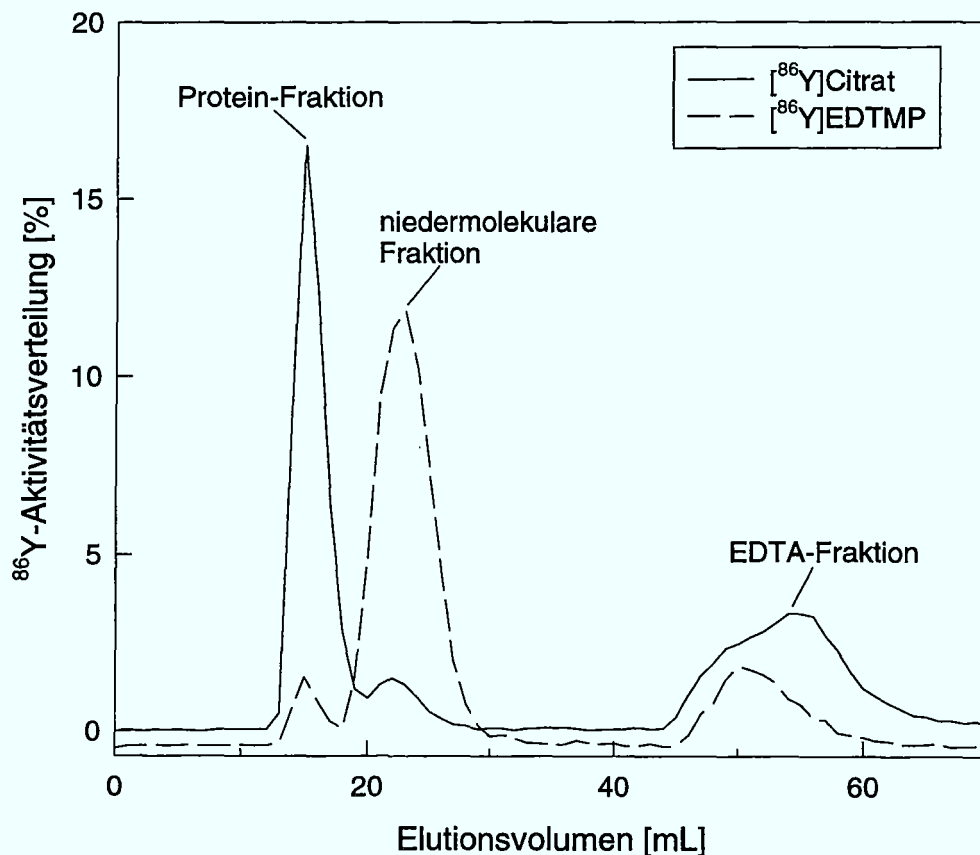


Abb.4.4: Vergleich der Gelchromatogramme von Serumproben von Patienten mit multiplen Knochenmetastasen nach i.v. Applikation von ^{86}Y Citrat bzw. ^{86}Y EDTMP; Sephadex G-25 Säule, Eluens TRIS-acetat pH 7, nach der 30. Fraktion 5%-ige EDTA-Lösung.

55% des Radioyttriums liegt im Fall von ^{86}Y Citrat an hochmolekulare Serumproteine gebunden vor; der proteingebundene Radioyttrium-Anteil bei ^{86}Y EDTMP beträgt nur ca. 7%. Umgekehrte Verhältnisse finden sich in der niedermolekularen Fraktion, die den prozentualen Radioyttrium-Anteil repräsentiert, der in Form sei-

nes intakten Komplexes oder aber an körpereigene Liganden wie Aminosäuren oder kleine Peptide gebunden vorliegt. Der ^{86}Y -Anteil, der bei ^{86}Y Citrat in der niedermolekularen Fraktion erscheint, beträgt nur 6%, bei ^{86}Y EDTMP demgegenüber über 70%. Zudem ist die mit TRIS-acetat nicht eluierbare ^{86}Y -Aktivität für ^{86}Y EDTMP fast um die Hälfte niedriger (ca. 23 statt 38%). Angesichts der stark differierenden Komplexstabilitäten der beiden Verbindungen ($\log\beta = 11,2$ $[\text{Y}(\text{Cit})_2]^{3-}$ [117]; $\log K \approx 20$ $[\text{Y}(\text{EDTMP})]$ [116]) erscheint das unterschiedliche in vivo-Verhalten plausibel: während die Stabilität des Citratkomplexes nicht ausreicht, um eine Trans-Chelierung an Serumproteine zu verhindern, bleibt der ^{86}Y EDTMP-Komplex weitgehend stabil. Die Dissoziation des EDTMP-Komplexes mit nachfolgender Bindung an Serumproteine spielt daher nur eine untergeordnete Rolle.

4.3 Einfluß endogener Anionen auf die Bindung von Yttrium an HSA

Im Blut liegen viele Anionen vor, die eine hohe Komplexbildungstendenz zu Y(III) aufweisen (Citrat und Fluorid) bzw. mit diesem schwerlösliche Verbindungen bilden (Bicarbonat, Sulfat und Phosphat). Um zu überprüfen, ob und wie diese Anionen das Bindungsverhalten von Y(III) an das Modellserumprotein HSA modifizieren, wurde der Einfluß des Anions auf die Bindung von Y(III) an HSA untersucht. Die im folgenden diskutierten Ergebnisse wurden mittels Gelfiltration erhalten. Zur Kontrolle wurden darüber hinaus Untersuchungen mittels Ultrafiltration durchgeführt, deren Ergebnisse die Trends der Gelfiltrationsstudien bestätigten. Allerdings lagen deren Absolutproteinbindungswerte etwas höher (vgl. auch Abschnitt 4.4.2). Die Ergebnisse der Gelfiltration sind in Tab. 4.2 zusammengefaßt.

Tab.4.2: Einfluß endogener Anionen auf die ^{86}Y Y(III)-Bindung an HSA; HSA 10 mg/mL, Y(III)-Träger $1 \cdot 10^{-4}$ M, Anionen-Träger $1 \cdot 10^{-4}$ M, $I = 0,15$ M, pH 7,0, Inkubationszeit 23 h.

Anion	Konzentration im Plasma [mM] [118]	^{86}Y -Bindung an HSA [%]	Anion-Bindung an HSA [%]
Chlorid	100	2	-
Bicarbonat	27	3	-
Sulfat	1	2,5	1,5 ^(a)
Fluorid	0,02	1	1 ^(b)
Citrat	0,1	2	-
Phosphat	2	82	81 ^(c)

^(a) Sulfat mit ^{35}S SO₄²⁻, ^(b) Fluorid mit ^{18}F F⁻, und ^(c) Phosphat mit ^{32}P PO₄³⁻ markiert.

Y(III) zeigt in isotonischer Kochsalzlösung nur eine geringe Neigung, mit HSA eine Verbindung einzugehen. Auch für Bicarbonat, Sulfat, Fluorid und Citrat kann keine signifikante Bindung an HSA detektiert werden. Die Anionen Sulfat und Fluorid, die radioaktiv markiert waren und deren Bindung an HSA dadurch auch überprüfbar war, weisen ebenfalls nur eine geringe Affinität zu HSA auf.

Im Fall von Phosphat ist der Einfluß auf die Yttriumbindung jedoch signifikant. Die Anwesenheit von Phosphat in der Lösung steigert den HSA-gebundenen [^{88}Y]Y(III)-Anteil von ca. 2% auf ungefähr 80%. Andererseits ist auch eine hohe Bindung von Phosphat an HSA nur in Anwesenheit von Y(III) festzustellen.

4.4 Untersuchung des Yttrium-Phosphat-HSA-Systems

In Anlehnung an die Bindung von Eisen mit Bicarbonat an Transferrin wird eine synergistische Bindung von Y(III) mit Phosphat an HSA postuliert. Für detailliertere Aussagen über die Art der simultanen Bindung von Y(III) und Phosphat an HSA mußte das ternäre Y(III)- PO_4 -HSA-System genauer untersucht werden. Dazu wurden verschiedene experimentelle Parameter systematisch variiert, und die Reaktion des ternären Systems auf die jeweiligen Änderungen untersucht. Dies sollte sowohl qualitative als auch quantitative Informationen über den Bindungsmechanismus und die Stabilität der ternären Verbindung zwischen Yttrium, Phosphat und HSA liefern.

4.4.1 Bindung von [^{88}Y]Y(III) und [^{32}P]PO₄ an HSA in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Um zu überprüfen, ob die Bildung der ternären Verbindung zwischen Yttrium, Phosphat und HSA einer Kinetik unterliegt, wurde der Bindungsanteil von [^{88}Y]Y(III) und [^{32}P]PO₄ an HSA in Abhängigkeit von der Inkubationszeit gemessen. Die Kenntnis der Bildungsrate der ternären Verbindung ist für das Bioverhalten von Radioyttrium von essentieller Bedeutung, da die Einlagerung des Radioyttriums in die verschiedenen Gewebekompartimente in entscheidender Weise davon beeinflusst wird, wie schnell die ternäre Verbindung im Blut gebildet wird. Die Bindung von [^{88}Y]Y(III) an HSA in Abhängigkeit von der Inkubationszeit ist in Abb.4.5 dargestellt. Schon nach kurzen Inkubationszeiten von 5 min sind über 65% des Radioyttriums (gleiches gilt für Phosphat) an HSA gebunden. Eine Verlängerung der Inkubationszeiten führt zunächst zu einem exponentiellen Anstieg des proteingebundenen ^{88}Y -Anteils, wobei nach einer Inkubationszeit von ca. 7 h ein Plateau bei ca. 80% proteingebundenen ^{88}Y erreicht wird. Als Konsequenz für das in vivo-Verhalten von Yttrium im Blut ergibt sich aus diesen Messungen, daß Yttrium im

Blut, unter der Voraussetzung, daß es nicht mit einem sehr stabilen Komplexliganden appliziert wird, sehr schnell innerhalb von Minuten eine ternäre Verbindung bildet, die für das weitere Schicksal des Yttriums im Hinblick auf seine Verteilung im Körper von wesentlicher Bedeutung ist.

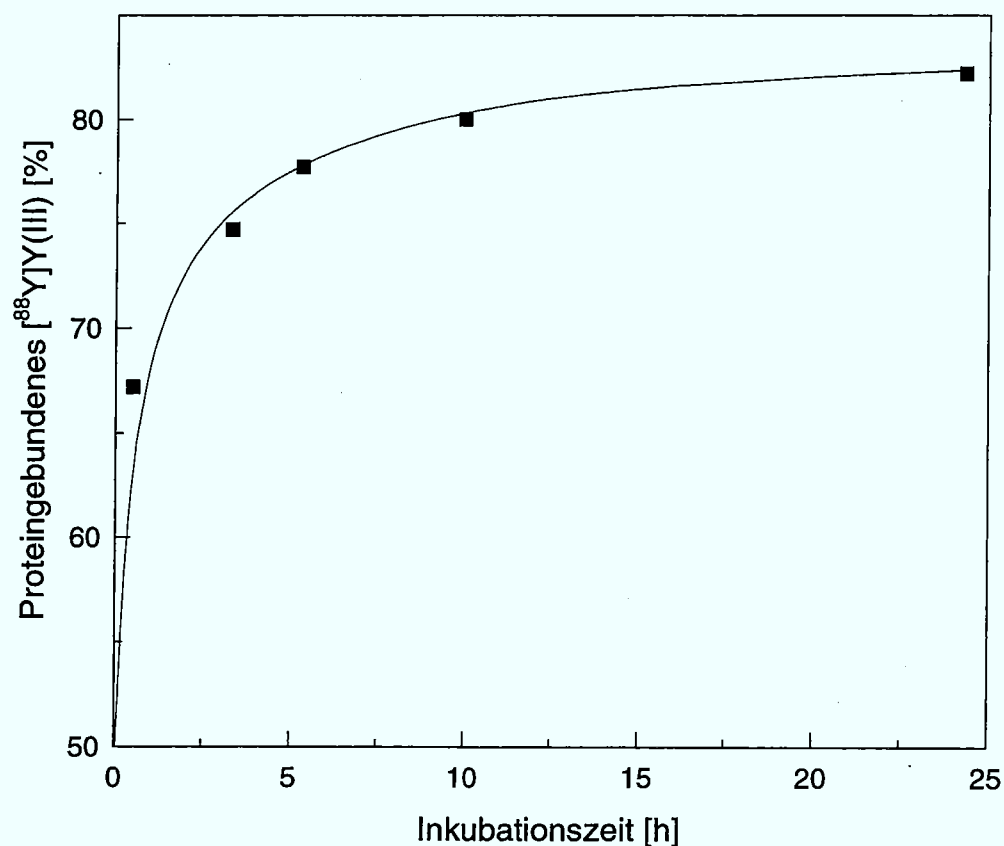


Abb.4.5: Bindung von $^{88}\text{Y(III)}$ an HSA in Abhängigkeit von der Inkubationszeit; HSA 10 mg/mL, Y(III)-Träger $1 \cdot 10^{-4}$ M, PO_4 -Träger $1 \cdot 10^{-4}$ M, $I = 0,15$ M, pH 7,0.

4.4.2 Bindung von $[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)}$ und $[^{32}\text{P}]\text{PO}_4$ an HSA in Abhängigkeit vom Y(III)-Trägergehalt

In dieser Studie wurde der Einfluß des Trägergehalts durch sukzessive Erhöhung der Y(III)-Träger-Konzentration auf das Bindungsverhalten von $[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)}$ und $[^{32}\text{P}]\text{PO}_4$ an HSA untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb.4.6 zusammengefaßt.

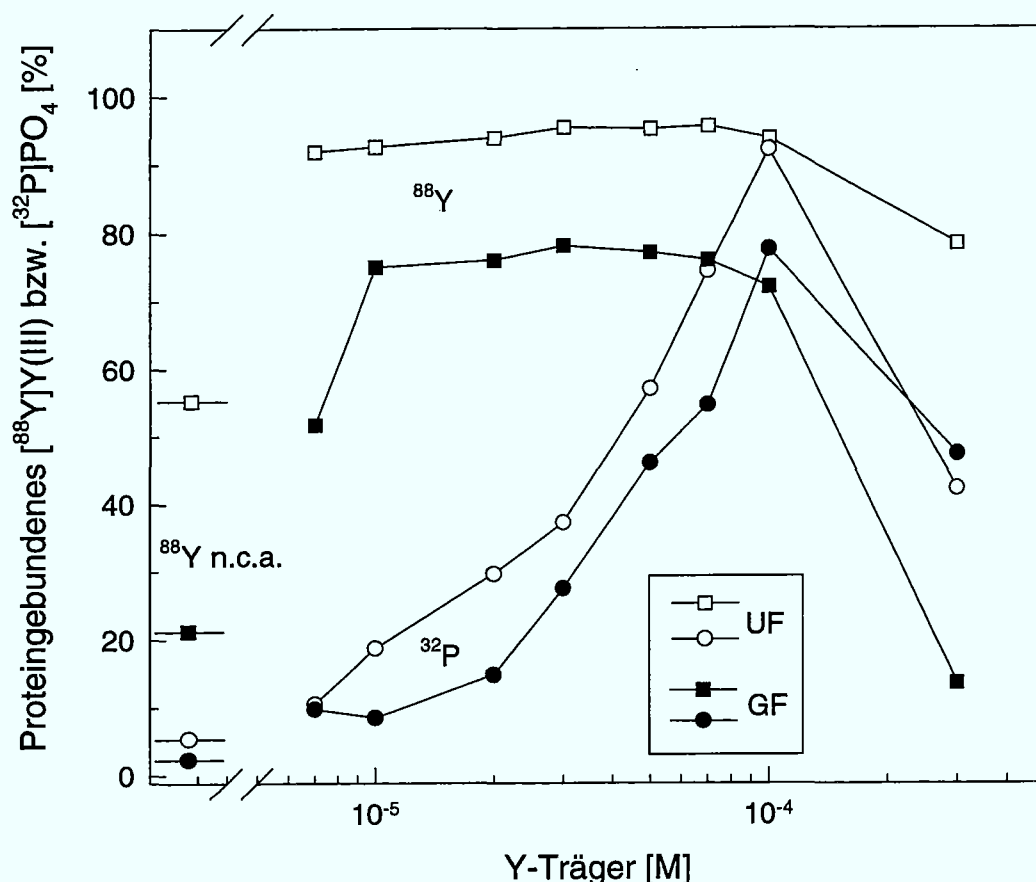


Abb.4.6: Bindung von $[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)}$ und $[^{32}\text{P}]\text{PO}_4$ an HSA in Abhängigkeit vom Y(III)-Trägergehalt; HSA 1 mg/mL, PO_4 -Träger $1 \cdot 10^{-4}$ M, $I = 0,15$ M, pH 7,0, Inkubationszeit 23 h; UF = Ultrafiltration, GF = Gelfiltration.

Ist der proteingebundene $[^{32}\text{P}]\text{PO}_4$ -Anteil bei trägerfreiem ^{88}Y bzw. niedrigen Y(III)-Trägerdosen noch sehr gering, so nimmt er mit zunehmendem Y(III)-Trägergehalt proportional zu und erreicht schließlich bei einem stöchiometrischen Yttrium zu Phosphat-Verhältnis von 1:1 bei $1 \cdot 10^{-4}$ M sein Maximum. Dieser proportionale Phosphat-Bindungsanstieg zeigt, daß Yttrium und Phosphat gemeinsam im Verhältnis 1:1 an HSA gebunden werden. Nach Durchlaufen des Maximums fällt sowohl der proteingebundene Y(III)- als auch Phosphat-Anteil ab. Im Fall von Y(III) erscheint eine Bindungsabnahme insofern verständlich, als den Yttrium-Ionen

nicht genügend Phosphat-Bindungspartner zur simultanen Bindung an HSA zur Verfügung stehen. Gleichzeitig müßte aber der proteingebundene Phosphat-Anteil bei Y(III)-Überschuß konstant bleiben. Die hier gefundene Bindungsabnahme dürfte sich damit begründen lassen, daß die Bindungskapazität von HSA für Yttrium und Phosphat in diesem Bereich gerade überschritten wird, und die HSA-Konzentration nicht mehr ausreicht, um die Bildung von schwerlöslichem Yttriumphosphat ($\log K_L \approx -22$) zu verhindern. Belegt wird diese Annahme durch das Bindungsverhalten beider Ionen bei der zehnfachen HSA-Konzentration (in Abb. 4.6 nicht gezeigt). Hier wird beobachtet, daß bei Yttrium-Überschuß der proteingebundene Yttrium-Anteil proportional abnimmt, wohingegen der proteingebundene Phosphat-Anteil konstant bleibt.

Zu diskutieren sind des weiteren die in der Abb.4.6 auffallenden Unterschiede in den absoluten Proteinbindungswerten für $[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)}$ und $[^{32}\text{P}]\text{PO}_4$ zwischen Ultra- und Gelfiltration, wobei die Trends beider Methoden vergleichbar sind. Die Unterschiede basieren auf dem Eingriff der Meßmethode in die sensiblen Bindungsgleichgewichte von proteingebundenem zu nicht-gebundenem Metall. Hierbei scheint die Ultrafiltration gegenüber der Gelfiltration Vorteile zu besitzen. Bei der Gelfiltration kommt es zu einer gewissen Dissoziation der ternären Verbindung zwischen Y(III), Phosphat und HSA sowohl durch die Wechselwirkung von Y(III) mit dem Gelmaterial als auch durch die Wechselwirkung mit dem Eluens aufgrund des Massenwirkungseffekts, da die Ionen des Eluens, die in hoher Konzentration vorliegen, Y(III) bzw. Phosphat aus der ternären Verbindung verdrängen können. Normalerweise kann dieser Verdrängungseffekt unterdrückt werden, indem dem Eluens die Ionen zugefügt werden, deren Bindung an Makromoleküle untersucht werden soll. Dies war in diesem Fall jedoch nicht möglich, da bei Zugabe von Y(III) und Phosphat zum Eluens YPO_4 ausgefallen wäre. Der Nachteil der Ultrafiltration andererseits liegt darin, daß nicht genau analysiert werden kann, in welcher chemischen Form $[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)}$ bzw. $[^{32}\text{P}]\text{PO}_4$ im Retentat vorliegen. Beispielsweise würde ausgefallenes YPO_4 ebenfalls mit den Proteinen im Retentat zurückbleiben.

4.4.3 Bindung von $[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)}$ und $[^{32}\text{P}]\text{PO}_4$ an HSA in Abhängigkeit vom pH-Wert

In dieser Studie stand der Einfluß des pH-Werts auf das Bindungsverhalten von Yttrium und Phosphat an HSA im Vordergrund. Der zum jeweiligen pH zugehörige proteingebundene $[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)}$ -Anteil ist in Abb.4.7 dargestellt. Die Werte für $[^{32}\text{P}]\text{PO}_4$ sind der Übersichtlichkeit halber weggelassen worden. Sie liegen jedoch immer bei ca. 50% des proteingebundenen $[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)}$ -Werts, da die Phosphat-Konzentration in der Lösung doppelt so hoch wie die Y(III)-Konzentration war. Somit bestätigt sich auch hier eine 1:1-Bindung von Yttrium und Phosphat an HSA.

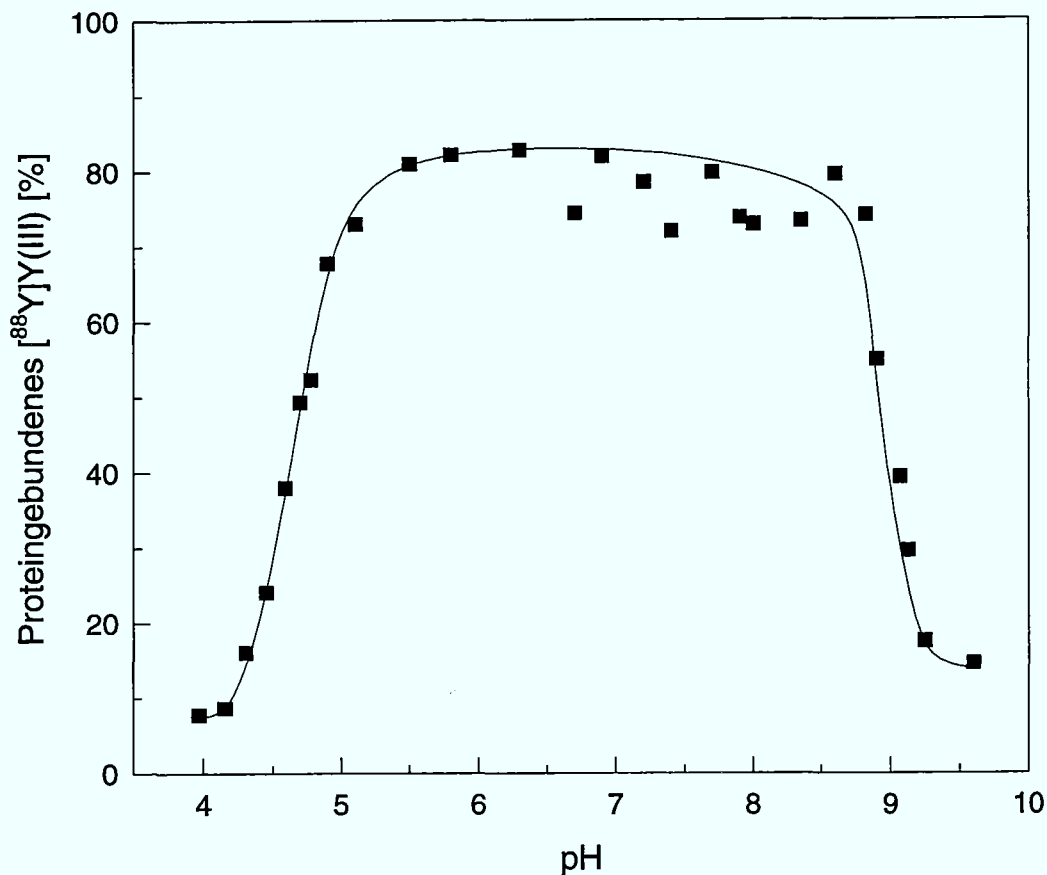


Abb.4.7: $[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)}$ -Bindung an HSA in Abhängigkeit vom pH; HSA 1 mg/mL, Y(III)-Träger $5 \cdot 10^{-5}$ M, PO_4 -Träger $1 \cdot 10^{-4}$ M, $I = 0,15$, Inkubationszeit 23 h.

Im pH-Bereich von 5,5 bis 8,5 bleibt der proteingebundene Y(III)- und Phosphat-Anteil konstant, nimmt jedoch oberhalb bzw. unterhalb dieser Werte stark ab. Zum einen lassen sich gute Gründe für die Annahme einer ternären Komplexverbindung zwischen Yttrium, Phosphat und HSA finden, zum anderen kann aber die Bildung eines lyophoben Yttrium-Phosphat-Kolloids durch elektrosterische Schutzwirkung des Biomakromoleküls HSA nicht ausgeschlossen werden. Beide Modelle

sollen im folgenden kurz diskutiert werden, wobei der Schwerpunkt auf den sauren Bereich gelegt wird, da die Verhältnisse im alkalischen Bereich durch Hydrolyseerscheinungen unübersichtlich werden und die Bildung von schwerlöslichem $Y(OH)_3$ nicht ausgeschlossen werden kann.

Ternäre Verbindung zwischen Yttrium, Phosphat und HSA

Im neutralen Gebiet ist die ternäre Komplexverbindung zwischen Yttrium, Phosphat und HSA über einen weiten pH-Bereich stabil. Beim Übergang vom neutralen in den sauren Bereich wird jedoch eine zunehmende Zersetzung der Komplexverbindung beobachtet, die sich primär durch die im folgenden beschriebenen Punkte interpretieren lassen sollte. Dabei handelt es sich um kooperative Effekte, die nicht isoliert voneinander zu betrachten sind, sondern sich in ihrer Wirkung gegenseitig verstärken.

1. Isomerisierung

Wenn eine Albuminlösung mit HCl titriert wird, zeigt die Titrationskurve ungefähr bei pH 4 - 4,5 eine Diskontinuität: ungefähr 40 Carboxyl-Gruppen, die vorher durch Ionenbindungen maskiert waren, werden abrupt titrierbar. Mit der Protonierung ist eine zunehmende positive Ladung auf dem Proteinmolekül verbunden, die schließlich infolge der Coulomb-Abstoßung zu einer Auseinanderbewegung der Proteinketten und damit zu einer Aufweitung der kompakten Albuminstruktur führt: es kommt zur Koexistenz zweier Albuminisomere [119]. Diese Heterogenität der Albuminfraktion macht sich bei der Gelelektrophorese bemerkbar. Mit abnehmendem pH-Wert wird zunehmend eine im Vergleich zum neutralen Albumin schneller wandernde Albuminform gefunden. In Anlehnung an die unterschiedlichen Laufgeschwindigkeiten im elektrischen Feld spricht man vom N-F-Übergang (wobei F für *fast* und N für *native* steht). Die Expansion des Albuminmoleküls führt zu drastischen Änderungen der physikalischen und chemischen Eigenschaften (z.B. Löslichkeits- und Bindungsverhalten), so daß auch plausibel erscheint, daß HSA im sauren Gebiet seine Fähigkeit verliert, eine wie auch immer geartete $Y(III)-PO_4$ -Spezies zu binden.

2. Protonierung der Carboxylat-Gruppen

Die im neutralen deprotonierten Carboxylat-Gruppen der Glutamin- und Asparaginsäure in der Proteinkette des Albuminmoleküls stellen potentielle Bindungsstellen für positiv geladene $Y(III)$ -Phosphat-Spezies wie z.B. $[YHPO_4]^+$ oder $[YH_2PO_4]^{2+}$ dar. Mit abnehmendem pH-Wert kommt es zu einer zunehmenden Protonierung dieser Gruppen und dadurch zu einer Abnahme der Bindungskapazität für eine positiv geladene $Y(III)-PO_4$ -Verbindung. Bemerkenswert erscheint die

Tatsache, daß der experimentelle Kurvenverlauf der Bindungsabnahme von pH 5,5 bis 4,0 für die Y(III)-PO₄-Spezies fast exakt mit der H⁺-Titrationskurve der γ- und β-Carboxyl-Gruppen der Asparagin- und Glutaminsäure zusammenfällt (pK-Werte für γ- und β-Carboxyl-Gruppen in Proteinen ca. 4,4 - 4,7) [120].

3. Protonierungsgleichgewicht der Phosphorsäure

Die Erniedrigung des pH-Werts führt zu einer Verschiebung der Gleichgewichte der Phosphatbindungspartner für Y(III): $\text{H}_2\text{PO}_4^- \leftrightarrow \text{HPO}_4^{2-} \leftrightarrow \text{PO}_4^{3-}$ zuungunsten von HPO_4^{2-} und PO_4^{3-} . Daraus ließe sich ableiten, daß eine Form dieser PO₄-Ionen für die Y(III)-PO₄-HSA-Bindung verantwortlich ist und die Verarmung der Lösung an diesen Ionenspezies letztlich die Bindungsabnahme bewirkt. Zur Veranschaulichung der Verhältnisse sind in Abb.4.8 die verschiedenen Phosphat-Ionenkonzentrationen in Abhängigkeit vom pH-Wert dargestellt.

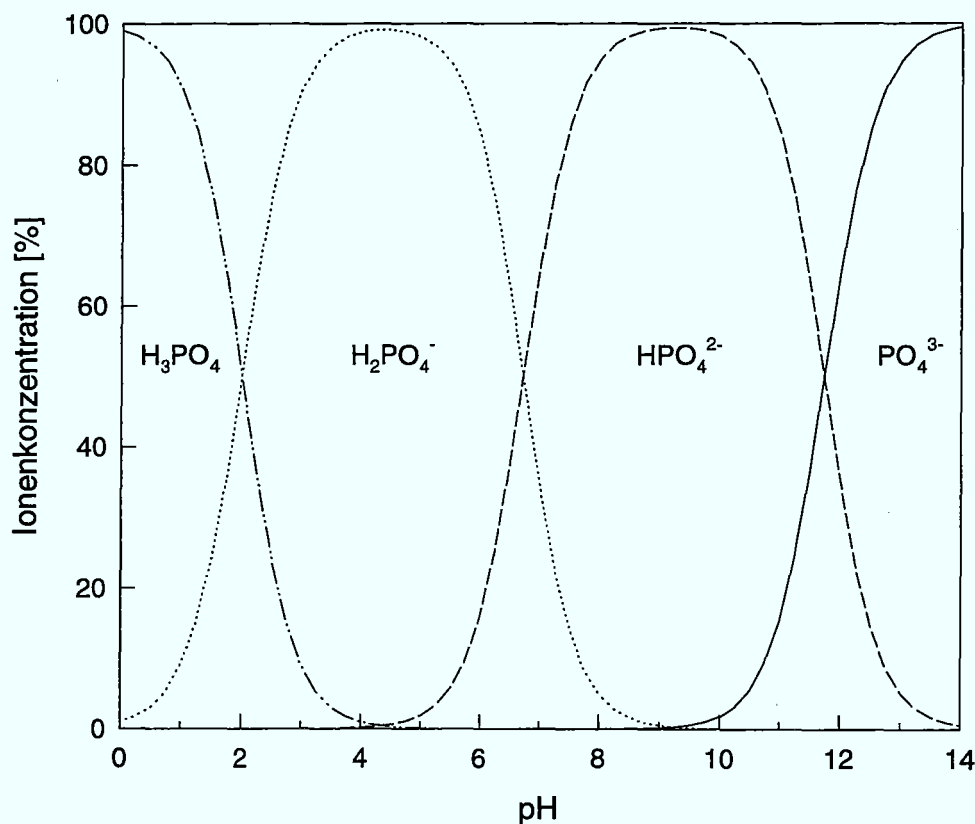


Abb.4.8: Abhängigkeit der Phosphat-Ionenkonzentrationen vom pH-Wert berechnet mit den pK-Werten nach Martell [116].

Elektrosterisch stabilisiertes lyophobes YPO_4 -Kolloid

Ohne experimentellen Nachweis wird in der Literatur die hohe Anreicherung dreiwertiger Metalle in den Organen des Retikuloendothelialen Systems mit der Bildung eines Me(III) -Hydroxid-Kolloids oder anderer Me(III) -Kolloide begründet [52,121-123]. Wie es zur Bildung des Kolloids im Blut kommen und in welcher chemischen Form es hierbei vorliegen soll, ist ungeklärt. So schließt Seidel aus Untersuchungen über die Bindung von Radioyttrium an Plasmaproteine in Abhängigkeit von der Y(III) -Trägerdosis, daß nur im Fall von trägerfreiem Yttrium und eventuell kleinen Trägerdosen eine echte Chelierung mit Proteinen vorliegt, während es sich bei steigenden Trägerdosen um nicht näher definierte proteinhaltige Kolloide handeln soll [93].

Vor diesem Hintergrund könnte die hier gemessene pH-Abhängigkeit alternativ zum Modell der ternären Komplexverbindung mit der Bildung eines lyophoben YPO_4 -Kolloids beschrieben werden. Hierbei käme HSA die Funktion eines Schutzkolloids zu, welches die Aggregation der fein verteilten, negativ geladenen YPO_4 -Partikel zu größeren Teilchenaggregaten makroskopischer Dimension (Bildung von schwerlöslichem YPO_4) verhindert. HSA besitzt als negativ geladener Polyelektrolyt potentiell eine Kombination verschiedener Stabilisierungsmechanismen. Zum einen könnte es als sterischer und zum anderen elektrostatischer Stabilisator die Stabilisierung* des dispersen Yttrium-Phosphat-Systems bewirken. Der experimentelle Kurvenverlauf in Abb.4.7 könnte dadurch erklärt werden, daß die zunehmende H^+ -Konzentration die negative Ladung der diffusen Doppelschicht der kolloidalen Partikel, die die elektrostatische Abstoßung untereinander bewirkt, langsam neutralisiert, bis die elektrostatische Abstoßung schließlich nicht mehr ausreicht, um Zusammenstöße zwischen den Partikeln zu verhindern. Das würde schließlich zur Koagulation des kolloidalen Systems führen.

*Diese Stabilisierungsmechanismen beruhen auf einer Adsorption bzw. Bindung des Biopolymers auf der Oberfläche der dispersen Partikel. Dies verhindert einerseits durch sterische Abschirmung und andererseits durch elektrostatische Abstoßung eine so starke Annäherung der dispersen Partikel, daß van der Waalssche Anziehungskräfte wirksam werden könnten, die zu einer Koagulation des dispersen Systems führen. Die hohe Schutzwirkung von Albumin läßt sich auch aus seiner relativ niedrigen Goldzahl von 0,1-0,2 mg/10 cm³ ablesen. Die Goldzahl ist dabei definiert als die Menge (in mg) eines Polymers, die bei Zugabe zu 10 cm³ kolloidalem Gold die Koagulation dieses Kolloids bei Zugabe von 1 cm³ 10 %-iger NaCl-Lösung gerade noch verhindert. Hierbei ist zu beachten, daß sich Goldzahl und Schutzwirkung umgekehrt proportional verhalten (je geringer die Goldzahl, desto höher die Schutzwirkung) [124].

Eine andere Hypothese wäre, daß die durch die pH-Änderung bewirkte Modifizierung des Albuminmoleküls zu einer kontinuierlichen Abnahme seiner Schutzwirkung führt. Aus der Aufweitung der Albuminstruktur im sauren Bereich könnte ein verringerter sterischer Schutz des Kolloids resultieren. Zudem läßt die elektrostatische Stabilisierung mit abnehmendem pH ebenfalls nach, da es zu einer zunehmenden Neutralisation der negativen Ladung des Albumins kommt (isoelektrischer Punkt für HSA = 4,7).

Gegen diese Annahme spricht, daß die simultane Bindung von Yttrium und Phosphat gegenüber Einfrieren und anschließendem Auftauen stabil ist. Auch kann nach Gefriertrocknung und anschließendem Lösen des Pulvers in Wasser keine deutliche Abnahme von proteingebundenem Yttrium und Phosphat detektiert werden (vor der Gefriertrocknung: 80%; nach der Gefriertrocknung 71% proteingebunden). Lyophobe Kolloide sollten eine derartige Behandlung nicht überstehen - eine irreversible Ausflockung des kolloidalen Systems wäre die Folge. Allerdings ist nicht bekannt, inwieweit HSA als an der Oberfläche der dispersen Partikel adsorbiertes Polymer das Kolloid gegen eine irreversible Koagulation unter diesen Bedingungen schützen kann.

4.4.4 Bindung von [^{88}Y]Y(III) und [^{32}P]PO₄ an HSA in Abhängigkeit von der HSA-Konzentration

In einer weiteren Meßserie wurde bei konstanter Y(III)- und PO₄-Trägerkonzentration (jeweils $1 \cdot 10^{-4}$ M) die HSA-Konzentration kontinuierlich von 10 mg/mL auf 0,07 mg/mL erniedrigt und ihre Auswirkung auf die simultane Y(III)- und Phosphat-Bindung an HSA untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb.4.9 dargestellt. Der Übersichtlichkeit halber wurde auch hier auf die Darstellung der [^{32}P]PO₄-Meßwerte verzichtet, da sie in etwa die gleichen Proteinbindungswerte aufweisen.

Bei einer HSA-Konzentration von ca. 0,4-0,5 mg/mL ist die Bindungskapazität von HSA für die simultane Bindung von Y(III) und Phosphat mit jeweils $1 \cdot 10^{-4}$ M erschöpft. Unterhalb dieses Wertes nimmt der proteingebundene Yttrium- und Phosphat-Anteil exponentiell ab. Ist die Proteinkonzentration schließlich auf 0,1 mg/mL abgesunken, ist der proteingebundene Yttrium- und Phosphat-Anteil vernachlässigbar gering. Wieder läßt sich der Kurvenverlauf durch die beiden im vorhergehenden Abschnitt bereits erörterten Modellannahmen deuten.

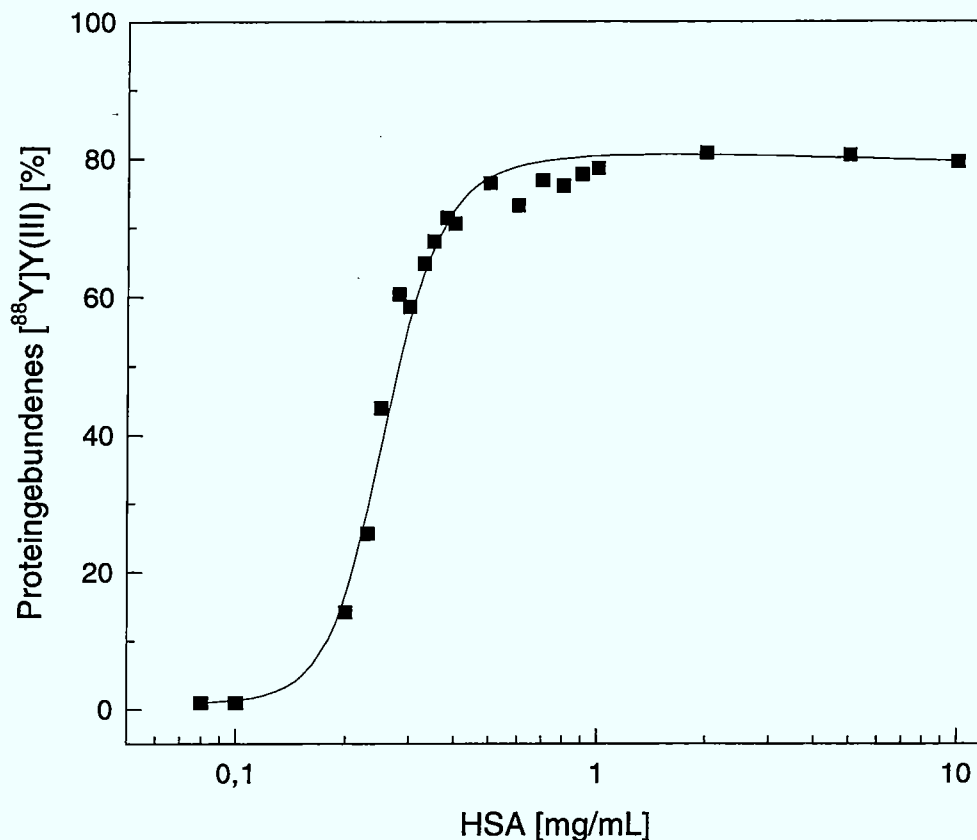


Abb.4.9: Bindung von $[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)}$ an HSA in Abhängigkeit von der HSA Konzentration; $[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)}$ -Träger $1 \cdot 10^{-4}$ M, $[^{32}\text{P}]\text{PO}_4$ -Träger $1 \cdot 10^{-4}$ M, $I = 0,15$ M, pH 7,0, Inkubationszeit 23 h.

Ternärer Komplex

Der Abfall der Y(III)- und Phosphat-Bindung an HSA mit sinkender HSA-Konzentration läßt sich damit erklären, daß im Albuminmolekül nur eine begrenzte Anzahl an Bindungsstellen für eine Simultanbindung von Y(III) und Phosphat existiert. Die kontinuierliche Reduzierung der HSA-Konzentration bedingt bis zu einem bestimmten Wert die Absättigung der Bindungsstellen, so daß danach überschüssige Y(III)- bzw. Phosphat-Ionen nicht mehr gebunden werden können. Aus diesen Angaben sollte sich eine Abschätzung der Anzahl der Bindungsstellen pro Albuminmolekül durch eine geeignete Auftragung ergeben, die im folgenden Abschnitt erörtert wird.

Y- PO_4 -Kolloid

Mit der Abnahme der HSA-Konzentration könnte auch eine Abnahme der elektrostatischen Stabilisierung des Kolloids verbunden sein. Dies hätte zur Folge, daß die thermodynamisch instabilen dispersen YPO_4 -Teilchen mit abnehmender Schutzkolloidkonzentration zur Bildung makroskopischer Aggregate und damit zur Koagulation des Systems neigen.

4.4.5 Bestimmung der Anzahl der Bindungsstellen für die simultane Bindung von $[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)}$ und $[^{32}\text{P}]\text{PO}_4$ an HSA

In der Abb.4.10 ist die Anzahl der Mole gebundenen Yttriums (da Yttrium und Phosphat in einer 1:1-Verbindung an HSA gebunden werden, gilt gleiches für Phosphat) pro Mol HSA gegen die Konzentration an freiem Yttrium im Gleichgewicht aufgetragen. Wenn hier und im folgenden von „freiem“ Y(III) gesprochen wird, ist darunter nicht wirklich freies ionisches Y^{3+} bzw. PO_4^{3-} zu verstehen, da es in diesem Konzentrations- bzw. pH-Bereich zur Bildung von schwerlöslichem YPO_4 kommt. „Freies“ Y(III) bzw. Phosphat bedeutet hier also „nicht proteingebundenes“. Mit steigender Y(III)- bzw. Phosphat-Konzentration sind schließlich alle Bindungsstellen abgesättigt, so daß eine weitere Y(III)- bzw. Phosphat-Zugabe einen Anstieg an „freiem“ Y(III) bzw. Phosphat im Gleichgewicht bewirkt. Die pro Mol HSA gebundenen Mole der Y(III)-Phosphat-HSA-Verbindung bleiben nach Erreichen des Sättigungswertes konstant. Aus dem Diagramm läßt sich die Anzahl der Bindungsstellen mit ca. 14 abschätzen.

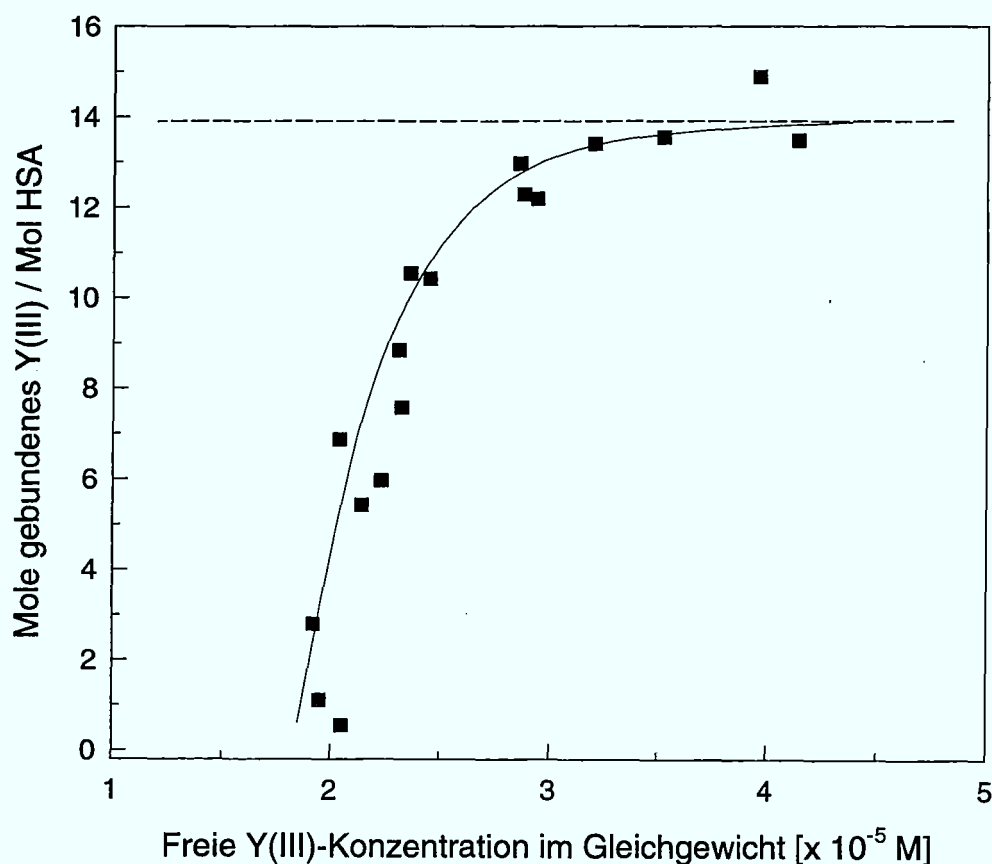


Abb.4.10: Bestimmung der Anzahl der Bindungsstellen für Y(III)-Phosphat-Spezies im HSA-Molekül.

Es wurde auch versucht, die Anzahl der Bindungsstellen im HSA-Molekül mittels einer Auftragung nach Scatchard zu bestimmen [125]. Dieses graphische Auswerteverfahren ist die klassische Standardmethode zur Beschreibung der Bindung von kleinen Molekülen oder Liganden an Biomakromoleküle, in denen pro Molekül aufgrund etlicher Bindungsstellen pro Makromolekül mehrere Komplexbildungsgleichgewichte beteiligt sind. Die im Experiment ermittelten Meßpunkte ergaben bei einer Scatchardauftragung jedoch keine sinnvolle Abhängigkeit. Dies könnte zum einen an den Unzulänglichkeiten der verwendeten Meßtechniken liegen. Zum anderen erscheint aber wahrscheinlicher, daß die Scatchardmethode zur Beschreibung dieses komplexen ternären Systems nicht geeignet ist. Dies mag z.T. darauf zurückzuführen sein, daß gerade im Sättigungsbereich des Albuminmoleküls als Konkurrenzreaktion zur Bindung die Bildung von schwerlöslichem YPO_4 auftritt, die zu einer überproportionalen Abnahme von YPO_4 in diesem Bereich führt, so daß aus der logarithmischen Scatchardauftragung keine lineare Abhängigkeit resultiert. Für den Fall, daß ein kolloidales System vorliegt, ist die Scatchardmethode zur Beschreibung des Systems sowieso untauglich.

4.4.6 Stabilität der ternären Verbindung gegenüber verschiedenen Komplexliganden

Der Einfluß von Liganden mit unterschiedlichen Yttrium-Komplex-Stabilitätskonstanten auf die ternäre Verbindung zwischen Yttrium, Phosphat und HSA sollte eine Abschätzung der Stabilität dieser Verbindung ermöglichen. Dazu wurde die Proteinbindung von $[\text{}^{88}\text{Y}]\text{Y(III)}$ und $[\text{}^{32}\text{P}]\text{PO}_4$ in Abhängigkeit von der Konzentration der in Tab.4.3 mit Angabe ihrer Yttrium-Stabilitätskonstanten aufgeführten Liganden gemessen. Die Ergebnisse der Studie sind in Abb.4.11 zusammengefaßt.

Tab.4.3: Stabilitätskonstanten der Yttrium-Ligand-Komplexe.

Komplexligand	Komplexverbindung	Stabilitätskonstante $\log\beta$ (25°C; I = 0,1 M) [116]
$\alpha\text{-HIB}^{(a)}$	$[\text{Y(HIB)}]^{2+}$	3,1
	$[\text{Y(HIB)}_2]^+$	5,7
	$[\text{Y(HIB)}_3]$	7,5
Cit ^(b)	$[\text{Y(Cit)}]$	7,87
	$[\text{Y(Cit)}_2]^{3-}$	11,2
NTA ^(c)	$[\text{Y(NTA)}]$	11,42
	$[\text{Y(NTA)}_2]^{3-}$	20,41

^(a) $\alpha\text{-HIB}$: α -Hydroxyisobuttersäure, ^(b) Cit: Citrat, ^(c) NTA: Nitrilotriacetat

Wie aus der Abb.4.11 ersichtlich, kommt es mit steigender Ligandenkonzentration zu einer Abnahme des proteingebundenen ^{88}Y -Anteils (gleiches gilt auch hier wiederum für ^{32}P), da in einer Konkurrenzreaktion der jeweilige Y(III)-Ligand-Komplex gebildet wird. Bei sehr hohen Ligandenkonzentrationen wird schließlich keine ternäre Verbindung zwischen Y(III), Phosphat und HSA mehr gebildet, sondern es liegt nur noch der jeweilige Y(III)-Ligand-Komplex vor. Dabei ist mit abnehmender Stabilität des sich bildenden Yttrium-Komplexes eine Verschiebung der Kurven nach rechts, d.h. zu höheren Ligandenkonzentrationen festzustellen. Reicht beispielsweise im Fall des NTA-Liganden noch ein zwei- bis dreifacher Ligandenüberschuß dazu aus, daß keine ternäre Verbindung gebildet wird, so beträgt er bei Citrat ungefähr das zehnfache und bei α -HIB, dem Liganden mit der geringsten Yttrium-Komplexbildungskonstante, sogar das tausendfache.

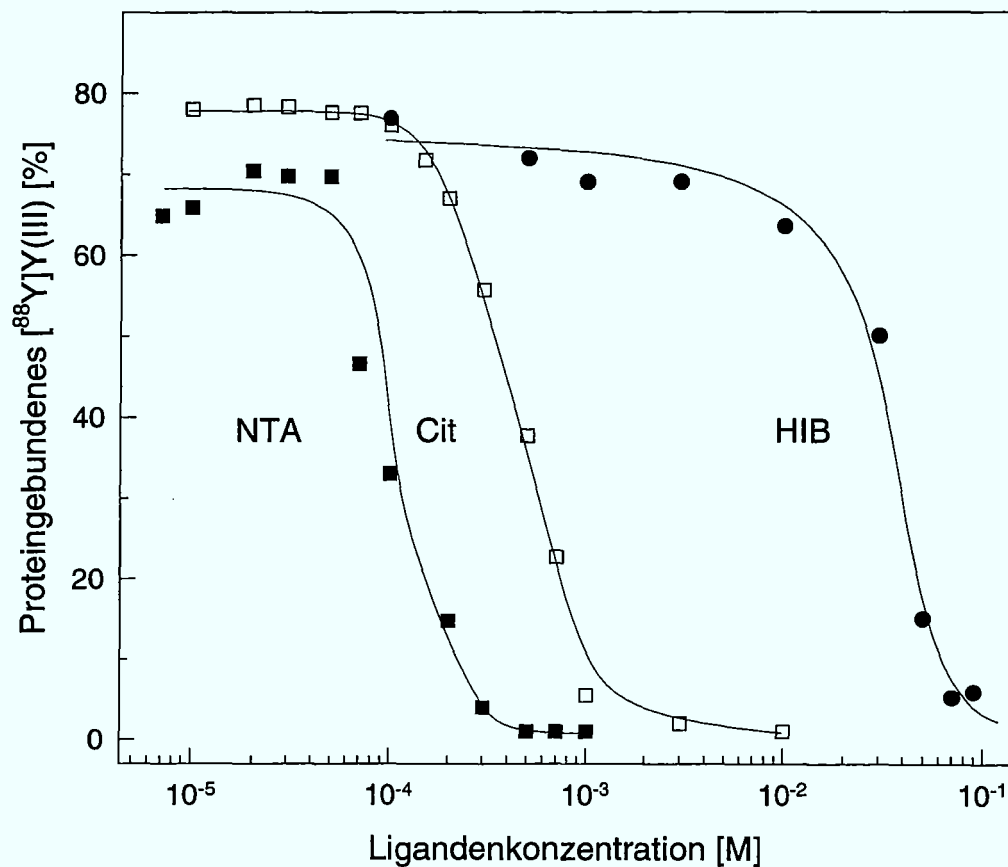
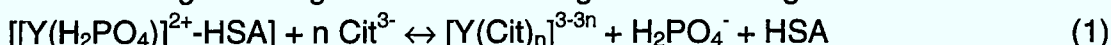


Abb.4.11: Proteinbindungswerte von ^{88}Y (III) in Abhängigkeit von der Konzentration verschiedener Komplexliganden (NTA = Nitrilotriacetat, Cit = Citrat, HIB = α -Hydroxyisobuttersäure); HSA 1 mg/mL, Y(III)-Träger $1 \cdot 10^{-4}$ M, PO_4 -Träger $1 \cdot 10^{-4}$ M, $I = 0,15$ M, pH 7,0, Inkubationszeit 22 h.

Aus der Citratkurve läßt sich durch die Einführung von Vereinfachungen und Annahmen die Stabilitätskonstante der Y(III)-PO₄-HSA-Verbindung grob abschätzen. Als Hypothese wird angenommen, daß a.) eine ternäre Komplexverbindung vorliegt, und b.) das Phosphatanion H₂PO₄⁻ den Bindungspartner in der ternären Verbindung darstellt und der Komplex folglich die Form [Y(H₂PO₄)]²⁺-HSA hat. Die Annahme einer 1:1:1-Stöchiometrie ist jedoch nicht korrekt, da pro Proteinmolekül ca. 14 Y-PO₄-Teilchen gebunden werden können (vgl. Abschnitt 4.4.5). Berücksichtigt wird dies durch die Annahme einer 14-fachen HSA-Konzentration, wobei voneinander unabhängige Bindungsstellen mit gleichen Bindungsaffinitäten postuliert werden.

Die Grundlage der folgenden Berechnung ist die Gleichgewichtsreaktion:



Von Interesse sind daher die Komplexbildungsgleichgewichte:

$$\beta_{([Y(H_2PO_4)]^{2+}-HSA)} = \frac{[[Y(H_2PO_4)]^{2+} - HSA]}{[Y(H_2PO_4)]^{2+} [HSA]} \quad (2)$$

$$K_{([Y(H_2PO_4)]^{2+})} = \frac{[Y(H_2PO_4)]^{2+}}{[Y^{3+}] [H_2PO_4^-]} \quad (3)$$

Substitution von Glg. (3) in Glg. (2) führt zu

$$\beta_{([Y(H_2PO_4)]^{2+}-HSA)} = \frac{[[Y(H_2PO_4)]^{2+} - HSA]}{K_{([Y(H_2PO_4)]^{2+})} [Y^{3+}] [H_2PO_4^-] [HSA]} \quad (4)$$

Die Komplexbildungsgleichgewichte für den Yttrium-Citrat-Komplex lauten:

$$K_{([Y(Cit)])} = \frac{[Y(Cit)]}{[Y^{3+}] [Cit^{3-}]} \quad (5)$$

bzw.

$$\beta_{([Y(Cit)_2]^{3-})} = \frac{[Y(Cit)_2]^{3-}}{[Y^{3+}] [Cit^{3-}]^2} \quad (6)$$

Da eine signifikante Abnahme des proteingebundenen ⁸⁸Y-Anteils und damit der ternären Verbindung erst auftritt, wenn die Citrat-Konzentration wesentlich höher als die Yttrium-Konzentration ist, kann davon ausgegangen werden, daß primär der Dicitrato-Komplex in der Lösung vorliegt. Eine Kombination von Glg.(4) und Glg.(6) ergibt daher:

$$\frac{\left[\left[Y(H_2PO_4)^{2+} - HSA \right] \right]}{\left[Y(Cit)_2 \right]^{3-}} = \frac{\beta_{\left(\left[Y(H_2PO_4)^{2+} - HSA \right] \right)} K_{\left(\left[Y(H_2PO_4)^{2+} \right] \right) \left[H_2PO_4^- \right] \left[HSA \right]}}{\beta_{\left(\left[Y(Cit)_2 \right]^{3-} \right)} \left[Cit^{3-} \right]^2} \quad (7)$$

Durch Umstellung ergibt sich

$$\beta_{\left(\left[Y(H_2PO_4)^{2+} - HSA \right] \right)} = \frac{\left[\left[Y(H_2PO_4)^{2+} - HSA \right] \right]}{\left[Y(Cit)_2 \right]^{3-}} \frac{\beta_{\left(\left[Y(Cit)_2 \right]^{3-} \right)} \left[Cit^{3-} \right]^2}{K_{\left(\left[Y(H_2PO_4)^{2+} \right] \right) \left[H_2PO_4^- \right] \left[HSA \right]}} \quad (8)$$

Für das $\frac{\left[\left[Y(H_2PO_4)^{2+} - HSA \right] \right]}{\left[Y(Cit)_2 \right]^{3-}}$ -Verhältnis von 1 kann aus der experimentellen

Kurve in Abb.4.11 eine Citratkonzentration von $[Cit] = 5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ abgelesen werden. Mit den Literaturwerten $\log K_{\left(\left[Y(H_2PO_4)^{2+} \right] \right)} = 1,84$ [116] und $\log \beta_{\left(\left[Y(Cit)_2 \right]^{3-} \right)} = 11,2$ [117]

und den experimentellen Konzentrationen $[HSA] = 2,03 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ und $[H_2PO_4^-] = 3,4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, wobei letzteres aus den Phosphationen-Gleichgewichts-Konzentrationen bei pH 7 berechnet wird (vgl. Abb.4.8), erhält man nach dem Einsetzen dieser Werte für die Stabilitätskonstante der ternären Verbindung:

$$\beta_{\left(\left[Y(H_2PO_4)^{2+} - HSA \right] \right)} = 8,2 \cdot 10^{10} \text{ bzw. } \log \beta_{\left(\left[Y(H_2PO_4)^{2+} - HSA \right] \right)} = 10,9.$$

4.5 Untersuchung anderer Yttrium-Phosphat-Polyelektrolyt-Systeme

4.5.1 Bindung von $[^{88}Y]Y(III)$ und $[^{32}P]PO_4$ an Serumproteine in mit $[^{32}P]PO_4$ markiertem Vollblutserum in Abhängigkeit vom Y(III)-Trägergehalt

Um im Serum unter in vitro-Bedingungen ebenfalls eine synergistische Bindung von Y(III) mit Phosphat an Serumproteine nachweisen zu können, wurde analog zum HSA-Modellversuch (Abschnitt 4.4.2) frisches, mit $[^{32}P]PO_4$ markiertes Serum mit sukzessiv steigenden Y(III)-Trägerdosen inkubiert und die proteingebundenen $[^{88}Y]Y(III)$ - und $[^{32}P]PO_4$ -Anteile bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb.4.12 dargestellt.

Auch hier nimmt der endogene proteingebundene $[^{32}P]PO_4$ -Anteil proportional mit steigender Y(III)-Trägerdosis zu, so daß der synergistische Effekt des Yttriums auf die Phosphatbindung bzw. des Phosphats auf die Yttriumbindung an die Proteine bestätigt wird. Das Maximum der Phosphat-Proteinbindung wird bei ca. $1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ erreicht. Dies stimmt sehr gut mit dem in der Literatur angegebenen anorgani-

schen Phosphatgehalt (H_2PO_4^- und HPO_4^{2-}) von 1,15 mM im Blutserum überein [126]. Nach dem Durchlaufen des Maximums bleibt der proteingebundene Phosphat-Anteil bei der Gel- und Ultrafiltration und der proteingebundene Y(III)-Anteil bei der Ultrafiltration konstant, während der an HSA assoziierte Y(III)-Anteil bei der Gelfiltration mit steigender Konzentration abnimmt. Wie oben bereits diskutiert, beruht letzteres darauf, daß nach Überschreiten des Maximums nicht mehr ausreichend Phosphat-Bindungspartner zur Verfügung stehen und dementsprechend weniger Y(III) an Serumproteine gebunden wird.

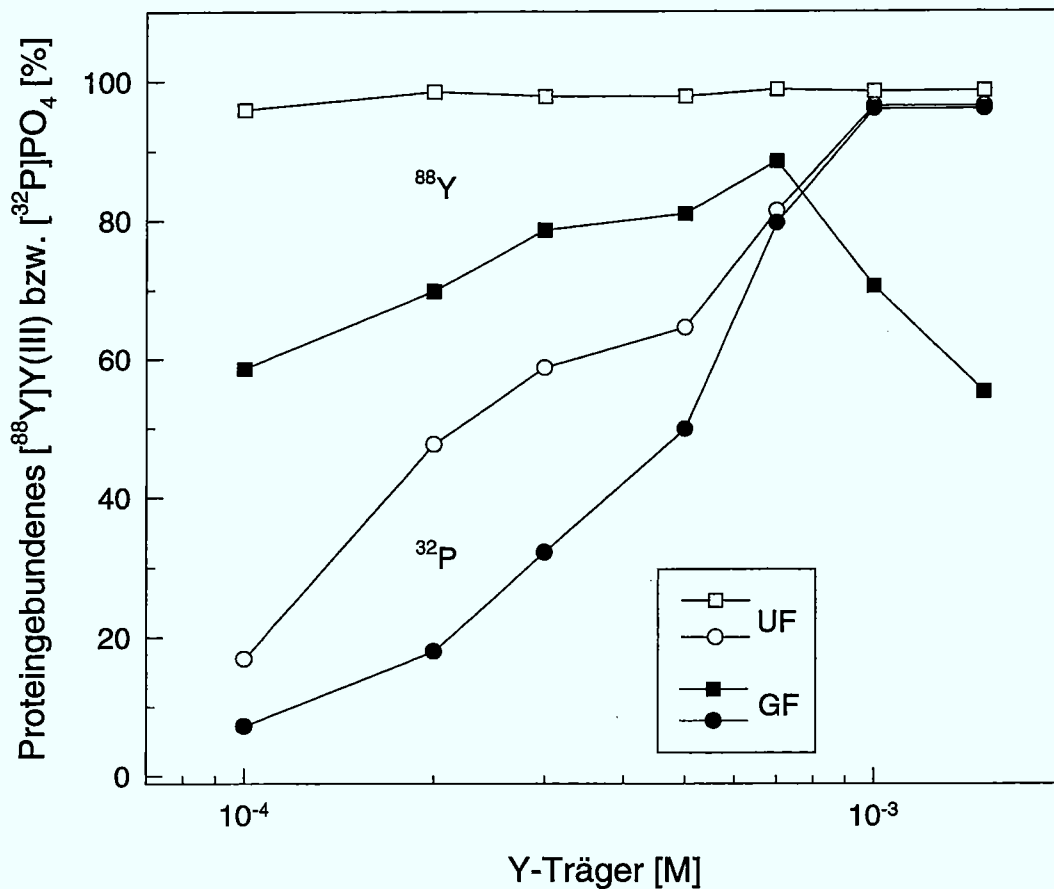


Abb.4.12: Bindung von ^{88}Y Y(III) und ^{32}P PO₄ an ^{32}P PO₄ markiertes Vollblutserum in Abhängigkeit vom Y(III)-Trägergehalt; Inkubationszeit 23 h, UF = Ultrafiltration, GF = Gelfiltration.

Für die konstant hohe Y(III)-Bindung bei der Ultrafiltration lassen sich zwei Gründe nennen. Zum einen kann überschüssiges Y(III) über schwache reversible elektrostatische Wechselwirkungen an die Serumproteine gebunden sein, die mittels Gelfiltration nicht detektierbar sind. Zum anderen kann das Löslichkeitsprodukt für YPO_4 überschritten sein, wobei YPO_4 von proteingebundenem Y(III) bzw. Phos-

phat nicht zu unterscheiden ist. Auch wenn das Verhalten oberhalb des Phosphat-Sättigungsbereichs nicht befriedigend zu interpretieren ist, so bleibt dennoch festzustellen, daß im Vollblutserum wie im HSA-Modellsystem ein synergistischer Einfluß von Yttrium bzw. Phosphat auf die Bindung des jeweils anderen Anions bzw. Kations an Serumproteine nachgewiesen werden kann.

4.5.2 Bindung von [^{88}Y]Y(III) und [^{32}P]PO₄ an apo-Transferrin in Abhängigkeit vom Y(III)-Trägergehalt

Nach der eingehenden Untersuchung des Y(III)-Phosphat-HSA-Systems war von Interesse, ob auch andere Serumproteine die Fähigkeit besitzen, mit Yttrium und Phosphat eine ternäre Verbindung einzugehen, oder ob die Bindung der YPO₄-Spezies an spezifische Bindungsstellen im HSA-Molekül gekoppelt ist. Hierbei bot sich Transferrin an, da es neben den in allen Proteinen vorkommenden unspezifischen Wechselwirkungsstellen über zwei spezifische Bindungsstellen für zwei- und dreiwertige Metalle verfügt. In ersten orientierenden Versuchen zeigte sich, daß Yttrium wie im Fall von HSA ohne Gegenwart von Phosphat nicht signifikant an Transferrin gebunden wird. Wurde hingegen zur Transferrinlösung Phosphat gegeben, so resultierte daraus eine signifikante Bindungserhöhung von Yttrium an apo-Transferrin. Da das Vermögen zur spezifischen Bindung von Metallen im Transferrinmolekül an die Anwesenheit von geeigneten Anionen gekoppelt ist, wurde versucht, durch Zugabe von NaHCO₃ ebenfalls eine signifikante Bindung von Yttrium an apo-Transferrin herbeizuführen. Auch in diesem Fall konnte keine Bindung von Yttrium an das Serumprotein nachgewiesen werden. Daraus ließe sich ableiten, daß der Ionenradius des Y(III) im Vergleich zu den anderen Metallionen wie Fe(III), Ga(III) oder In(III), die von Transferrin fest und spezifisch in Gegenwart eines geeigneten Anions gebunden werden, zu groß ist und demzufolge Yttrium, wenn überhaupt, nur sehr schwach gebunden wird.

Zur Verifizierung des synergistischen Einflusses von Phosphat auf die Yttrium-Bindung an apo-Transferrin wurden, wie im Fall von HSA (vgl. Abschnitt 4.4.2), die Auswirkungen steigender Y(III)-Trägerkonzentrationen auf das ternäre System aus apo-Transferrin, Phosphat und Yttrium untersucht. Die Resultate sind in Abb.4.13 dargestellt.

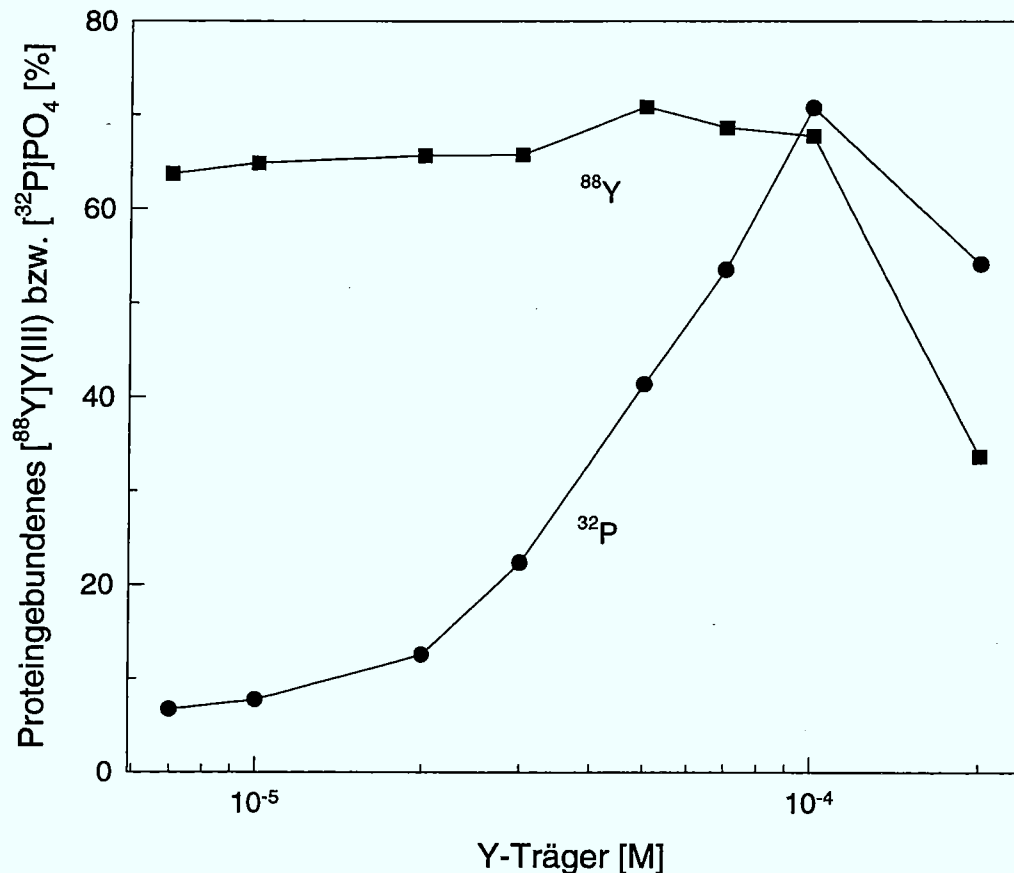


Abb.4.13: Bindung von $^{88}\text{Y}(\text{III})$ und $^{32}\text{P}\text{PO}_4$ an apo-Transferrin in Abhängigkeit vom Y(III)-Trägergehalt;
apo-Transferrin 1 mg/mL, PO_4 -Träger $1 \cdot 10^{-4}$ M, $I = 0,15$ M, pH 7,0, Inkubationszeit 23 h.

Auch mit apo-Transferrin zeigt Yttrium das zuvor schon im Fall von HSA und Vollblutserum nachgewiesene Bindungsverhalten. Mit der Zunahme der Y(III)-Trägerkonzentration ist ein proportionaler Anstieg des proteingebundenen Phosphat-Anteils verbunden. Das Maximum wird wiederum bei einem Yttrium : Phosphat-Verhältnis von 1:1 bei $1 \cdot 10^{-4}$ M Y(III) gefunden. Bei höheren Konzentrationen nehmen sowohl der proteingebundene Phosphat- als auch der Yttrium-Anteil wieder ab. Warum der proteingebundene Phosphat-Anteil nicht konstant bleibt, dürfte - wie für die HSA-Abhängigkeit bereits diskutiert- an der Absättigung des Transferrins in diesem Konzentrationsbereich liegen. Dieser identische Bindungsmechanismus von Yttrium im HSA- und Transferrinmolekül legt nahe, daß im Serum nicht ein bestimmtes Protein den Transport für Yttrium übernimmt, sondern durch die Unspezifität der Bindung eine Verteilung von Yttrium auf viele Plasmaproteine erfolgt. Die Hauptträgerfunktion dürfte allein aus statistischen Gründen Albumin zukommen, da Albumin das häufigste Protein des menschlichen Blutplasmas darstellt (HSA: 44 g/L gegenüber Transferrin: 3 g/L).

4.5.3 Bindung von $[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)}$ und $[^{32}\text{P}]\text{PO}_4$ an apo-Transferrin in Abhängigkeit von der apo-Transferrin-Konzentration

In Analogie zu der in Abschnitt 4.4.4 beschriebenen Bindungsstudie der simultanen Bindung von Y(III) und Phosphat an HSA in Abhängigkeit von der HSA-Konzentration wurde anstelle von HSA- die apo-Transferrin-Konzentration unter sonst gleichen Bedingungen variiert. Dies sollte einen Vergleich der Bindungskapazität beider Serumproteine für Y(III) und Phosphat ermöglichen. Die Ergebnisse für apo-Transferrin sind in Abb.4.14 zusammengestellt, wobei hier wiederum auf die $[^{32}\text{P}]\text{PO}_4$ -Bindungswerte verzichtet wurde, da sie mit den $[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)}$ -Werten nahezu übereinstimmen. Zum Vergleich sind die in Abschnitt 4.4.4 diskutierten Werte für HSA in der Abb.4.14 mit aufgetragen.

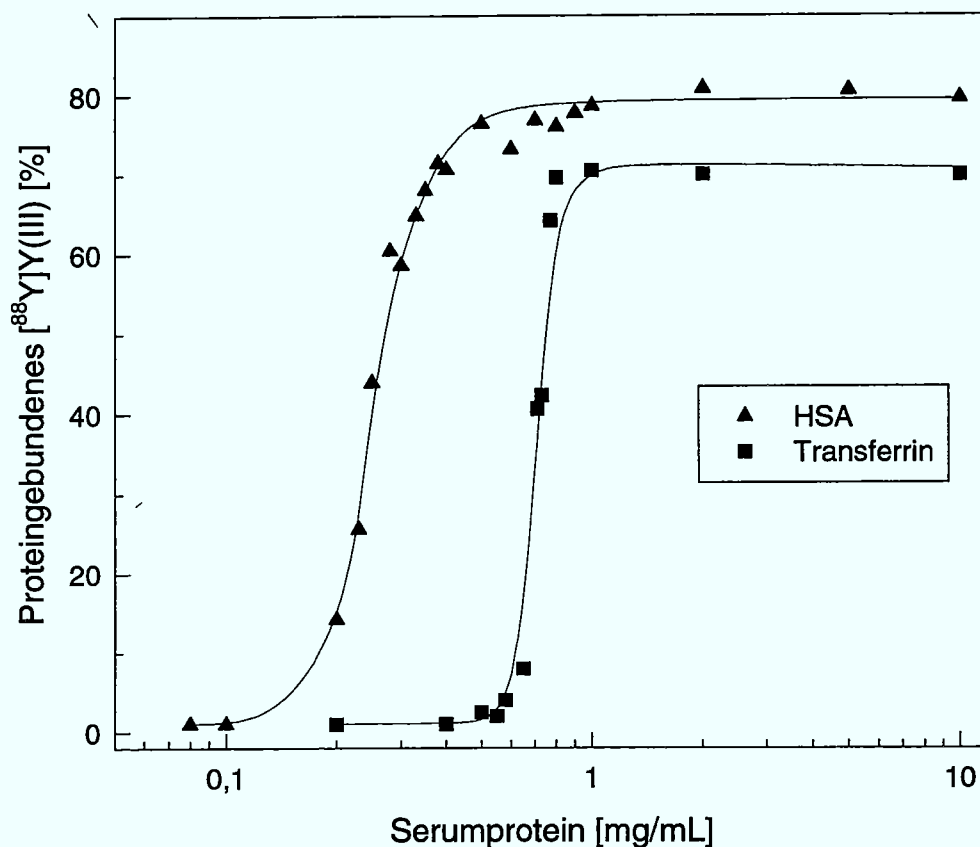


Abb.4.14: Bindung von $[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)}$ an apo-Transferrin bzw. HSA in Abhängigkeit von der apo-Transferrin- bzw. HSA-Konzentration;
Y(III)-Träger- $1 \cdot 10^{-4}$ M, PO_4 -Träger $1 \cdot 10^{-4}$ M, $I = 0,15$ M, pH 7,0, Inkubationszeit 23 h.

Wie aus der Abb.4.14 ersichtlich, ist die Bindungskapazität für die gleichzeitige Bindung für Yttrium und Phosphat bei einer Transferrin-Konzentration von 0,8 mg/mL erschöpft, was sich durch einen drastischen Bindungsabfall für

$[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)}$ beim Übergang zu geringeren Transferrin-Konzentrationen bemerkbar macht. Im Fall von HSA erfolgt diese Bindungsabnahme erst bei niedrigeren Protein-Konzentrationen von ca. 0,5 mg/mL. Des weiteren fällt auf, daß die Proteinbindungswerte von $[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)}$ für Transferrin nach Erreichen des Plateaus bei ungefähr 0,8 mg/mL (also bei Proteinüberschuß) um ca. 10-12% unter den Werten für HSA liegen. Letzteres läßt auf eine höhere Stabilität der ternären Komplexverbindung bzw. des Kolloids im HSA- im Vergleich zum Transferrin-System schließen. Eine Abschätzung der Anzahl der Bindungsstellen im Transferrin-Molekül für die simultane Bindung von Yttrium und Phosphat ergibt ungefähr 7 Bindungsstellen. Im HSA-Molekül liegen mit 14 etwa doppelt so viele Bindungsstellen vor. Dies bedeutet, daß trotz des höheren Molekulargewichts von Transferrin (79550) gegenüber HSA (69000) im Fall einer ternären Komplexverbindung die Anzahl der Bindungsstellen im Transferrin-Molekül deutlich geringer ist als im HSA-Molekül.

4.5.4 Bindung von $[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)}$ und $[^{32}\text{P}]\text{PO}_4$ an Polyglutaminsäure in Abhängigkeit vom Y(III)-Trägergehalt

Da sich gezeigt hatte, daß Serumproteine in der Lage sind, Yttrium und Phosphat simultan zu binden, sollte sich durch den Einsatz von Polyaminosäuren, die jeweils nur eine bestimmte potentiell zur Bindung der YPO_4 -Spezies befähigte Aminosäurefunktion tragen, die für die Bindung im Proteinmolekül verantwortlichen funktionellen Gruppen spezifizieren lassen. Als hierfür geeignete Modellpolyaminosäuren wurde Poly-D-glutaminsäure mit Carboxylat-Funktionen und Poly-L-lysin mit Amino-Funktionen ausgewählt.

Mit Poly-L-lysin konnte keine Bindung von $[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)}$ ($1 \cdot 10^{-4}$ M) und $[^{32}\text{P}]\text{PO}_4$ ($1 \cdot 10^{-4}$ M) an das Makromolekül detektiert werden. Vielmehr wurde festgestellt, daß sich schwerlösliches YPO_4 gebildet hatte, da die gesamte ^{88}Y - und ^{32}P -Aktivität nur mit EDTA-Lösung von der Säule gewaschen und ein Großteil der Aktivität nicht mit der Proteinlösung auf die Säule übertragen werden konnte, sondern im Inkubationsgefäß zurückblieb. Aus diesem Ergebnis läßt sich folgern, daß Amino-Funktionen von Polyelektrolyten oder Proteinen nicht in der Lage sind, Yttrium und Phosphat simultan zu binden. Demgegenüber wurde in ersten orientierenden Versuchen mit Polyglutaminsäure eine simultane Bindung von $[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)}$ und $[^{32}\text{P}]\text{PO}_4$ an den Polyelektrolyten gefunden, so daß dieses System einer genaueren Untersuchung unterzogen wurde. Auch hier wurden die polyaminosäuregebundenen $[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)}$ - bzw. $[^{32}\text{P}]\text{PO}_4$ -Anteile in Abhängigkeit von der Y(III)-Trägerkonzentration mittels Gel- und Ultrafiltration bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb.4.15 zusammengefaßt.

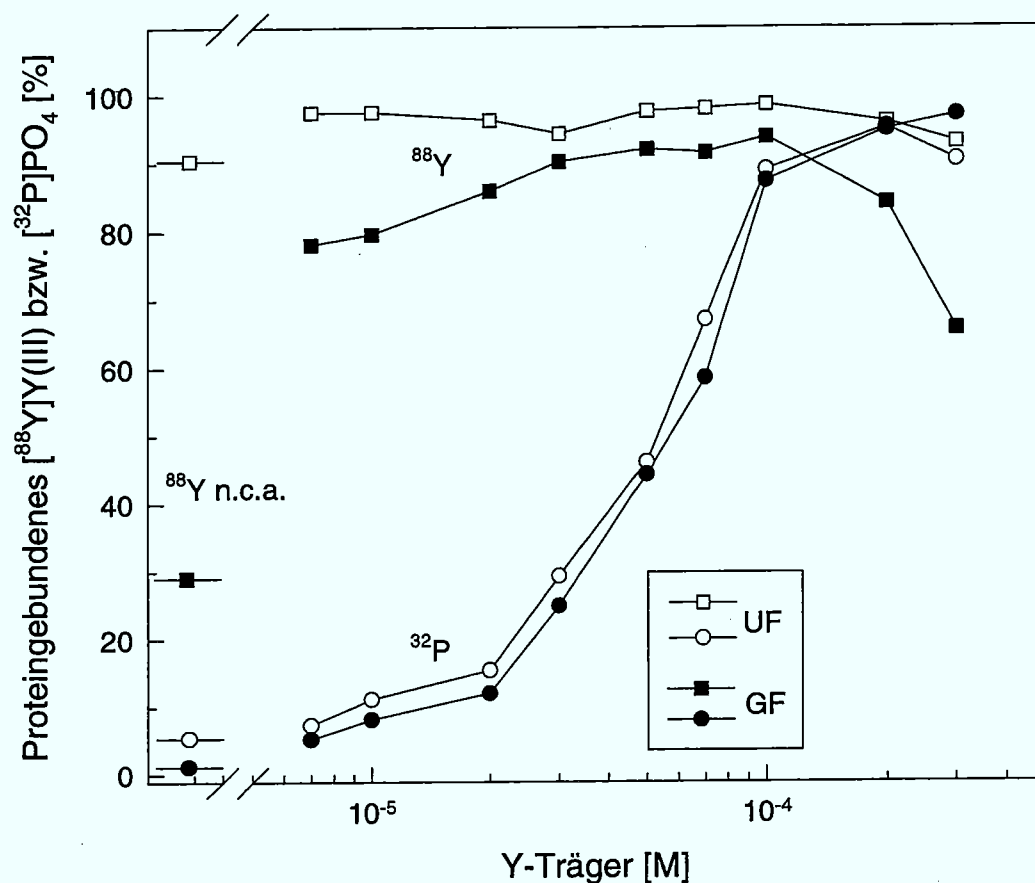


Abb.4.15: Bindung von $[^{88}\text{Y}]\text{Y}(\text{III})$ und $[^{32}\text{P}]\text{PO}_4$ an Poly-D-glutaminsäure in Abhängigkeit vom Y(III)-Trägergehalt; Poly-D-glutaminsäure 1 mg/mL, PO_4 -Träger $1 \cdot 10^{-4}$ M, $I = 0,15$ M, pH 7,0, Inkubationszeit 22 h.

Für Polyglutaminsäure wird das schon von den Biopolymeren HSA und apo-Transferrin her bekannte Bindungsverhalten vorgefunden. Der einzige Unterschied besteht darin, daß Yttrium auch ohne Phosphat-Zusatz aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen mit den vielen negativ geladenen Carboxylat-Gruppen mit hoher Stabilität an Polyglutaminsäure gebunden wird (GF: 70%; UF: 92%). Die Steigerung der Y(III)-Trägerkonzentration in der Mischung aus Polyglutaminsäure und Phosphat führt zu einer proportionalen Erhöhung des polyaminosäuregebundenen $[^{32}\text{P}]\text{PO}_4$ -Anteils. Das bedeutet, daß die Tendenz zur Ausbildung einer ternären Verbindung zwischen Y(III), Phosphat und Polyglutaminsäure stärker ist als die Bindung von Y(III) über elektrostatische Wechselwirkungen. Yttrium und Phosphat werden wieder im Verhältnis von 1:1 an Polyglutaminsäure gebunden. Nach Erreichen des Maximums des polyaminosäuregebundenen Phosphat-Anteils bei ca. $1 \cdot 10^{-4}$ M wird der gleiche Kurvenverlauf wie bei der Messung der Yttrium-Trägerdosis-Abhängigkeit für Vollblutserum (Abschnitt

4.5.1) gefunden. Der polyaminosäuregebundene Phosphat-Anteil bleibt sowohl bei der Ultra- als auch bei der Gelfiltration nahezu konstant. Bei der Gelfiltration nimmt der polyaminosäuregebundene Y(III)-Anteil bei Y(III)-Träger-Überschuß ab, wohingegen er bei der Ultrafiltration konstant bleibt. Dieses Bindungsverhalten läßt sich wieder darauf zurückführen, daß die im Vergleich zu der ternären Verbindung schwachen binären elektrostatischen Wechselwirkungen, die durch die relativ hohe Yttrium-Konzentration noch abgeschwächt werden, mit Hilfe der Gelfiltration nicht detektierbar sind.

Das Fazit dieser Studie ist, daß auch hier eine ternäre Verbindung zwischen Makromolekül, Y(III) und Phosphat gebildet wird. Aus den Ergebnissen und dem Vergleich mit Polylysin geht hervor, daß die Carboxylat-Gruppen die für die simultane Bindung von Yttrium und Phosphat verantwortlichen Gruppen sind. Die Frage, ob ein kolloidales System oder eine echte ternäre Komplexverbindung vorliegt, kann allerdings auch aus dieser Studie nicht abschließend entschieden werden, da auch die negativ geladene Polyglutaminsäure die Rolle eines elektrosterischen Stabilisators für ein YPO_4 -Kolloid übernehmen könnte. Poly-L-lysin als netto positiv geladenes Makromolekül wäre demgegenüber nicht in der Lage, ein negativ geladenes disperses YPO_4 -System zu stabilisieren. Vielmehr würde es durch Ladungsneutralisierung eine Ausflockung des negativ geladenen dispersen Systems induzieren und letztlich die Bildung von schwerlöslichem YPO_4 bewirken.

4.6 Einfluß dreiwertiger Metalle auf die Bindung von $[\text{}^{32}\text{P}]\text{PO}_4$ an HSA

In den bisherigen Studien konnte gezeigt werden, daß Yttrium synergistisch mit Phosphat an HSA, apo-Transferrin und Polyglutaminsäure gebunden wird. Von Interesse war daher, ob andere dreiwertige Metalle aus der III. Hauptgruppe und der Lanthanidenreihe ebenfalls über die Fähigkeit verfügen, ternäre Verbindungen mit Phosphat und HSA einzugehen. In dieser Studie wurden 10 mg/mL HSA-Lösung mit jeweils $1 \cdot 10^{-4}$ der inaktiven Me(III) - und $1 \cdot 10^{-4}$ M $[\text{}^{32}\text{P}]\text{PO}_4$ -Trägerlösung inkubiert. Gemessen wurde anschließend nicht der proteingebundene Me(III) -Anteil, sondern der an HSA gebundene $[\text{}^{32}\text{P}]\text{PO}_4$ -Anteil. Dabei zeigte sich, daß die Anwesenheit von Me(III) -Ionen nicht zwangsläufig -wie für Yttrium bereits nachgewiesen- zu einer Bindungserhöhung von Phosphat an HSA führt. Vielmehr wurde gefunden, daß ein Zusammenhang zwischen dem Ionenradius des Me(III) -Ions und dem Einfluß auf die Bindung von Phosphat an HSA hergestellt werden kann. Werden die Proteinbindungswerte für $[\text{}^{32}\text{P}]\text{PO}_4$ gegen die Ionenradien der Me(III) -Ionen aufgetragen, erhält man die in Abb.4.16 dargestellte Abhängigkeit. Bei den

hier verwendeten Ionenradien handelt es sich um effektive Kristall-Ionenradien für die Koordinationszahl 6, die auf strukturellen Daten, empirischen Bindungsstärken zu Bindungslängen-Verhältnissen und Auftragungen von (a) Radius gegen Volumen, (b) Radius gegen Koordinationszahl und (c) Radius gegen Oxidationszahl basieren [62].

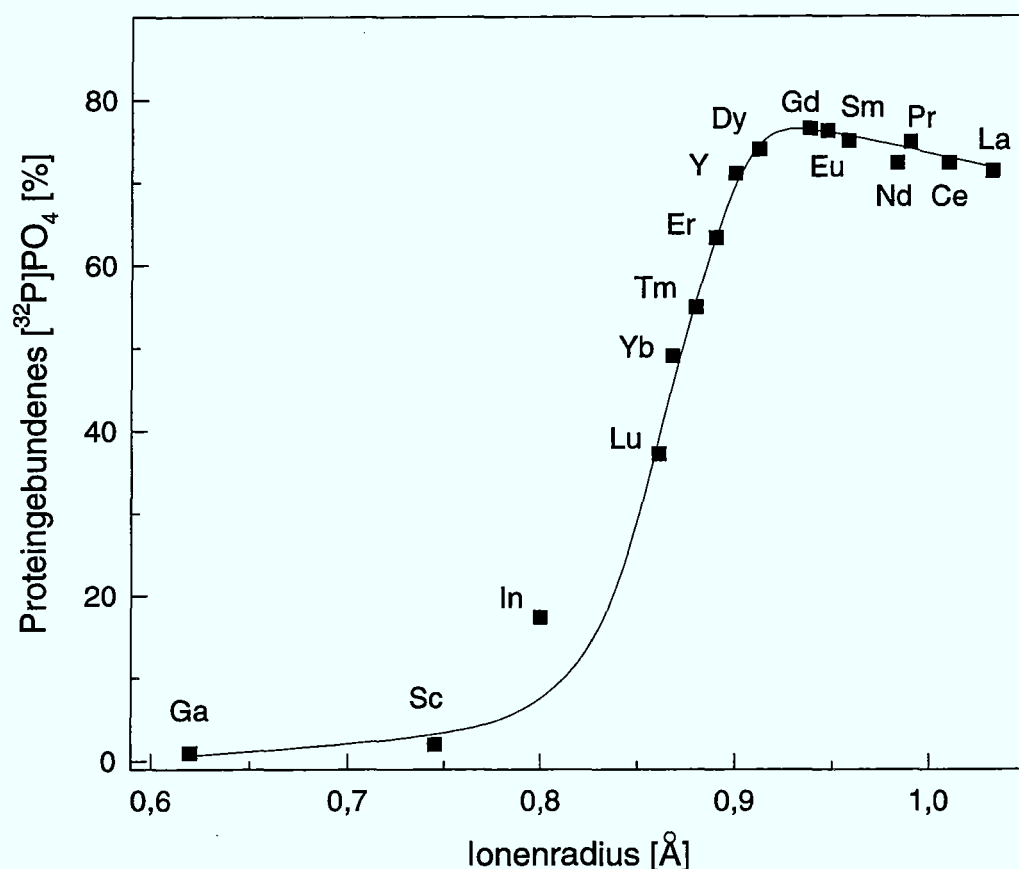


Abb.4.16: Proteingebundenes $[^{32}\text{P}]\text{PO}_4$ in Abhängigkeit vom Ionenradius des Me(III) -Ions; HSA 10 mg/mL, Me(III) -Träger $1 \cdot 10^{-4}$ M, PO_4 -Träger $1 \cdot 10^{-4}$ M, pH 7,0, $I = 0,15$ M, Inkubationszeit 22 h.

Die „kleinsten“ dreiwertigen Metalle Gallium und Scandium beeinflussen das Bindungsverhalten von Phosphat an HSA in keiner Weise: der proteingebundene $[^{32}\text{P}]\text{PO}_4$ -Anteil bleibt unter 1%. Erst bei Indium mit einem Ionenradius von 0,83 Å steigt der proteingebundene Phosphat-Anteil auf ca. 15% an. Beim Übergang zu den größeren Me(III) -Ionen der Lanthaniden nehmen die Phosphat-Proteinbindungswerte von den schweren Lanthaniden bis zu den Übergangslanthaniden exponentiell auf ca. 80% zu, um dann beim Übergang zu den leichten Lanthaniden wieder etwas abzunehmen. Das Maximum der Bindungsaffinität wird ungefähr bei Gadolinium, Samarium und Europium erreicht, die den Übergangslanthaniden zuzurechnen sind.

Dieses Bindungsverhalten dürfte weniger auf einen spezifischen Einfluß des Ionenradius zurückzuführen sein, in dem Sinne, daß größere Molekülverbände zwischen Me(III) und Phosphat besser in die Bindungsstellen an HSA passen. Vielmehr dürfte die unterschiedliche Bindungsaffinität auf der Tendenz der Me(III)-Ionen beruhen, mit geringer werdendem Ionenradius stabilere Komplexe auszubilden. So besitzt der Citrat-Komplex von Gallium mit $\log K_1 = 10,02$ eine im Vergleich zum Lanthan mit $\log K_1 = 7,63$ [116] um mehr als zwei Größenordnungen höhere Komplexstabilität. Als Konkurrenz zur Bildung der ternären Komplexverbindung tritt demnach bei den Me-Ionen mit geringerem Ionenradius eine direkte binäre Komplexbildung, ohne synergistischen Phosphat-Einfluß mit anderen in der Lösung vorhandenen Anionen z.B. Citrat (Verwendung von nicht dialysiertem HSA) in den Vordergrund.

Die Anwesenheit von Citrat ermöglicht eine gute Simulation der Verhältnisse im Blut, da dort gleichfalls Konkurrenzliganden und vor allem Citrat vorliegen, die eine Verdrängung des Me(III)-Ions aus seiner ternären Verbindung bewirken bzw. die Bildung der ternären Verbindung verhindern können.

4.7 Bindung von [^{67}Ga]Ga(III) an Serumproteine

4.7.1 Bindung von [^{67}Ga]Ga(III) an HSA

Als Prototyp für die Metalle der dritten Hauptgruppe, die, wie in Abschnitt 4.6 gezeigt wurde, keine Tendenz zur Ausbildung einer ternären Verbindung zeigen, wurde Gallium ausgewählt. Analog zu Yttrium wurde zuerst der Einfluß verschiedener endogener Anionen auf die Bindung von [^{67}Ga]Ga(III) an das Modellprotein HSA untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab.4.4 zusammengefaßt.

Tab.4.4: Einfluß endogener Anionen auf die Bindung von [^{67}Ga]Ga(III) an HSA; HSA 10 mg/mL, Ga(III)-Träger $5 \cdot 10^{-5}$ M, Anionen-Träger $1 \cdot 10^{-4}$ M, I = 0,15 M, pH ca. 5, Inkubationszeit 1 h.

Anion	^{67}Ga -HSA-Bindung	Anion-HSA-Bindung
Chlorid	34%	-
Bicarbonat	35,1%	-
Citrat	31%	-
Sulfat	33,7%	< 1%(a)
Phosphat	35,5%	< 1 %(b)

(a) Sulfat mit [^{35}S]SO₄ (b) Phosphat mit [^{32}P]PO₄ markiert.

Die Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit den Befunden aus Abschnitt 4.6. Sowohl Phosphat als auch die anderen Anionen üben keinen synergistischen Einfluß auf die Bindung des dreiwertigen Radiometalls an HSA aus. Im Unterschied zu Yttrium, wo nur mit Phosphat eine deutliche Bindungserhöhung für ^{88}Y an HSA gefunden wird (vgl. Tab.4.2), ist in Gegenwart aller hier untersuchten Anionen ein signifikanter ^{67}Ga -Anteil von 31-35,5% an HSA gebunden. Die Bindung von ^{67}Ga erweist sich als sehr stabil, da der proteingebundene ^{67}Ga -Anteil in Gegenwart von Citrat mit einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-3}$ bzw. $1 \cdot 10^{-2}$ M (was einem 20- respektive 200-fachen Citrat-Überschuß entspricht) nur auf 24,1 bzw. 15,1% reduziert wird. Warum trotz dieser hohen Affinität von Ga(III) zu HSA der proteingebundene ^{67}Ga -Anteil nicht noch höher ist, liegt wahrscheinlich an der hohen Hydrolyseempfindlichkeit von Gallium. Ga(III) neigt schon bei niedrigen pH-Werten zur Ausbildung von schwerlöslichem $\text{Ga}(\text{OH})_3$, da das Löslichkeitsprodukt von $\text{Ga}(\text{OH})_3$ mit $\log K_L = -39,1$ im Vergleich z.B. zu $\text{Y}(\text{OH})_3$ ($\log K_L \approx -22$) außerordentlich gering ist [116]. In der Proteinlösung dürfte es demzufolge neben der Bindung an HSA zu einem großen Teil zur Bildung von schwerlöslichem $\text{Ga}(\text{OH})_3$ gekommen sein, welches dann für eine Bindung an HSA nicht mehr zur Verfügung steht. Für diese Annahme spricht auch die Tatsache, daß in einer weiteren Meßserie, in der der pH der Proteinlösung auf 7,0 eingestellt wurde, zwar immer noch ein Teil des Galliums proteingebunden vorliegt, jedoch die ^{67}Ga -Proteinbindungswerte deutlich niedriger sind. Alles in allem zeigen diese Untersuchungen, daß Phosphat keinen Effekt auf die Bindung von ^{67}Ga an HSA aufweist und demzufolge ein von Yttrium abweichender Bindungsmechanismus vorliegen muß.

4.7.2 Bindung von ^{67}Ga an apo-Transferrin

In dieser Studie stand der Einfluß von Phosphat auf die Bindung von Gallium an apo-Transferrin im Vordergrund. Tab. 4.5 faßt die Ergebnisse für jeweils geträgerte und trägerfreie ^{67}Ga -Lösungen mit und ohne Phosphat hinsichtlich des proteingebundenen ^{67}Ga -Anteils zusammen.

Tab.4.5: Bindung von ^{67}Ga an apo-Transferrin;
apo-Transferrin 1 mg/mL, I = 0,15 M, pH 7,0, Inkubationszeit 1 h.

Zusammensetzung der Inkubationslösung	^{67}Ga -Bindung an apo-Transferrin [%]
n.c.a. ^{67}Ga ohne PO_4	48,3
n.c.a. ^{67}Ga mit PO_4 ($1 \cdot 10^{-4}$ M)	43,3
^{67}Ga ($1 \cdot 10^{-4}$ M) ohne PO_4	20,5
^{67}Ga ($1 \cdot 10^{-4}$ M) mit PO_4 ($1 \cdot 10^{-4}$ M)	4,0

Wie aus der Tabelle ersichtlich, hat Phosphat keinen bindungssteigernden Effekt für Ga(III) an apo-Transferrin. Trägerfreies ^{67}Ga wird in starkem Ausmaß an apo-Transferrin gebunden, wobei der Phosphat-Zusatz keine Auswirkungen auf die ^{67}Ga -Bindung hat. Die Bindungswerte für geträgertes ^{67}Ga sind hingegen vor allem in Gegenwart von Phosphat sehr gering. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß Ga(III) durch Phosphat in gewissem Umfang sogar von seiner Bindungsstelle im Transferrinmolekül durch die Bildung von schwerlöslichem GaPO_4 ($\log K_L = -21$) entfernt wird. Gunasekara findet in seinen Untersuchungen über das Verhalten von ^{67}Ga gegenüber Serumproteinen gleichfalls eine Dissoziation des Ga-Transferrin-Komplexes durch Phosphat [127]. Hervorzuheben ist, daß die hier beschriebenen Bindungsstudien nur bedingt Rückschlüsse auf das quantitative Bindungsverhalten von ^{67}Ga zulassen. Ziel dieser Studie war nur, qualitativ aufzuzeigen, daß Ga(III) und Y(III) trotz ihrer ähnlich hohen Affinität zu Phosphat unterschiedliche Bindungsmechanismen aufweisen. Gallium wird hier im Gegensatz zu Yttrium (vgl. Abschnitt 4.6) ohne Bindungsbeteiligung von Phosphat an das Biopolymer gebunden.

4.8 Bindung von Radiolanthaniden an HSA

4.8.1 Einfluß von Phosphat auf die Bindung von Radiolanthaniden an HSA

Um nicht nur einen indirekten Hinweis über das proteingebundene ^{32}P (vgl. Abschnitt 4.6) auf das Bindungsverhalten von Lanthaniden an HSA zu erhalten, wurden Bindungsstudien mit Radiolanthaniden* durchgeführt. Diese sollten eine direkte Aussage über den Assoziationsgrad der Radiolanthanide an HSA ermöglichen. Die Zusammensetzungen der zu analysierenden Radiolanthanid-Proteinlösungen wurde hinsichtlich Phosphatzusatz und Radiolanthanid variiert. Dabei wurden als Vertreter für die schweren ^{169}Yb , für die mittleren ^{145}Sm und ^{159}Dy und für die leichten Lanthanide ^{139}Ce ausgewählt. Die Ergebnisse sind in Abb.4.17 als Balkendiagramme dargestellt.

* Diese Experimente wurden im Labor für Kernprobleme des Vereinigten Instituts für Kernforschung in Dubna, Rußland im Rahmen der DFG-Sachmittelbeihilfe Ro 985/2-1 der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) ausgeführt.

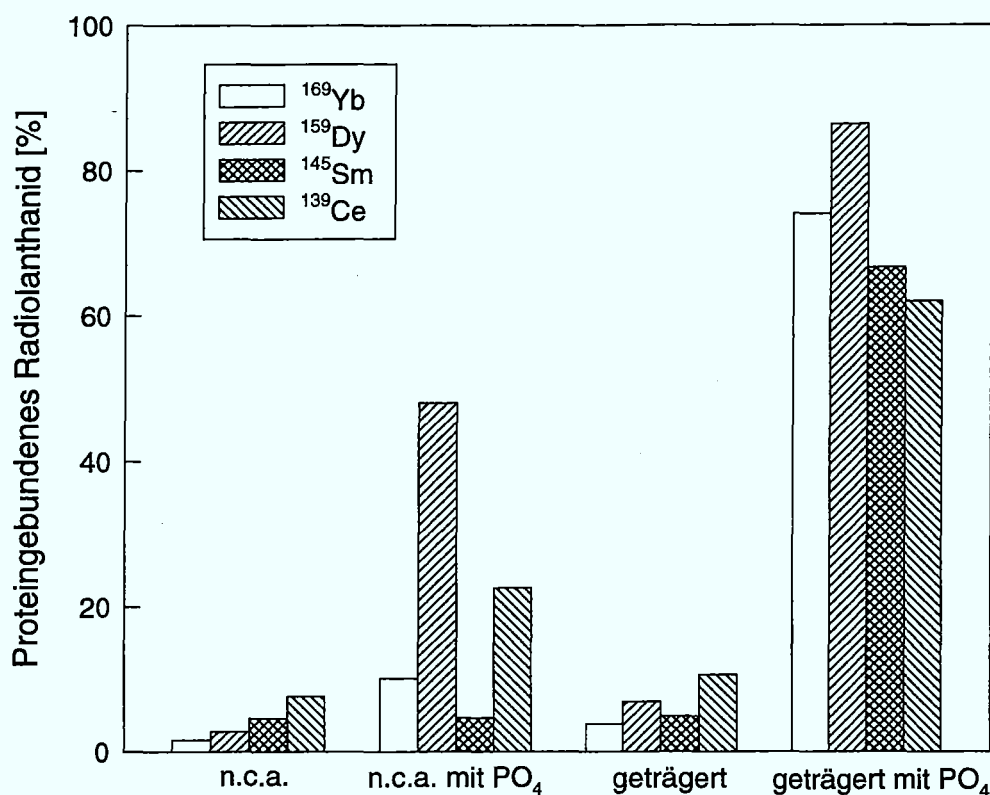


Abb.4.17: Proteinbindungswerte für verschiedene Radiolanthanide in trägerfreier Form ohne und mit PO₄-Träger ($1 \cdot 10^{-4}$ M) und geträgerter Form ($1 \cdot 10^{-4}$ M) ohne und mit PO₄-Träger ($1 \cdot 10^{-4}$ M), I = 0,15 M; pH 7,0; Inkubationszeit 22 h.

Eindeutig und wiederum ein klarer Beleg für die ausgeprägte Tendenz von Radiolanthaniden, zusammen mit Phosphat eine Bindung an HSA einzugehen, sind die hohen Proteinbindungswerte im Fall der geträgerten Radiolanthanide mit Phosphatzusatz. Dysprosium, welches formal schon den schweren Lanthaniden zuzuordnen ist, weist die höchsten Proteinbindungswerte auf, wohingegen die Werte der anderen drei Lanthanide Ytterbium, Samarium und Cer deutlich niedriger sind. Die hier erzielten Ergebnisse lassen sich größtenteils mit den in Abschnitt 4.6 dargestellten Zusammenhängen in Einklang bringen. Jedoch hätte der proteingebundene Ytterbium-Wert, vorausgesetzt es liegt auch hier eine 1:1-Bindung von Yb(III) und Phosphat an HSA vor, einen etwas geringeren HSA-Bindungswert aufweisen müssen. Die anderen Elemente reihen sich hingegen innerhalb der Fehlergrenzen, die bei diesem Experiment etwas höher zu veranschlagen sind, in die Systematik der Proteinbindungsaffinität in Abhängigkeit vom Ionenradius ein.

Die trägerfreien Radiolanthanide zeigen nur eine sehr geringe Neigung, mit HSA eine binäre Verbindung einzugehen. Dies gilt sowohl für den Fall der trägerfreien Lanthanide als auch für den Fall des isotonen Trägerzusatzes. Wird den träger-

freien Radiolanthaniden Phosphat zugesetzt, so wird im Fall von ^{145}Sm eine moderate Proteinbindungserhöhung gefunden, wohingegen im Fall von ^{159}Dy , ^{169}Yb und ^{139}Ce die Proteinbindungswerte signifikant erhöht werden. Das kann u.U. ein Hinweis auf eine geringe Kontamination der trägerfreien Radionuklide ^{159}Dy , ^{169}Yb und ^{139}Ce mit La(III)-Träger sein, der infolge des Abtrennungsprozesses vom Tantal-Target durch Mitfällung mit La(III) eingeschleppt wurde.

4.8.2 Einfluß von Phosphat auf die Simultanbindung von ^{139}Ce , ^{143}Pm und ^{173}Lu an HSA

In einem Simultanexperiment mit ^{139}Ce , ^{143}Pm und ^{173}Lu stand das unterschiedliche Bindungsverhalten der schweren Lanthanide gegenüber den leichten Lanthaniden im Vordergrund. Darüber hinaus sollte untersucht werden, wie sich der Zusatz von Phosphat auf das Bindungsverhalten der Radiolanthanide an HSA auswirkt. Ohne Phosphat wird das in Abb.4.18 dargestellte Aktivitätsverteilungsmuster erhalten.

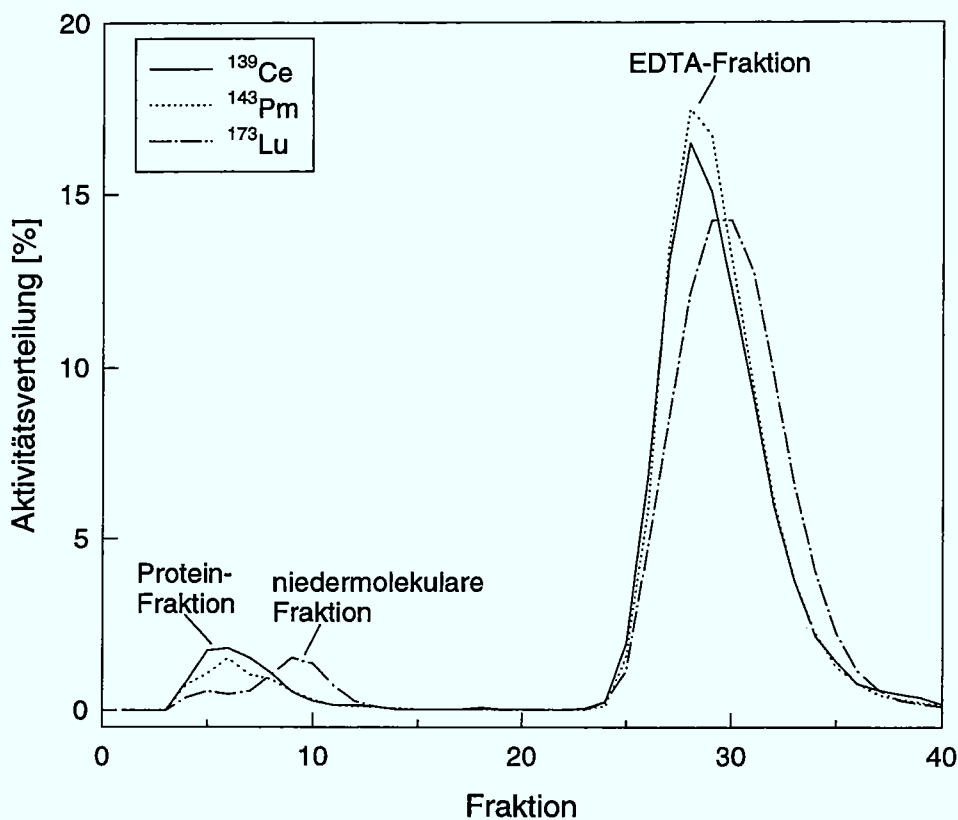


Abb.4.18: Gelchromatogramm von trägerfreiem ^{139}Ce , ^{143}Pm und ^{173}Lu nach Inkubation mit HSA ohne Phosphat; HSA 10 mg/mL, $I = 0,15\text{ M}$, pH 7,0, Inkubationszeit 22 h, Sephadex G-25 Säule, Eluens: TRIS-acetat pH 7, nach 20. Fraktion 5%-ige EDTA-Lösung.

Erwartungsgemäß sind die proteingebundenen Radiolanthanid-Anteile sehr gering. Während bei ^{139}Ce und ^{143}Pm noch ein Protein-Peak zu erkennen ist, wird ^{173}Lu praktisch nicht an HSA gebunden. Demgegenüber erscheint ein kleiner Teil der ^{173}Lu -Aktivität im niedermolekularen Bereich, was seine im Vergleich zu den leichten Lanthaniden höhere Affinität zu den in der Lösung vorhandenen Komplexbildnern wie z.B. Citrat unterlegt. Die Hauptaktivität befindet sich bei allen drei Radiolanthaniden in der EDTA-Fraktion.

In Gegenwart von Phosphat ergibt sich ein ganz anderes Aktivitätsverteilungsmuster, das in Abb.4.19 dargestellt ist.

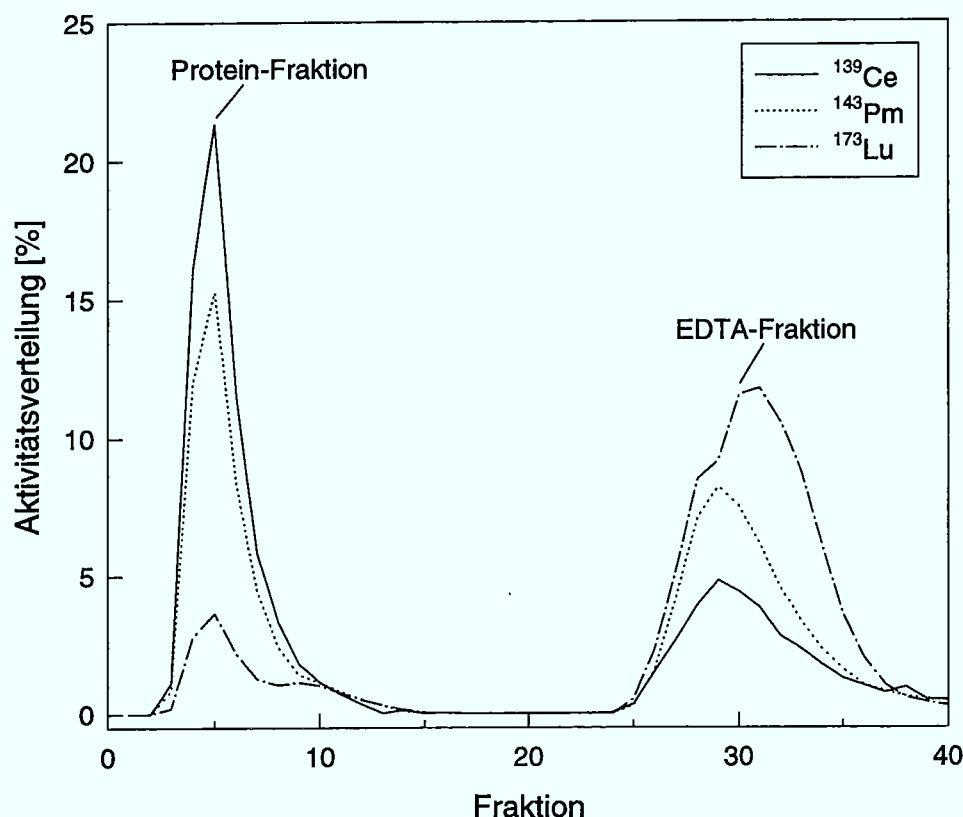


Abb.4.19: Gelchromatogramm von trägerfreiem ^{139}Ce , ^{143}Pm und ^{173}Lu nach Inkubation mit HSA und Phosphat; HSA 10 mg/mL, PO_4 -Träger $1 \cdot 10^{-4}$ M, $I = 0,15$ M, pH 7,0, Inkubationszeit 22 h; Sephadex G-25 Säule, Eluens: TRIS-acetat pH 7, nach 20. Fraktion 5%-ige EDTA-Lösung.

In der Reihe $^{139}\text{Ce} > ^{143}\text{Pm} > ^{173}\text{Lu}$ wird eine Abnahme des proteingebundenen Anteils von Radiolanthanid gefunden (^{139}Ce : 63%; ^{143}Pm : 46%, ^{173}Lu : 11%). Dies könnte wiederum ein Hinweis auf eine leichte Kontamination der trägerfreien Radiolanthanide mit La(III)-Träger sein. Insbesondere für Cer ist die Gefahr einer Lanthan-Kontamination sehr groß, da Cer und Lanthan einen nahezu gleichen lo-

nenradius aufweisen und aufgrund der daher nahezu identischen chemischen Eigenschaften schwer voneinander zu trennen sind. Andererseits belegt diese Studie wieder eindeutig, auch wenn Lanthan-Träger vorhanden gewesen sein sollte, daß Lutetium als schweres Lanthanid ein von den leichten Lanthaniden abweichendes Bindungsverhalten aufweist. Somit zeigt sich auch hier, daß die Tendenz zur Bildung einer ternären Verbindung unter Mitwirkung von Phosphat bei den schweren Lanthaniden schwächer ausgeprägt ist als bei den leichten bzw. Übergangslanthaniden.

4.9 Vergleich zwischen dem in vivo-Verhalten von [^{88}Y]Chlorid, [^{88}Y]Y(III)-Citrat und der ternären Verbindung zwischen [^{88}Y]Y(III), [^{32}P]PO₄ und HSA

Die bisherigen Ergebnisse lassen vermuten, daß Y(III) in vivo in verschiedenen physikochemischen Zustandsformen existiert. Zum einen dürfte im Blut eine niedermolekulare Yttrium-Fraktion vorliegen, die durch Komplexierung mit endogenem Citrat gebildet wird, zum anderen läßt sich eine ternäre Verbindungsbildung mit anorganischem Phosphat und Serumproteinen annehmen. Daher wurde das in vivo-Verhalten der beiden Verbindungen in Mäuseversuchen getestet. Aus Vergleichsgründen wurde zudem die Organkinetik von trägerfreiem [^{88}Y]Chlorid aufgenommen. Neben der Organverteilung wurde auch eine Analyse der Serumproben zur Evaluierung des proteingebundenen ^{88}Y -Anteils durchgeführt.

Organverteilung

[^{88}Y]Chlorid und [^{88}Y]Y(III)-Citrat unterscheiden sich in ihrer Organverteilung nur geringfügig. Dies unterstreicht die Annahme, daß der Transport von Radioyttrium im Blut teilweise in mit Citrat komplexierter Form vollzogen wird. Im Fall von [^{88}Y]Chlorid wird ein Teil des Radiometalls von körpereigenem Citrat chelatisiert und in dieser Form zu den Retentionskompartimenten transportiert, während dieser Umkomplexierungsprozeß im Fall von [^{88}Y]Y(III)-Citrat nicht erfolgt, da Yttrium bereits exogen mit Citrat komplexiert ist. Die ternäre Verbindung zwischen [^{88}Y]Y(III), [^{32}P]PO₄ und HSA weist dagegen ein gänzlich anderes Organverteilungsmuster auf. Die genauen Organkinetiken der drei Verbindungen sind in Abb.6.1 - 6.3 im Anhang zusammengefaßt.

Die gravierendsten Unterschiede in der Organverteilung der beiden Verbindungen nach 4 h zeigen sich in den Knochen und in der Leber bzw. Milz, den Organen des RES. Trägerfreies [^{88}Y]Chlorid und die [^{88}Y]Y(III)-Citrat-Verbindung weisen eine hohe Affinität zum Knochengewebe auf (ca. 25 bzw. 20% ID/g) mit geringer Ablagerung in der Leber (bei beiden ca. 5-6% ID/g). Im Fall der ternären Verbindung

findet sich demgegenüber ein erheblicher Prozentsatz der injizierten ^{88}Y -Aktivität in der Leber (70-80% ID/g) und der Milz (20-30% ID/g), wohingegen die ^{88}Y -Aktivitätsablagerung in den Knochen mit maximal 3% ID/g sehr gering ist. Ein weiterer augenfälliger Unterschied zwischen den drei Verbindungen besteht in der Geschwindigkeit der Elimination der radioaktiven Verbindungen aus dem Blut. Während die Entfernung der ternären Verbindung aus dem Blutplasma exponentiell erfolgt, wird sowohl für trägerfreies ^{88}Y Chlorid als auch für ^{88}Y Y(III)-Citrat eine langsamere Eliminationsgeschwindigkeit beobachtet (vgl. Abb.4.20).

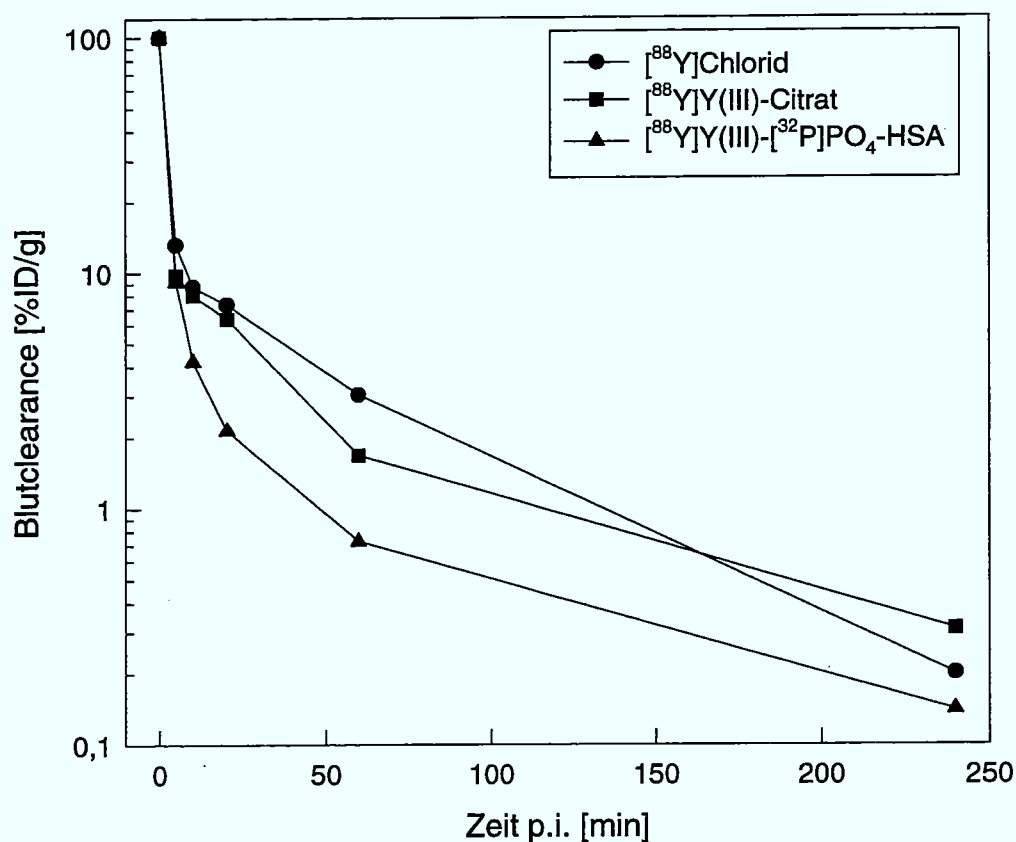


Abb.4.20: Blutclearance von ^{88}Y Chlorid, ^{88}Y Y(III)-Citrat und der ternären Verbindung zwischen ^{88}Y Y(III), ^{32}P PO₄ und HSA in NMRI-Mäusen.

Analyse der Serumproben

Auch eine Gelfiltrationsanalyse der Serumproben der Mäuse zeigt signifikante Unterschiede zwischen ^{88}Y Y(III)-Citrat und der ternären Verbindung zwischen ^{88}Y Y(III), ^{32}P PO₄ und HSA. Die serumproteingebundenen ^{88}Y -Anteile zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Injektion sind in Tab.4.6 zusammengefaßt.

Tab.4.6: Serumproteingebundener ^{88}Y -Anteil in Serumproben von NMRI-Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion von $[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)-Citrat}$ bzw. $[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)-}[^{32}\text{P}]\text{PO}_4\text{-HSA}$.

Zeit nach Injektion [min]	^{88}Y proteingebunden [%] ($[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)-Citrat}$)	^{88}Y proteingebunden [%] ($[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)-}[^{32}\text{P}]\text{PO}_4\text{-HSA}$)
5	57,2	97,4
10	64,2	97,7
20	67,3	98
60	51,5	98,2

Im Fall von $[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)-Citrat}$ liegt der ^{88}Y -Anteil, der an Serumproteine gebunden ist, in dem Bereich, der auch bei der Serumprobe eines Knochenmetastasen-Patienten (Abschnitt 4.2) gefunden wird. Im Fall der ternären Verbindung ist der proteingebundene ^{88}Y -Anteil mit nahezu 98% ausgesprochen hoch und übertrifft alle bisher mittels Gelfiltration bestimmten ^{88}Y -Proteinbindungswerte, die maximal bei 82% liegen. Dies deutet darauf hin, daß die einmal im Serum gebildete ternäre Verbindung außerordentlich stabil ist und nur geringfügige Dissoziationstendenzen aufweist. Demgegenüber wird $[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)-Citrat}$ zwar auch an Serumproteine in ternärer Form gebunden. Jedoch bildet es in Abhängigkeit von der Gleichgewichtslage auch eine niedermolekulare ^{88}Y -Fraktion aus. Daraus resultiert der im Vergleich zur ternären Verbindung deutlich niedrigere (um ca. 30-45%) proteingebundene ^{88}Y -Anteil.

4.10 Vergleich des in vivo-Verhaltens von $[^{86}\text{Y}]\text{Citrat}$ und $[^{86}\text{Y}]\text{EDTMP}$ mittels PET-Studien an Patienten

Die PET-Studien der Patienten mit multiplen Knochenmetastasen demonstrieren, daß sowohl nach i.v.-Applikation von $[^{86}\text{Y}]\text{Citrat}$ als auch von $[^{86}\text{Y}]\text{EDTMP}$ eine hohe ^{86}Y -Aktivitätsakkumulation in den Knochenmetastasen gefunden wird [128]. Im Mittel wird ein Verhältnis von 8:1 zwischen Metastase und normalem Knochen erreicht. Unterschiede zeigen sich jedoch in den Aufnahmekinetiken beider Komplexe. Während der Akkumulationsprozeß für ^{86}Y in der Metastase im Fall des EDTMP-Komplexes bereits nach 1,5 h abgeschlossen ist, erreicht die ^{86}Y -Aktivitätskonzentration des Citrat-Komplexes erst nach 2 Tagen ihr Maximum. Weiterhin fällt auf, daß die Aktivitätskonzentration in den Knochenmetastasen der mit $[^{86}\text{Y}]\text{Citrat}$ behandelten Patienten um etwa 50% über der mit $[^{86}\text{Y}]\text{EDTMP}$ behandelten Patientengruppe liegt. Dokumentiert wird das unterschiedliche Bioverhalten beider Verbindungen auch durch die unterschiedlich schnelle Eliminationsgeschwindigkeit der Komplexe aus dem Blut, die in Abb.4.21 dargestellt ist.

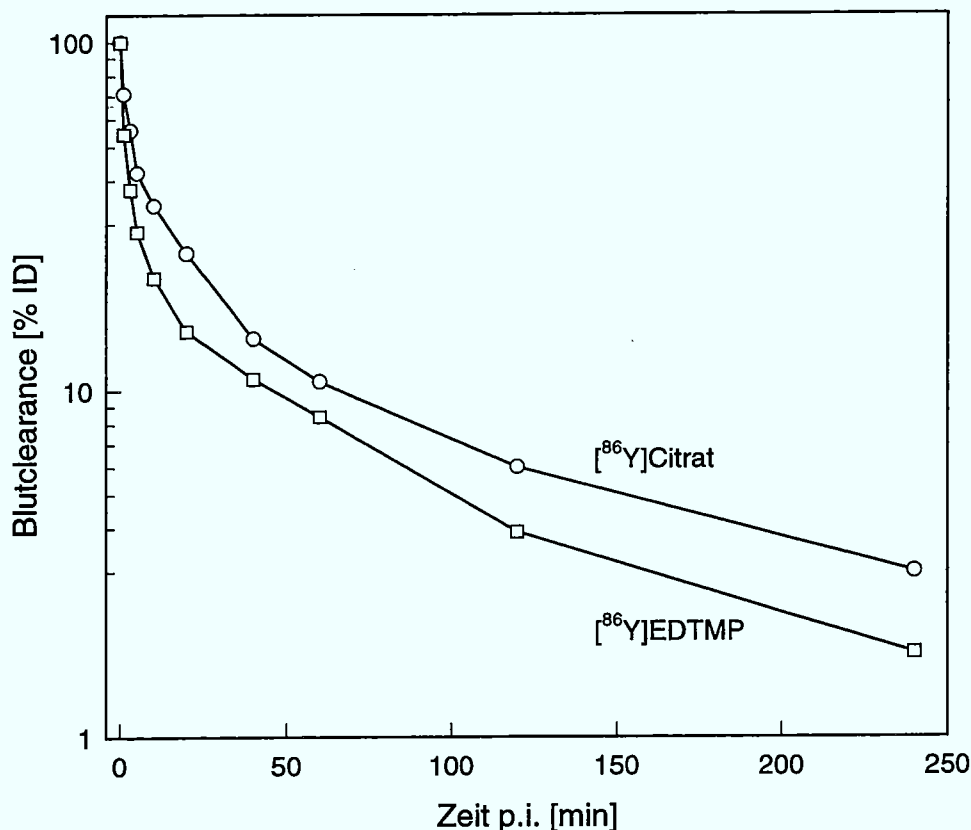


Abb.4.21: Blutclearance-Kinetik für [⁸⁶Y]Citrat und [⁸⁶Y]EDTMP gemittelt über jeweils 5 Patienten.

Die Blutclearance-Kinetik beider Komplexe erfolgt zweiphasig, wobei auf die schnelle Elimination der Komplexe eine langsamere Blutclearance-Rate folgt. Nach der schnellen Elimination der Komplexe in den ersten 10 min nach der Injektion des Citrat-Komplexes liegen im Mittel noch ca. 34% der injizierten ⁸⁶Y-Aktivität im Blutpool vor, während für den EDTMP-Komplex im Mittel nur noch etwa 15,6% im Blut gefunden werden. Die Halbwertszeit der schnellen Eliminationsphase beträgt für [⁸⁶Y]Citrat $T_{\alpha 1/2} = 4,2$ min und für [⁸⁶Y]EDTMP $T_{\alpha 1/2} = 1,9$ min. Danach schließt sich eine langsamer ablaufende Blutclearance an, deren Halbwertszeiten $T_{\beta 1/2} = 98$ min für [⁸⁶Y]Citrat und $T_{\beta 1/2} = 64$ min für [⁸⁶Y]EDTMP betragen.

Die unterschiedlichen Eliminationsgeschwindigkeiten lassen sich gut mit dem bereits in Abschnitt 4.2 beschriebenen Verhalten der beiden Komplexe im Blut erklären. Während der [⁸⁶Y]EDTMP-Komplex kaum Wechselwirkungen mit Serumkomponenten eingeht, sind die Interaktionen von [⁸⁶Y]Citrat mit diesen bedeutend stärker, und nehmen daher wesentlichen Einfluß auf das in vivo-Verhalten von ⁸⁶Y. Kurz nach Applikation des Citrat-Komplexes entsteht durch Umkomplexierungsprozesse eine proteingebundene ⁸⁶Y-Fraktion unter Beteiligung von Phosphat, die a.) eine hohe Leberakkumulation und b.) wahrscheinlich die langsamere Eliminati-

ongeschwindigkeit im Vergleich zu EDTMP zur Folge hat. $[^{86}\text{Y}]\text{EDTMP}$ liegt demgegenüber als intakter Komplex im Blutpool vor und wird als solcher über die Nieren ausgeschieden. Dies konnte auch durch die in Abschnitt 4.2 beschriebenen Serumanalysen bewiesen werden. Jedoch kommt es auch beim $[^{86}\text{Y}]\text{EDTMP}$ -Komplex mit zunehmender Verweilzeit im Blut zu einer Zunahme an proteingebundenem ^{86}Y von 1,1% (nach 5 min p.i.) bis auf 6,7% (120 min. p.i.), was mittels Gelfiltration nachgewiesen wurde. Das könnte u.U. die nach 10 min langsamere Blutclearance von $[^{86}\text{Y}]\text{EDTMP}$ erklären.

Auch die Gesamtkörperretentionen für $[^{86}\text{Y}]\text{Citrat}$ und $[^{86}\text{Y}]\text{EDTMP}$ spiegeln die unterschiedlichen in vivo-Stabilitäten beider Komplexe wieder, die in Abb.4.22 wiedergegeben sind.

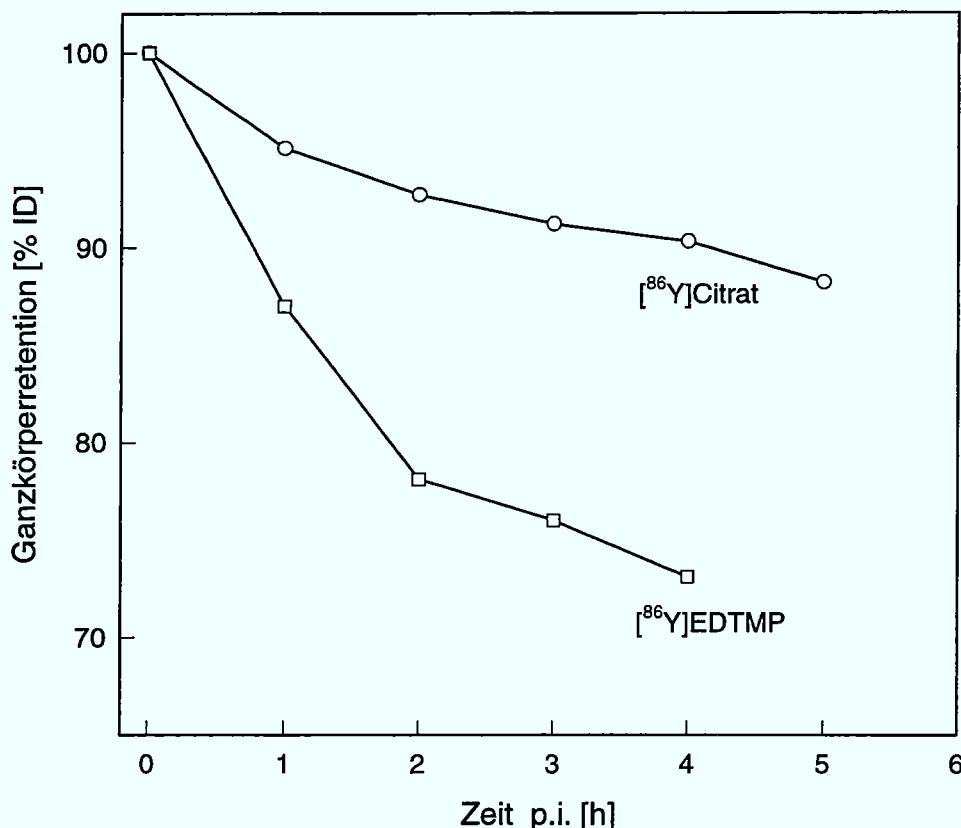


Abb.4.22: Gesamtkörperretentions-Kinetik für $[^{86}\text{Y}]\text{Citrat}$ und $[^{86}\text{Y}]\text{EDTMP}$ gemittelt über jeweils 5 Patienten.

Erwartungsgemäß ist die Gesamtkörperretention für den EDTMP-Komplex aufgrund seiner höheren Ausscheidungsrate wesentlich niedriger als für $[^{86}\text{Y}]\text{Citrat}$. Eine Analyse einer Urinprobe mittels Gelfiltration zeigte weiterhin, daß $[^{86}\text{Y}]\text{EDTMP}$ als intakter Komplex im Urin vorliegt, da charakteristisch für stabile Komplexe ein Peak im niedermolekularen Bereich, der die gesamte ^{86}Y -Aktivität

enthält, gefunden wurde. Im Gegensatz dazu wird im Fall von [^{86}Y]Citrat, wie schon oben erwähnt, ein großer Teil der ^{86}Y -Aktivität bereits nach 2-3 min in der Leber akkumuliert, so daß vor allem hieraus eine höhere Gesamtkörperretention resultiert. Die Leber übernimmt hierbei wahrscheinlich eine Art Depotfunktion, indem sie das gespeicherte ^{86}Y nach einer gewissen Zeit wieder in den Blutkreislauf abgibt, so daß das Aktivitätsmaximum in den Metastasen erst nach geraumer Zeit erreicht wird.

4.11 Adsorption von [^{86}Y]Y(III)-Citrat, [^{86}Y]Y(III)-EDTA und [^{86}Y]Y(III)-EDTMP an Hydroxylapatit

[^{90}Y]Citrat wird häufig in der palliativen Therapie schmerzhafter multipler Knochenmetastasen eingesetzt. [^{90}Y]EDTMP spielt hingegen bisher in der klinischen Praxis keine Rolle, obgleich es sich in Tierstudien [129] und in der im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Evaluierung am Menschen mit ^{86}Y [128] dem Citrat-Komplex als überlegen erwiesen hat. Charakteristisch für pathologisch veränderte Knochenregionen, die einen gestörten Knochenstoffwechsel aufweisen, ist ein hoher Anteil an Hydroxylapatit geringer Dichte und hoher Hydratisierung [130,131]. Während beim [^{90}Y]Citrat-Komplex allein eine Trans-Chelierung des Yttriums mit nachfolgender Ca^{2+} -Substitution in der Hydroxylapatitstruktur angenommen wird [132,133], wird die hohe Anreicherung von ^{90}Y in Form des EDTMP-Komplexes auf eine Wechselwirkung der Phosphonat-Gruppen mit der Oberfläche des Hydroxylapatits zurückgeführt [99]. Von Interesse war daher eine Untersuchung dieser Komplexe im Hinblick auf ihren Einbaumechanismus in die anorganische Knochenmatrix. Die Liganden unterscheiden sich voneinander zum einen durch ihre chemische Struktur und zum anderen durch ihre um einige Größenordnungen differierenden Komplexstabilitäten mit Yttrium ($\log K_1 \approx 20$ ([Y(EDTMP)] [116]) und $\log \beta_2 = 11,2$ ([Y(Cit) $_2$] $^{3-}$) [117]). Als dritter Ligand wurde EDTA in die Untersuchungen einbezogen, da er mit EDTMP vergleichbare Komplexstabilitäten mit Yttrium ($\log K_1 = 18,08$ [116]) aufweist, jedoch als komplexierende Gruppen anstelle von Phosphonat-Gruppen Carboxylat-Gruppen trägt. Dadurch wurde eine Prüfung der Auswirkungen von Komplexstabilität und chemischer Struktur der Liganden auf den Einbaumechanismus von Yttrium in die Hydroxylapatitstruktur möglich. Konkret wurden hierzu Adsorptionsmessungen der Komplexe mit kristallinem Hydroxylapatit (CaP) als in vitro-Knochenmodell [134,135] durchgeführt. Dazu wurde die [^{86}Y]Y(III)-Komplekonzentration bei konstanter Hydroxylapatitkonzentration variiert. Tatsächlich konnten prinzipielle Effekte nachgewiesen werden, die in Abb.4.23 in einer Auftragung des an CaP adsorbierten [^{86}Y]Y(III)-Anteils gegen

die Komplexkonzentration (bezogen auf Yttrium; Yttrium:Ligand-Verhältnis 1:3) zusammengefaßt sind.

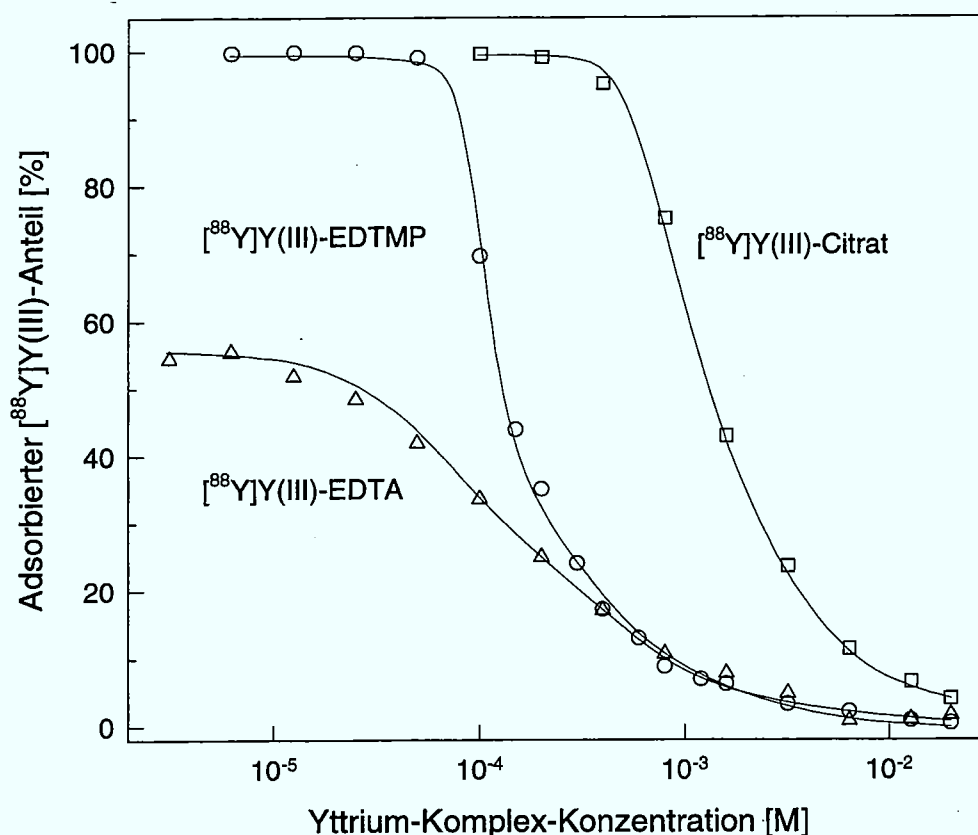


Abb.4.23: Adsorption von [⁸⁸Y]Y(III) an Hydroxylapatit in Abhängigkeit von der [⁸⁸Y]Y(III)-Citrat-, [⁸⁸Y]Y(III)-EDTMP- und [⁸⁸Y]Y(III)-EDTA-Komplexkonzentration.

[⁸⁸Y]Y(III)-Chlorid, dessen Adsorptionswerte in obiger Abbildung nicht mit dargestellt sind, wird über den gesamten hier untersuchten Konzentrationsbereich komplett von CaP adsorbiert. Für alle Chelatkomplexe wird hingegen gefunden, daß eine Erhöhung der Ligandenkonzentration in jedem Fall zu einer Reduktion des apatitgebundenen [⁸⁸Y]Y(III)-Anteils führt. Während für [⁸⁸Y]Y(III)-Citrat und [⁸⁸Y]Y(III)-EDTMP bei niedriger Ligandenkonzentration ($[L] < 1 \cdot 10^{-4}$ M) die ⁸⁸Y-Aktivität vollständig von CaP adsorbiert wird, verbleiben bei EDTA selbst bei niedrigsten Komplexkonzentrationen von $1 \cdot 10^{-7}$ M (Wert in obiger Abb.4.23 nicht mit aufgeführt) noch ca. 50% in nicht an CaP adsorbierter Form in Lösung. [⁸⁸Y]Y(III)-Citrat und [⁸⁸Y]Y(III)-EDTMP weisen hierbei zueinander parallel verschobene Adsorptionskurven auf, wobei die Affinität des Citrat-Komplexes zu CaP bei $[L] > 1 \cdot 10^{-4}$ M höher ist als für den EDTMP-Komplex.

Zur Quantifizierung der Befunde ist in Abb.4.24 die Menge an adsorbiertem Komplex in μmol gegen die insgesamt in der Lösung vorhandene Komplexmenge in

μmol in einer doppelt logarithmischen Skala aufgetragen, wobei von der Annahme ausgegangen wird, daß die an CaP adsorbierte $^{88}\text{Y}(\text{III})$ -Aktivität durch den intakt gebliebenen Komplex repräsentiert wird. Diese Annahme ist, wie weiter unten näher erläutert wird, nicht ganz richtig, jedoch für eine Veranschaulichung der Ergebnisse geeigneter.

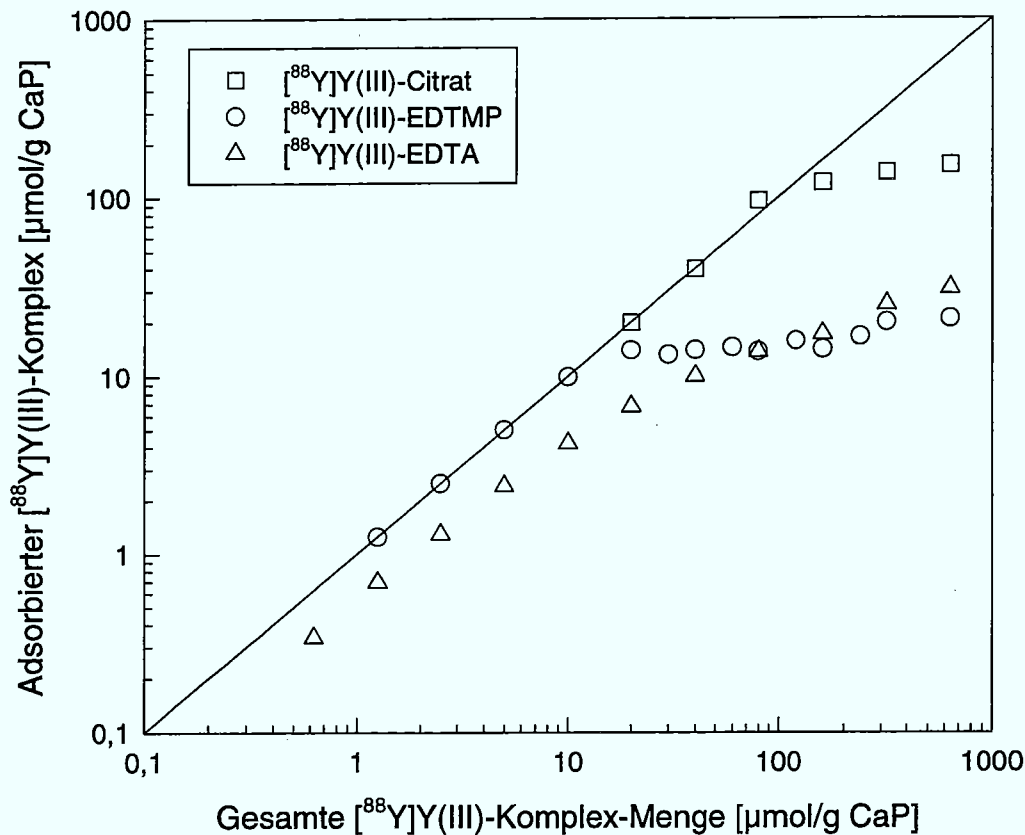


Abb.4.24: Adsorbierter $^{88}\text{Y}(\text{III})$ -Komplex-Anteil in Abhängigkeit von der Gesamt- $^{88}\text{Y}(\text{III})$ -Komplex-Konzentration (Modellannahme vgl. Text).

Die vollständige Adsorption des jeweiligen Komplexes an Hydroxylapatit wird durch die berechnete durchgezogene Linie wiedergegeben. Aus der Abb.4.24 ergibt sich, daß die Adsorption von $^{88}\text{Y}(\text{III})$ -Citrat und $^{88}\text{Y}(\text{III})$ -EDTMP zumindest im unteren Konzentrationsbereich vergleichbar ist, nur daß, wie oben bereits erwähnt, $^{88}\text{Y}(\text{III})$ -Citrat auch bei höheren Komplexkonzentrationen quantitativ an CaP adsorbiert wird. Bei beiden Komplexen wird bei unterschiedlichen Adsorptionswerten eine Sättigung des CaP mit dem jeweiligen Komplex erreicht, was sich durch eine Abweichung vom linearen Adsorptionsverhalten bemerkbar macht. Für $^{88}\text{Y}(\text{III})$ -Citrat ist die Komplexadsorption ab ca. $120 \mu\text{mol/g CaP}$ und für $^{88}\text{Y}(\text{III})$ -EDTMP ab ca. $14 \mu\text{mol/g CaP}$ nicht mehr vollständig. Bei einer Oberfläche von ca. $50 \text{ m}^2/\text{g CaP}$ heißt das, daß pro nm^2 CaP-Oberfläche ungefähr ein $^{88}\text{Y}(\text{III})$ -Citrat-Komplex adsorbiert wird, wohingegen ein $^{88}\text{Y}(\text{III})$ -EDTMP-Komplex ungefähr ei-

nen Raumbedarf von 6 nm^2 besitzt. Vergleicht man die Ergebnisse des $[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)}$ -EDTMP-Komplexes im unteren Konzentrationsbereich mit Literaturdaten von $[^{153}\text{Sm}]\text{Sm(III)}$ -EDTMP [135], in der eine Abweichung vom linearen Adsorptionsverhalten bei ca. $13 \text{ } \mu\text{mol/g CaP}$ beobachtet wird, so ergibt sich eine gute Übereinstimmung. Die in der Literatur angegebenen Adsorptionswerte bleiben jedoch nicht, wie hier gefunden, nach Erreichen des Plateaus nahezu konstant, sondern steigen mit zunehmender Komplexkonzentration stetig bis auf ca. $49 \text{ } \mu\text{mol/g CaP}$ an (maximal adsorbierte Komplexmenge im eigenen Versuch: $32 \text{ } \mu\text{mol/g CaP}$). Dies mag auf andere experimentelle Bedingungen zurückführbar sein. So wurde beispielsweise in den Literaturversuchen auf eine pH-Adaption verzichtet, die jedoch einerseits für die Ionenaustauschkapazität des Hydroxylapatits (Protonierung bzw. Deprotonierung von Phosphat-Gruppen) und andererseits für den Protonierungsgrad und damit den Ladungszustand des Komplexes von großer Bedeutung sein sollte, und das Adsorptionsverhalten der Komplexe entsprechend modifizieren kann.

Die Adsorption von $[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)}$ -EDTA unterscheidet sich auch bei niedrigen Konzentrationen grundlegend von den beiden anderen Komplexen. Hier wird zwar auch ein linearer Adsorptionsanstieg gefunden, jedoch erfolgt keine quantitative Adsorption. Dadurch ist die $[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)}$ -EDTA-Adsorptions-Gerade im Vergleich zu $[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)}$ -Citrat und $[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)}$ -EDTMP zu niedrigeren Adsorptionswerten parallel verschoben. Auch der Übergang in den Sättigungsbereich vollzieht sich bei einem niedrigeren Adsorptionswert von $6,7 \text{ } \mu\text{mol/g CaP}$, obgleich für EDTA mit EDTMP vergleichbare Adsorptions-Maximalwerte von ca. $30 \text{ } \mu\text{mol/g CaP}$ gefunden werden.

Dies belegt eine intrinsische Affinität des EDTMP-Liganden für Hydroxylapatit, der offensichtlich auf der CaP-Oberfläche adsorbiert wird. Gestützt wird dies durch die höhere Stabilitätskonstante von Y-EDTMP ($\log K_1 \approx 20$) im Vergleich zu Y-EDTA ($\log K_1 = 18,08$) [116], so daß im Fall einer Dissoziation des Komplexes mit anschließendem Einbau in die Apatit-Struktur der EDTA-Komplex Vorteile aufgrund seiner geringeren Stabilität aufweisen müßte. Ein weiterer Beleg findet sich in der bereits oben erwähnten Literatur, in der mit ^{14}C markiertem EDTMP und ^{153}Sm nachgewiesen werden konnte, daß Sm-EDTMP als intakter Komplex von CaP adsorbiert wird. Für Y-Citrat erscheint hingegen ein Trans-Chelierungsmechanismus wahrscheinlicher, da die Stabilität des Citrat-Komplexes mit $\log K_1 = 7,8$ gegenüber EDTMP und EDTA deutlich geringer ist, so daß es zu einer Dissoziation des Komplexes mit nachfolgendem Einbau von $[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)}$ in die Apatitstruktur kommt. Dies erklärt auch die höheren CaP-Adsorptionswerte, da Citrat selbst keine Affinität zu CaP haben sollte.

4.12 Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse und Schlußfolgerung

4.12.1 Ergebnisse und Vergleich mit der Literatur

Für die Bindungsstudien mit Serumproteinen wurden Humanserumalbumin (HSA) und apo-Transferrin als Modellserumproteine eingesetzt und die Reaktion des Bindungsverhaltens von Radioyttrium auf die Variation unterschiedlicher experimenteller Parameter untersucht. Anstelle des β^- -Strahlers ^{90}Y wurde das leichter detektierbare ^{88}Y benutzt. Als Meßmethoden wurden Gel- (GF) und Ultrafiltration (UF) gewählt. Beide lieferten zwar qualitativ die gleichen Ergebnisse, unterschieden sich jedoch in ihren Absolutproteinbindungswerten. Dies liegt daran, daß jede Methode einen mehr oder weniger starken Eingriff in die sensitiven Bindungsgleichgewichte zwischen Metall-Ionen und Proteinen zur Folge hat und die Proteinbindungswerte dementsprechend modifiziert werden*.

In den Bindungsstudien kristallisierte sich heraus, daß Phosphat einen entscheidenden Einfluß auf die Bindung von Y(III) an HSA besitzt. Während andere endogene Anionen keine Auswirkungen auf das Bindungsverhalten von Y(III) an HSA haben, steigert Phosphat die Bindung von Yttrium an HSA von ungefähr 5% auf ca. 80% (GF) bzw. 20% auf 95% (UF). Der Nachweis eines solchen Verbindungstyps kann als wesentlichstes bioanorganisches Ergebnis dieser Arbeit bezeichnet werden. Eine simultane Bindung von Yttrium mit Phosphat an ein anderes Serumprotein konnte auch für apo-Transferrin nachgewiesen werden.

Die notwendige Beteiligung eines speziellen Anions an der Metall-Protein-Bindung ist für nuklearmedizinische Anwendungen um so bedeutsamer, weil Phosphat ein essentieller Bestandteil des Bluts ist. In mit ^{32}P markiertem Vollblutserum konnte erwartungsgemäß ebenfalls eine simultane Bindung von Yttrium und Phosphat an die hochmolekulare Serumproteinfraktion detektiert werden.

Als Bindungsmechanismus wurde ein synergistischer Effekt von Phosphat auf die Bindung zwischen Yttrium und HSA bzw. Proteinen postuliert. Die Beteiligung eines endogenen Anions an der Bindung von Yttrium an HSA bzw. Serumproteine generell stellt einen prinzipiell neuen Aspekt dar, da sich das in der Literatur (vgl. Tab.1.2 Abschnitt 1.5) beschriebene Bindungsverhalten von Yttrium bzw. Lanthaniden an Serumproteine zumeist auf binäre Verbindungsmodelle stützt, in denen

*Alle analytischen Methoden zur Bestimmung von Me-Protein-Bindungsverhältnissen, die auf der Separation von nicht-gebundenem und proteingebundenem Metall basieren, weisen damit in gewisser Hinsicht eine Parallele zur Heisenbergschen Unschärferelation auf, wenngleich hier Systeme großer Dimensionen involviert sind: „Der Akt der Messung beeinflusst die Meßgröße.“

das Me(III)-Ion über funktionelle Gruppen des Proteins gebunden wird. Für eine direkte Wechselwirkung von Yttrium- bzw. Lanthanid-Ionen mit den Proteinmolekülen allein ließen sich zwar Anhaltspunkte finden, doch dürften diese relativ schwachen Bindungen unter physiologischen Bedingungen (hohe Phosphatkonzentration) eine allenfalls untergeordnete Rolle spielen.

Während für die Bindung von Y(III) an Proteine in Gegenwart von Phosphat damit zum ersten Mal ein kooperativer Bindungsmechanismus nachgewiesen wurde, sind ternäre Systeme unter Beteiligung synergistischer Anionen für andere Proteinsysteme bereits seit längerem bekannt. Das bekannteste physiologische, ternäre System ist wohl der Komplex zwischen Transferrin, Fe(III) und Bicarbonat [108]. Die Funktion von Bicarbonat kann von organischen Säuren, wie z.B. Oxalat oder Malonat, jedoch nicht von anorganischen Anionen wie Phosphat, Sulfat oder Nitrat übernommen werden. In Abwesenheit geeigneter Anionen wird keine spezifische Bindung von Fe(III) an Transferrin beobachtet [111]. Die Koordinationssphäre des Fe(III) im Proteinkomplex wird dabei von zwei Hydroxyl-Gruppen von Tyrosin, einer Imidazol-Gruppe von Histidin und einer Carboxylat-Gruppe der Asparaginsäure und dem synergistischen Anion gebildet. Das synergistische Anion ist zusätzlich über Guanidinium-Gruppen von Arginin oder Amino-Gruppen von Lysin an Transferrin gebunden [136]. Der Beitrag des Anions zur Stabilität der Metall-Transferrinbindung besteht wahrscheinlich primär darin, daß es aufgrund seiner negativen Ladung destabilisierende Wechselwirkungen zwischen Me(III)-Ion und Protein verhindert. Über eine Bindung von Lanthaniden an Transferrin wird mehrfach berichtet, jedoch sind die dort gefundenen Komplexbildungskonstanten um ein vielfaches geringer als für den Fe-Transferrin-Komplex (z.B. Nd(III)-Tf $\log K = 6,09$ im Vergleich zu Fe(III)-Tf $\log K = 24$) [137]. Darüber hinaus ist nicht bekannt, ob die Bindung an Transferrin auch hier unter Beteiligung eines synergistischen Anions abläuft.

In Arbeiten von Wunderlich [138], die das Bindungsverhalten verschiedener ^{169}Yb -Chelate (z.B. Citrat und NTA) an HSA untersuchen, wird gleichfalls eine ternäre Bindung postuliert, die jedoch von grundlegend anderer Natur ist. So soll der gesamte Komplex ohne Dissoziations- und Umkomplexierungsprozesse über ionische bzw. van der Waalssche Wechselwirkungen an HSA gebunden und in dieser proteingebundenen Form transportiert werden. Eigene Untersuchungen in dieser Richtung konnten keine Belege für diese These erbringen, obgleich ionische Wechselwirkungen zwischen Me(III)-Komplex und Serumproteinen nicht auszuschließen sind. Diese unspezifischen und reversiblen Wechselwirkungen sind jedoch so schwach, daß sie mittels Gel- und Ultrafiltration nicht detektierbar sind und

demzufolge für das pharmakokinetische Verhalten starker Lanthanid(III)-Komplexe von untergeordneter Bedeutung sein sollten. Bei schwachen Lanthanid(III)-Komplexen überwiegt hingegen, in Gegenwart physiologisch relevanter Liganden- und Anionen-Konzentrationen, die Bildung einer ternären Verbindung zwischen Lanthanid(III)-Ion, Phosphat und Serumproteinen. Diese weist im Vergleich zur schwachen reversiblen ionischen Bindungskraft zwischen Me(III) -Komplex und Protein eine weitaus höhere Bildungstendenz auf.

4.12.2 Quantifizierung der Bindungsverhältnisse

Die simultane Bindung von Yttrium und Phosphat an HSA, apo-Transferrin und die Serumproteinfraktion des Vollblutserums erfolgt im Verhältnis Yttrium : Phosphat = 1 : 1. Im Albuminmolekül stehen ca. 14 Bindungsstellen und im Transferrinmolekül nur etwa 7 für eine - wie auch immer geartete - Y(III)-PO_4 -Spezies zur Verfügung. Durch Konkurrenzmessungen mit Komplexliganden, deren $[\text{YL}_n]$ -Stabilitätskonstanten aus der Literatur bekannt sind, konnte die Stabilitätskonstante des ternären Mischkomplexes für HSA mit $\log \beta = 10,9$ ($I = 0,15 \text{ M}$, $T = 25^\circ\text{C}$) abgeschätzt werden.

Diese ternäre Verbindung ist über einen weiten physiologischen pH-Bereich stabil. Erst oberhalb von pH 8,5 bzw. unterhalb von pH 5,5 wird eine Abnahme von HSA-gebundenem Yttrium und Phosphat detektiert, was im sauren Gebiet auf konformative Änderungen und Blockierung von potentiellen Bindungsstellen im Albuminmolekül und im alkalischen auf die Bildung von Y(OH)_3 bzw. YPO_4 zurückzuführen ist. Die Bindungsabnahme im sauren Bereich kann jedoch auch darauf beruhen, daß mit der zunehmenden H^+ -Ionenkonzentration eine Abnahme des an der Bindung beteiligten Phosphat-Ions durch Protonierung verbunden ist. Des weiteren ließ sich zeigen, daß die Bildung der ternären Verbindung relativ schnell erfolgt, so daß nach in vivo-Applikation von Y(III) schon nach kurzer Zeit, in Abhängigkeit von der Gleichgewichtslage, ein erheblicher Teil an Serumproteine gebunden in Form einer ternären Mischverbindung vorliegt, und diese Form folglich für die weitere Verteilung im Körper von erheblicher Relevanz ist.

Eine Ausweitung der Studien auf andere dreiwertige Metalle ergab, daß offensichtlich ein Zusammenhang zwischen dem Ionenradius des Metalls und der Tendenz zur Ausbildung einer ternären Verbindung zwischen Me(III) , Phosphat und HSA besteht. Me(III) -Ionen der III. Haupt- und Nebengruppe, wozu auch die Lanthanide gehören, besitzen aufgrund abgeschlossener Elektronenschalen eine ähnliche Koordinationschemie, da die Ligandenbindung primär elektrostatischer Natur ist. Die Bindungsstärke ist dabei vom Ionenradius abhängig. Während die leichten

Lanthanide und vor allem Übergangslanthanide eine ausgeprägte Neigung zur Bildung einer ternären Verbindung aufweisen, wird diese mit abnehmendem Ionenradius zunehmend schwächer. Dieser durch indirekte Messungen mit $[^{32}\text{P}]\text{PO}_4$ abgeleitete Zusammenhang konnte durch eine Simultanbindungsstudie mit Vertretern der leichten (^{139}Ce und ^{143}Pm) und einem Vertreter der schweren Lanthanide (^{173}Lu) verifiziert werden: Phosphat steigert die Bindung der leichten Lanthanide mit vergleichsweise großen Ionenradien an HSA signifikant, wohingegen der bindungssteigernde Effekt für die schweren Lanthanide, wie in diesem Fall Lu(III) , gering ist.

Bei Me(III) -Ionen der dritten Hauptgruppe mit den kleinsten Ionenradien ist schließlich keine ternäre Verbindungsbildung nachweisbar. In direkten Bindungsstudien mit ^{67}Ga , einem Me(III) -Ion mit im Vergleich zu den Lanthaniden und Yttrium geringem Ionenradius, konnte mit Phosphat keine ternäre Verbindungsbildung beobachtet werden. Andererseits ließ sich eine binäre Verbindung zwischen ^{67}Ga und Serumproteinen (insbesondere Transferrin) detektieren. Als mögliche Erklärung für dieses Bindungsverhalten bietet sich an, daß die kleineren Me(III) -Ionen eine höhere Affinität zu a.) Serumproteinen oder b.) anderen endogenen Komplexbildnern (z.B. Citrat) aufweisen und infolgedessen keine ternäre Verbindung ausbilden. Jedoch muß die fehlende Tendenz der Me -Ionen der III. Hauptgruppe zur Bildung einer ternären Verbindung nicht unbedingt ein Ionenradiusphänomen sein, da sie sich als Elemente der III. Hauptgruppe des Periodensystems von den Elementen der III. Nebengruppe (Sc , Y und La) und den Lanthaniden und insbesondere in Aspekten der Koordinationschemie unterscheiden. Für diese Me(III) -Ionen ist daher der Transport im Blut über eine ternäre Verbindung mit Serumproteinen nicht von Bedeutung.

4.12.3 Modellvorstellungen zur ternären Verbindung zwischen Yttrium, Phosphat und Serumproteinen

Vergleiche der simultanen Bindung von Yttrium und Phosphat an ausgewählte Homopolyaminosäuren mit jeweils nur Amino- (Polylysin) oder Carboxylat-Funktionen (Polyglutaminsäure) zeigten, daß den Carboxylat-Gruppen die entscheidende Rolle für die simultane Bindung von Yttrium und Phosphat an Polyelektrolyte zukommt. Dies impliziert die Bildung einer ternären Komplexverbindung zwischen einer positiv geladenen Yttrium-Phosphat-Spezies und negativ geladenen Carboxylat-Funktionen des Polyelektrolyten. Dies korreliert mit der pH-Abhängigkeit der Yttrium- bzw. Phosphat-Bindung an HSA im sauren Gebiet, da mit zunehmender Protonierung der Carboxylat-Gruppen von Glutamin- und Aspa-

raginsäure eine Bindungsabnahme von Y(III) und Phosphat einhergeht. Dabei stimmt der pH von 4,8 - bei dem ungefähr noch die Hälfte des bei pH 5,5 bis 8,5 an HSA assoziierten Y(III)- bzw. Phosphat-Anteils gebunden ist - gut mit den pK-Werten für die H⁺-Ionen der Carboxyl-Gruppen von Glutamin- und Asparaginsäure (pK ≈ 4,4 - 4,7 in Proteinen) überein. Der Unterschied in der Bindungskapazität zwischen Transferrin mit 7 und HSA mit 14 Bindungsstellen für die simultane Bindung von Y(III) und Phosphat muß folglich in erster Linie mit den Carboxylat-Gruppen zusammenhängen. Ein Vergleich der Anzahl der sauren Aminosäuren (Asparagin- und Glutaminsäure) beider Moleküle (HSA 98, Transferrin 85 saure Aminosäuren) zeigt, daß dies allein nicht das entscheidende Kriterium für die differierenden Bindungskapazitäten sein kann. Daher wurde die räumliche Anordnung der sauren Aminosäuren in die Überlegungen mit einbezogen. Ein Vergleich beider Serumproteine hinsichtlich Anzahl der Aminosäureeinheiten, der sauren Aminosäuren und benachbarter saurer Aminosäuren in der Primärstruktur der jeweiligen Peptidkette ist in Tab. 4.7 zusammengefaßt.

Tab.4.7: Übersicht über die Anzahl der Aminosäure-, sauren Aminosäure- und benachbarten sauren Aminosäureeinheiten in der Primärstruktur von HSA [139] und apo-Transferrin [140].

	HSA	apo-Transferrin
Anzahl der AS^(a)	585	678
Anzahl der sauren AS	98	85
Quotient aus Anzahl AS/ Anzahl saure AS	6	8
Anzahl benachbarter saurer AS	14	7
Anzahl benachbarter Asp^(b)	4	2
Anzahl benachbarter Glu^(c)	3	-
Anzahl benachbarter Asp und Glu	7	5

mit AS = Aminosäure-, Asp = Asparaginsäure- und Glu = Glutaminsäureeinheiten

Aus der Studie mit Polyglutaminsäure ließ sich folgern, daß insbesondere benachbarte Carboxylat-Gruppen für die Bindung einer positiv geladenen Y-PO₄-Spezies geeignet sein müßten. Zur Veranschaulichung der Verhältnisse sind in Abb.4.25 benachbarte Glutamin- und Asparaginsäurereste in der Primärstruktur der Polypeptidkette schematisch wiedergegeben. In der Anzahl ihrer vicinalen Glutamin- bzw. Asparaginsäureeinheiten der Primärstruktur unterscheiden sich Transferrin und HSA signifikant. Während Transferrin nur 7 benachbarte saure Aminosäuregruppen hat, besitzt HSA deren 14. Überraschenderweise würde damit die Anzahl der benachbarten Carboxylat-Funktionen exakt mit der Anzahl der Bindungsstellen für die Y-PO₄-Spezies in den jeweiligen Proteinmolekülen übereinstimmen. Dies

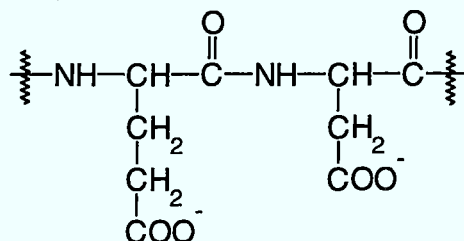


Abb.4.25: Benachbarte Glutamin- und Asparaginsäureeinheiten in der Aminosäure-Sequenz der Polypeptidkette eines Serumproteins.

ist ein wesentlicher Aspekt, der für das Vorliegen eines ternären Mischkomplexes zwischen Yttrium, Phosphat und Proteinmolekül spricht. Wie die Koordinatonsphäre der Y-PO_4 -Spezies bzw. die räumliche Anordnung der direkt aufeinanderfolgenden Carboxylat-Gruppen der Aminosäure-Sequenz in diesem Mischkomplex genau aussieht, kann allerdings aus den Ergebnissen nicht abgeleitet werden.

Des weiteren sprechen viele experimentelle Befunde für das Modell einer ternären Komplexverbindung. Dazu zählen vor allem (i) die Reproduzierbarkeit der Proteinbindungswerte in allen Experiment-Serien, (ii) die Quantifizierbarkeit der Bindungsverhältnisse (z.B die 1:1-Verbindungsstöchiometrie und die Möglichkeit, Bindungsstellen und -konstanten zu bestimmen) und (iii) daß alle experimentellen Zusammenhänge chemische Gleichgewichte darstellen, bei denen die Änderungen der Meßgrößen (vor allem %-Proteinbindung) durch Variation experimenteller Parameter durch systematische, zumeist sigmoidale Abhängigkeiten beschrieben werden können. Darüber hinaus läßt sich schlußfolgern, daß diese Gleichgewichtsprozesse alle reversibler Natur sind.

Als alternatives Modell zur Beschreibung einer $\text{Y(III)-Phosphat-Protein-Verbindung}$ kann aber die Entstehung eines YPO_4 -Kolloids unter Schutzwirkung der eingesetzten Biopolymere nicht ausgeschlossen werden. In der Literatur wird das in vivo-Verhalten von Yttrium bzw. Lanthaniden oftmals auf die Bildung kolloidaler Makroaggregate mit Carbonat, Hydroxid bzw. Phosphat zurückgeführt, ohne allerdings diese kolloidalen Verbindungen näher zu charakterisieren [52,93]. Übertragen auf das Y-PO_4 -Protein-System würde dies bedeuten, daß YPO_4 ein lyophobes disperses System bildet. Dem jeweiligen Protein bzw. Polyelektrolyt käme dabei die Funktion eines elektrosterischen Stabilisators zu. Vereinfacht wäre die Schutzwirkung des Proteinmoleküls so vorstellbar, daß das Makromolekül auf der Oberfläche der dispersen YPO_4 -Partikel adsorbiert wird und aufgrund seines Raumbedarfs und seiner negativen Ladung die YPO_4 -Partikel vor einer zu starken Annäherung und damit vor einer Aggregation zu schwerlöslichem YPO_4 schützt.

Herstellungsmethoden für Y(III)-Kolloide für ihre Anwendung in der Endoradiotherapie von Organen des RES werden in der Literatur vorgestellt. In einer Veröffentlichung von Speer (1961) wird die Synthese stabiler Y(III)-PO₄ und Y(III)-Hydroxid-Kolloide in Gegenwart verschiedener Stabilisatoren beschrieben. Aus dieser Arbeit geht hervor, daß Albumin für die Stabilisierung eines Y(III)-Hydroxid-Kolloids nur bedingt brauchbar war; eine effektive Stabilisierung eines Y(III)-PO₄-Kolloids gelang hingegen nicht.

Auch gestützt auf dieses Ergebnis erscheint das Vorliegen eines Kolloids eher unwahrscheinlich, was durch eigene Experimente belegt werden konnte. So war die simultane Bindung von Y(III) und Phosphat nach dem Einfrieren bzw. Austrocknen der HSA-Lösung noch gut detektierbar. Lyophobe Kolloide sollten derartige Behandlungen nicht überstehen, eine irreversible Ausflockung des kolloidalen Systems wäre die Folge. Jedoch ist unklar, inwieweit Schutzkolloide wie HSA lyophobe Kolloide gegen derartige Einflüsse schützen können. Ein weiterer Punkt ist, daß mit Carbonat keine Bildung eines ternären Systems erfolgt. Da Carbonat mit Y(III) ebenfalls ein schwerlösliches Produkt liefert, sollte es analog zu Phosphat ebenfalls ein Kolloid unter Schutzwirkung von HSA bilden. Weiterhin spricht die Tatsache, daß mit Ga, Sc und In nahezu keine und mit Lu und Yb nur eine verminderte Tendenz zur Ausbildung einer ternären Verbindung gefunden wurde, ebenfalls gegen das Vorliegen eines Kolloids, da diese Elemente mit Phosphat auch schwerlösliche Verbindungen bilden, die sich in disperser Form durch Proteine stabilisieren lassen sollten.

4.12.4 Medizinische Schlußfolgerungen

In Studien zur Charakterisierung therapeutisch relevanter und anderer ⁹⁰ bzw. ⁸⁸Y-Komplexe wurde gefunden, daß radiopapierchromatographische und radiopapier-elektrophoretische Methoden, insbesondere für schwächere ⁹⁰Y-Komplexe, nur bedingt zur Qualitätskontrolle von ⁹⁰Y-Radiokomplexen geeignet sind. Zudem wurde mittels dieser Methoden nachgewiesen, daß der oftmals durch abnorme Stoffwechselvorgänge abgesenkte pH-Wert neoplastischen Gewebes von im Extremfall 5,6 nicht ausreicht, um eine Dissoziation der untersuchten Chelatkomplexe bewirken zu können. Somit kann die häufig vorgefundene pH-Erniedrigung im Tumorgewebe kein entscheidendes Kriterium für die bevorzugte Einlagerung von ⁹⁰Y und anderen dreiwertigen Radiometallen in Tumoren sein.

Eine Evaluierung des in vivo-Verhaltens der ternären Y(III)-PO₄-HSA Verbindung in Mäusen im Vergleich zu trägerfreiem [⁸⁸Y]Chlorid bzw. [⁸⁸Y]Y(III)-Citrat ergab, daß die ternäre Verbindung eine ausgesprochen hohe Serumstabilität mit einer

nahezu quantitativen Ablagerung in Leber und Milz aufweist, wohingegen die beiden anderen Applikationsformen als Hauptretentionsorgan den Knochen bevorzugen und die serumproteingebundenen ^{88}Y -Anteile wesentlich geringer sind.

In diesem Zusammenhang ist von Interesse, welches Serumprotein die Transportfunktion für Y(III) bzw. Phosphat im Blut übernimmt. Während in der Literatur z.B. entweder α -Globulin [95] oder Albumin [86] die alleinige Transportfunktion zugesprochen wird, konnte in dieser Arbeit im Kontext des ternären Modells kein Serumprotein als alleiniges Transportprotein identifiziert werden, da alle untersuchten Serumproteinfraktionen mehr oder weniger starke Tendenzen zur Ausbildung einer ternären Verbindung aufweisen. Dennoch dürfte, allein schon aus statistischen Gründen, HSA (mit einem Anteil von ca. 60% an der gesamten Serumproteinmenge) eine entscheidende Rolle als Vehikelmolekül für Yttrium bzw. Lanthanide zukommen. Darüber hinaus zeigte sich in einem Vergleich von HSA mit apo-Transferrin, daß die Tendenz zur simultanen Bindung von Y(III) und Phosphat an das Protein für HSA stärker ist.

Die oben angesprochene hohe Knochenaffinität von Y(III)-Verbindungen stand auch im Mittelpunkt der Untersuchungen unterschiedlicher Yttrium-Komplexe mit Hydroxylapatit (CaP) als in vitro-Knochenmodell. In der Reihe $[\text{}^{88}\text{Y}]\text{Y(III)-EDTA} < [\text{}^{88}\text{Y}]\text{Y(III)-EDTMP} < [\text{}^{88}\text{Y}]\text{Y(III)-Citrat}$ konnte eine Zunahme der $[\text{}^{88}\text{Y}]\text{Y(III)}$ -Adsorptionstendenz beobachtet werden. Für den EDTMP-Komplex konnte dabei durch Vergleich mit $[\text{}^{88}\text{Y}]\text{Y(III)-EDTA}$ eine bereits aus der Literatur bekannte [135] intrinsische Affinität zur anorganischen Knochenmatrix nachgewiesen werden, die eine Adsorption des Komplexes über die Ligandenstruktur auf der Hydroxylapatit-Oberfläche nahelegt. Die Adsorptionsfaktoren von $[\text{}^{88}\text{Y}]\text{Y(III)}$ im Fall des $[\text{}^{88}\text{Y}]\text{Y(III)-Citrat}$ -Komplexes übersteigen die Adsorptionswerte der anderen beiden Komplexe um ein vielfaches, was auf einen andersartigen Adsorptionsmechanismus hinweist. Dieser beruht wahrscheinlich auf einer Dissoziation des labilen $[\text{}^{88}\text{Y}]\text{Y(III)-Citrat}$ -Komplexes, infolgedessen der Austausch von Y^{3+} gegen Ca^{2+} in der Hydroxylapatitstruktur erleichtert wird. Obwohl dadurch eine höhere Deposition von Radioyttrium in der Knochenmetastase ermöglicht wird, bewirkt die geringe Komplexstabilität des Y-Citrat-Komplexes auch eine Akkumulation von Radioyttrium in gesunden Organen mit den daraus resultierenden ungünstigen Konsequenzen für den Patienten.

Dies konnte durch PET-Studien an Patienten mit multiplen Knochenmetastasen mittels ^{86}Y bestätigt werden. So liegt die mit $[\text{}^{90}\text{Y}]\text{Citrat}$ erreichbare Strahlendosis pro MBq ^{90}Y in den Metastasen mit $25,5 \text{ mGy/cm}^3$ deutlich über dem Wert, der sich für $[\text{}^{90}\text{Y}]\text{EDTMP}$ mit $17,8 \text{ mGy/cm}^3$ ergibt. Trotz dieser geringeren absoluten

Aktivitätsaufnahme in den Metastasen ist der Einsatz von [^{90}Y]EDTMP dennoch vorzuziehen, da die intrinsische Knochenaffinität des Liganden ausreicht, genügend hohe Strahlendosen für eine analgetische Wirkung im Tumor deponieren zu können, ohne gesundes Gewebe signifikant in Mitleidenschaft zu ziehen.

Die aus den Proteinbindungsstudien ableitbaren Zusammenhänge tragen zum Verständnis des pharmakokinetischen Verhaltens und der Transportform therapeutisch nutzbarer dreiwertiger Radiometallkomplexe bei. Vor diesem Hintergrund erscheint daher eine verbesserte Anwendung im Hinblick auf eine ausreichend hohe Radionuklidanreicherung in pathologischen Zielgeweben unter optimalem Schutz gesunden Gewebes möglich. Unter Berücksichtigung der erzielten Ergebnisse läßt sich das in vivo-Verhalten dreiwertiger Radiometalle bzw. Radiometall-Komplexe wie folgt zusammenfassen*:

Nach ihrer i.v.-Applikation ins Blut hängt das weitere Schicksal der Me(III)-Komplexe in entscheidender Weise von ihren physikochemischen Stabilitäten ab. Ausgesprochen stabile Komplexe (z.B. mit DTPA) mit geringen Dissoziationstendenzen und sich darauf gründender hoher Serumstabilität treten kaum mit Körperbestandteilen in Wechselwirkung und werden daher ohne signifikante Retention aus dem Körper ausgeschieden. Eine Ausnahme bilden Komplexe mit Phosphonat-Gruppen, deren Interaktion mit Blutkomponenten ebenfalls sehr gering ist, die aber trotz ihrer hohen Stabilität aufgrund ihrer intrinsischen Affinität zur anorganischen Knochenmatrix dort selektiv eingelagert werden.

Komplexe mittlerer Stabilität (z.B. mit Citrat bzw. NTA) zeigen ein komplizierteres pharmakokinetisches Verhalten mit hoher Retention in Leber und Knochen, da diese Komplexe im Blut in Abhängigkeit von ihrer Komplexstabilität durch Trans-Chelierungsprozesse, entsprechend der Gleichgewichtslage, unterschiedliche physikochemische Zustandsformen des Radiometalls im Blut ergeben. Einerseits entsteht eine niedermolekulare Fraktion, die sich sowohl aus dem primären, intakt gebliebenen als auch aus einem sekundären, durch Umkomplexierungen mit körpereigenen Komplexbildnern (z.B. Aminosäuren und vor allem Citrat) entstandenen Komplex zusammensetzt. Diese Fraktion sollte aufgrund ihrer freien Diffundierbarkeit vorrangig für den Einbau des Radiometalls in die reaktiven Zonen des Knochens und insbesondere in die durch hohe Stoffwechseltätigkeit charakterisierten Knochenmetastasen verantwortlich sein. Simultan bildet sich andererseits aufgrund des hohen anorganischen Phosphat- und Protein-Gehalts des Bluts eine

* Das dargestellte Bioverhalten bezieht sich nur auf Lanthanide und Yttrium, da die Elemente der III. Hauptgruppe mit hoher Stabilität spezifisch von Transferrin gebunden und in dieser Form transportiert werden.

relativ stabile ternäre Komplexverbindung zwischen Radiometall, Phosphat und Serumprotein bzw. ein ternäres proteinstabilisiertes Me(III)-PO_4 -Kolloid.

Wie bereits erwähnt, konnte eine ausnehmend hohe Affinität der ternären Verbindung zur Leber belegt werden, so daß diese Fraktion vorrangig für die Aufnahme des Radiometalls in der Leber verantwortlich ist. Bei den leichten Lanthaniden und auch Yttrium ist das Gleichgewicht zwischen beiden Transportformen zugunsten des ternären Komplexes verschoben, so daß eine höhere Akkumulation im RES resultiert. Schwere Lanthanide mit einer gering ausgeprägten Tendenz zur Bildung einer ternären Verbindung werden im Blut in komplexierter Form (primär mit Citrat) transportiert, so daß das zentrale Zielorgan der Knochen bzw. die Knochenmetastase ist.

Auch dieses, aus den Bindungsstudien ableitbare, pharmakokinetische Verhalten der unterschiedlich stabilen Komplexe konnte in PET-Studien an Patienten mit multiplen Knochenmetastasen gefunden werden. Während sich im Fall des schwachen ^{86}Y -Citrat-Komplexes schon nach 2-3 min im Lebergewebe ^{86}Y zu 20% ID anreichert, was einer Dosis von 1,8 mGy/MBq ^{90}Y entspricht, ist der ^{86}Y -Anreicherungsgrad des stabilen ^{86}Y -EDTMP-Komplexes vernachlässigbar gering.

Neben bioanorganischen Aspekten besitzen die dargelegten Zusammenhänge damit auch therapeutische Relevanz, da die Transportform des dreiwertigen Radionuklids in einem gewissen Rahmen sowohl über den Komplexliganden als auch über seinen Ionenradius manipulierbar sein sollte. Das eröffnet Perspektiven im Hinblick auf eine gezieltere Akkumulation von $\text{Me(III)-Ligand-Komplexen}$ in Targetorganen. So sollten gerade schwere Lanthanide mit geringer Tendenz zur Ausbildung eines ternären Mischkomplexes für die Therapie von Interesse sein, da sich mit diesen eine unerwünschte Aktivitätsakkumulation in der Leber reduzieren läßt. Unter den schweren Lanthaniden scheinen insbesondere ^{166}Ho ($T_{1/2} = 26,8 \text{ h}$, $E_{\beta\text{-max}} = 1,9 \text{ MeV}$), ^{169}Er ($T_{1/2} = 9,4 \text{ d}$, $E_{\beta\text{-max}} = 0,3 \text{ MeV}$), ^{175}Yb ($T_{1/2} = 4,2 \text{ d}$, $E_{\beta\text{-max}} = 0,5 \text{ MeV}$) und vor allem ^{177}Lu ($T_{1/2} = 6,71 \text{ d}$, $E_{\beta\text{-max}} = 0,5 \text{ MeV}$) für die Endoradiotherapie mit $\text{Me(III)-Ligand-Komplexen}$ sehr geeignet zu sein. Unter Berücksichtigung der oben diskutierten bioanorganischen und pharmakokinetischen Aspekte und der leichten Erzeugbarkeit (^{177}Lu ist aufgrund seines hohen Wirkungsquerschnitts von 2100 barn in hohen spezifischen Aktivitäten am Reaktor über die (n,γ) -Reaktion herstellbar) bietet sich der Einsatz von ^{177}Lu in der palliativen Behandlung multipler Knochenmetastasen an. Gegenüber dem in der klinischen Praxis bereits eingesetzten ^{90}Y -Citrat bzw. ^{153}Sm -EDTMP sollte der Einsatz dieses Radionuklids signifikante Vorteile bringen.

5 Zusammenfassung

Zur Aufklärung der Art und des Ausmaßes der Wechselwirkung von Yttrium und generell von dreiwertigen Metallen mit Blutkomponenten wurde in systematischen Proteinbindungsstudien die Bindung von Radioyttrium und anderen dreiwertigen Metallen an Modellserumproteine (Humanserumalbumin (HSA) und apo-Transferrin) mittels Gel- (GF) und Ultrafiltration (UF) untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß Phosphat als endogener Bestandteil des Bluts einen synergistischen Effekt auf die Bindung von Y(III) an Serumproteine ausübt. Während in Gegenwart anderer endogener Anionen (Chlorid, Bicarbonat, Sulfat, Fluorid und Citrat) die Bindung von Y(III) an Humanserumalbumin mit 5% (GF) bzw. 20% (UF) gering ist, steigert die Anwesenheit von Phosphat in der Y(III)-Proteinlösung den proteingebundenen Y(III)-Anteil auf ungefähr 80% (GF) bzw. 95% (UF). Umgekehrt wird Phosphat nur in Gegenwart von Y(III) signifikant an HSA gebunden. Der Nachweis eines kooperativen Bindungsmechanismus für die Bindung von Y(III) an Proteine unter Beteiligung von Phosphat stellt das wesentlichste bioanorganische Ergebnis dieser Arbeit dar. Dabei handelt es sich prinzipiell um einen neuen Aspekt, da sich die Bindung von Y(III) an Serumproteine im Blut in der Literatur im allgemeinen auf binäre Bindungsmechanismen stützt. Für diese binären Interaktionen ergaben sich zwar auch Anhaltspunkte. Da jedoch auch in [^{32}P]PO₄-markiertem Vollblutserum eine ternäre Verbindung nachgewiesen werden konnte, belegt dies, daß binäre Interaktionen zwischen Me(III)-Ion und Proteinmolekül schwächer als die Tendenz zur Ausbildung einer Verbindung zwischen Y(III), Phosphat und Serumproteinen und daher im Blut aufgrund des hohen Phosphat-Gehalts von untergeordneter Bedeutung sind.

Die Bindung von Y(III) und Phosphat an HSA erfolgt im stöchiometrischen Verhältnis von Yttrium zu Phosphat von 1:1. Die Anzahl der Bindungsstellen für die nicht näher definierbare Y(III)-PO₄-Spezies für HSA ließ sich mit 14 und für apo-Transferrin mit 7 bestimmen. Durch Kompetitivexperimente mit verschiedenen Komplexliganden konnte die Stabilitätskonstante des ternären Mischkomplexes mit HSA mit $\log \beta = 10,9$ ($I = 0,15 \text{ M}$, $T = 25^\circ\text{C}$) abgeschätzt werden. Die ternäre Verbindung ist über einen weiten physiologischen pH-Bereich stabil. Erst oberhalb von pH 5,5 bzw. unterhalb von pH 8,5 kommt es zu einer zunehmenden Destruktion der ternären Verbindung. Auch ließ sich zeigen, daß schon nach 1-2 Minuten 65% Y(III) und Phosphat proteingebunden vorliegen, so daß die Bildung der ternären Verbindung sehr schnell erfolgt, was unterstreicht, wie wichtig diese ternäre Verbindung für das pharmakokinetische Verhalten von Y(III) nach i.v.-Applikation ist.

Durch den Einsatz von Homopolyaminsäuren (Poly-D-glutaminsäure, Poly-L-lysin), zur Aufklärung der für die Bindung der YPO_4 -Spezies verantwortlichen funktionellen Gruppe, konnte die Carboxylat-Gruppe als Bindungspartner identifiziert werden. Dies impliziert die Bildung einer ternären Komplexverbindung zwischen einer positiv geladenen YPO_4 -Spezies und den negativ geladenen Carboxylat-Funktionen des Polyelektrolyten bzw. Proteins. Vergleicht man die Anzahl der Bindungsstellen von HSA (14) und apo-Transferrin (7) mit der Anzahl benachbarter saurer Aminosäuren (Asparagin- und Glutaminsäure) der Aminosäuresequenz, so stimmt deren Zahl überraschenderweise exakt mit der jeweiligen Anzahl der Bindungsstellen überein. Nicht zuletzt aufgrund dieses Aspekts sprechen alle Experimente für einen ternären Mischkomplex zwischen Y(III), Phosphat und Serumprotein. Dennoch kann die Bildung eines kolloidalen Y(III)- PO_4 -Protein-Systems nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Dabei würde Y(III) und Phosphat ein lyophobes Kolloid durch elektrosterische Stabilisierung von Serumproteinen bilden.

Eine Ausweitung der Studien auf andere dreiwertige Metalle der III. Haupt- und Nebengruppe und der Lanthanide ergab, daß offenbar ein Zusammenhang zwischen dem Ionenradius des Metall-Ions und seiner Tendenz zur Ausbildung einer ternären Verbindung besteht. Während leichte Lanthanide und vor allem Übergangslanthanide mit vergleichsweise großen Ionenradien eine ausgeprägte Neigung zur Bildung einer ternären Verbindung aufweisen, wird diese mit abnehmendem Ionenradius zunehmend schwächer, so daß schließlich bei Metallen der III. Hauptgruppe keine ternäre Verbindungsbildung beobachtet wird. Dieser durch indirekte Messungen mit ^{32}P abgeleitete Zusammenhang konnte durch Bindungsstudien mit ^{67}Ga , ^{139}Ce , ^{143}Pm , ^{145}Sm , ^{159}Dy , ^{169}Yb und ^{173}Lu bestätigt werden.

Zur Klärung der Frage des Adsorptionsmechanismus für Y-Komplexe, wurde mit Hydroxylapatit als Knochenmodell das Bindungsverhalten von ^{88}Y Y(III)-Citrat, ^{88}Y Y(III)-EDTMP und ^{88}Y Y(III)-EDTA untersucht. Hierbei zeigte sich in der Reihe ^{88}Y Y(III)-EDTA < ^{88}Y Y(III)-EDTMP < ^{88}Y Y(III)-Citrat eine Zunahme der ^{88}Y -Adsorptionstendenz. Während die Ergebnisse für ^{88}Y Y(III)-Citrat und ^{88}Y Y(III)-EDTA eine Adsorption von ^{88}Y nach der Dissoziation des jeweiligen Komplexes nahelegen, wird ^{88}Y Y(III)-EDTMP über die Phosphonatstruktur des Liganden auf der Oberfläche von Hydroxylapatit adsorbiert.

Das in vivo-Verhalten für Yttrium und Lanthanide, welches auch in Tierexperimenten mit Mäusen und PET-Studien mit Knochenmetastasen-Patienten geprüft wurde, läßt sich wie folgt zusammenfassen: Nach ihrer i.v.-Applikation in komplexierter Form hängt das Schicksal des Me(III)-Ions von der Stabilität des verabreichten Komplexes ab. Starke Me(III)-Komplexe mit daraus resultierender Serumstabilität

werden ohne signifikante Retention aus dem Körper ausgeschieden. Eine Ausnahme bilden Komplexe, die aufgrund spezieller biochemischer Affinitäten bevorzugt in einem bestimmten Targetorgan akkumuliert werden (z.B. Phosphonat-Komplexe mit intrinsischer Knochenaffinität). Komplexe mittlerer Stabilität bilden hingegen ein komplizierteres Organverteilungsmuster aus, da es im Serum zu Trans-Chelierungsprozessen kommt. Einerseits entsteht eine niedermolekulare Fraktion, die aufgrund ihrer freien Diffundierbarkeit für den Einbau des Radiometalls in Knochen bzw. Knochenmetastasen verantwortlich ist. Andererseits bildet sich wegen des hohen Phosphatanteils im Blut eine ternäre Verbindung zwischen Radiometall, Phosphat und Serumproteinen. Diese Fraktion ist vorrangig für die Aufnahme des Radiometalls in der Leber verantwortlich, was in Tierexperimenten nachgewiesen werden konnte. Dort wurde in Mäusen eine ausgesprochen hohe Anreicherung der ternären Verbindung in der Leber und Milz vorgefunden.

Da die Tendenz zur Ausbildung einer ternären Verbindung mit abnehmendem Ionenradius geringer wird, sollte sich durch den Einsatz schwerer Lanthanide die Bildung der ternären Verbindung und damit die unerwünschte Akkumulation in der Leber reduzieren lassen. Potentiell für die Endoradiotherapie mit Me(III)-Ligand-Komplexen besonders geeignet sind daher die schweren Radiolanthanide ^{166}Ho , ^{169}Er , ^{175}Yb und vor allem ^{177}Lu . Unter Berücksichtigung der bioanorganischen Ergebnisse, pharmakokinetischen Zusammenhänge und leichten Erzeugbarkeit am Reaktor bietet der Einsatz von ^{177}Lu ($T_{1/2} = 6,71 \text{ d}$, $E_{\beta\text{-max}} = 0,5 \text{ MeV}$) vor allem in Verbindung mit Citrat aber auch mit EDTMP gegenüber den bereits in der klinischen Praxis eingesetzten ^{90}Y Citrat und ^{153}Sm EDTMP signifikante Vorteile. Ein Einsatz von ^{177}Lu in der palliativen Therapie multipler Knochenmetastasen scheint daher sehr erfolgversprechend zu sein. Dies eröffnet Perspektiven im Hinblick auf eine exogene Beeinflussung von Radiometallkomplexen für eine Optimierung der Anreicherung des Radionuklids in den Knochenmetastasen unter verbessertem Schutz gesunden Gewebes.

Damit verbinden sich Ergebnisse der bioanorganischen Studien zur Koordinationschemie dreiwertiger Metalle in physiologischen Modellsystemen (Modellproteine mit endogenen Anionen, Hydroxylapatit) mit nuklearmedizinischen Konsequenzen. Wenn auch die exakte chemische Form der Yttrium-Phosphat-Protein-Verbindung nicht endgültig zugunsten der ternären Komplexverbindung entschieden werden konnte, demonstrieren die Ergebnisse dennoch sowohl die Notwendigkeit als auch den potentiellen Nutzen systematischer radiochemischer Untersuchungen als Voraussetzung einer Optimierung vor allem endoradiotherapeutischer Strategien.

6 Anhang

Organkinetik von $[^{88}\text{Y}]\text{Chlorid}$, $[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)-Citrat}$ und ternärer Verbindung zwischen $[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)}$, $[^{32}\text{P}]\text{PO}_4$ und HSA

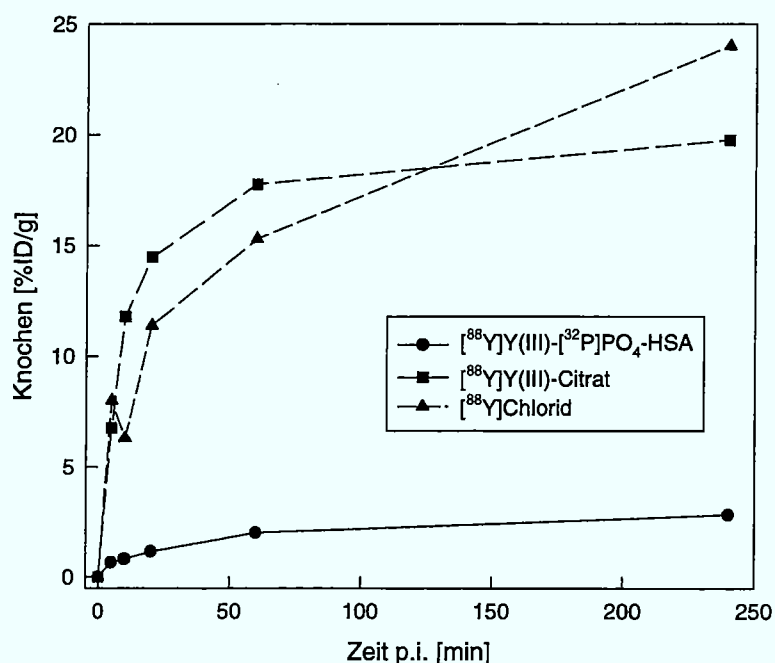


Abb.6.1: Pharmakokinetik von a.) ternärer Verbindung zwischen $[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)}$, $[^{32}\text{P}]\text{PO}_4$ und HSA, b.) $[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)-Citrat}$ und c.) $[^{88}\text{Y}]\text{Chlorid}$ in den Knochen von NMRI-Mäusen.

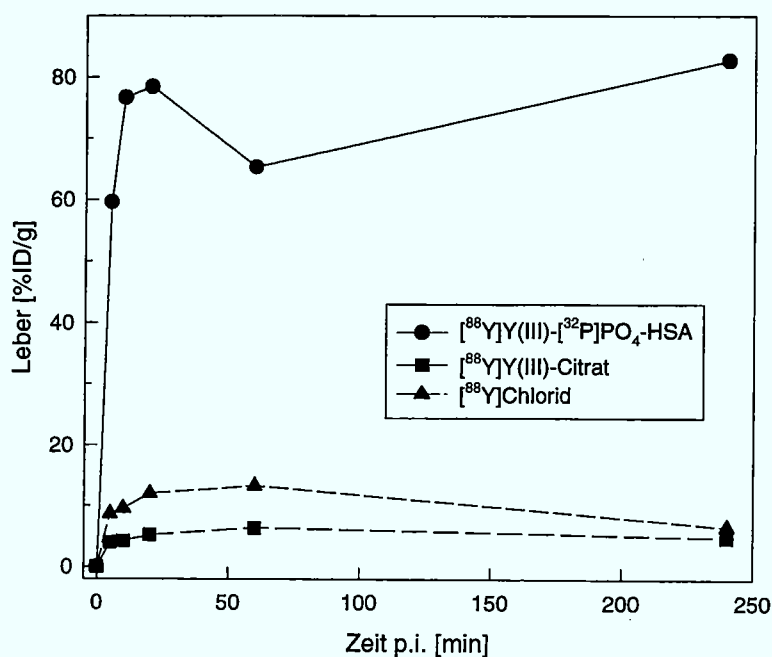


Abb.6.2: Pharmakokinetik von a.) ternärer Verbindung zwischen $[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)}$, $[^{32}\text{P}]\text{PO}_4$ und HSA, b.) $[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)-Citrat}$ und c.) $[^{88}\text{Y}]\text{Chlorid}$ in der Leber von NMRI-Mäusen.

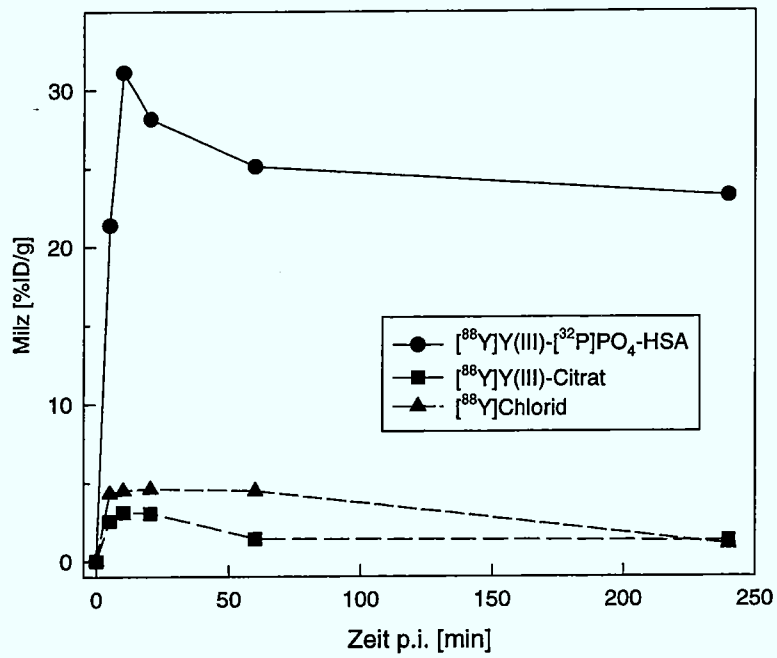


Abb.6.3: Pharmakokinetik von a.) ternärer Verbindung zwischen $[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)}$, $[^{32}\text{P}]\text{PO}_4$ und HSA, b.) $[^{88}\text{Y}]\text{Y(III)}\text{-Citrat}$ und c.) $[^{88}\text{Y}]\text{Chlorid}$ in der Milz von NMRI-Mäusen.

7 Literaturverzeichnis

- [1] B. Kidman, M.L. Tutt, J.M. Vaughan, *J. Path. Bact.* 62, 209 (1950).
- [2] B. Kidman, M. L. Tutt, J.M. Vaughan, *J. Path. Bact.* 63, 253 (1951).
- [3] J. Greenberg, H.C. Dudley, A. Sawitsky,
Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 2, 303 (1958).
- [4] V.K. Langmuir, R.M. Sutherland,
Antibody Immunoconj. Radiopharm. 1, 195 (1988).
- [5] E.J. Hall (Ed.), *Radiology for the Radiologist*,
Harper and Row, Philadelphia 145 (1978).
- [6] E. Browne, R.B. Firestone, *Tables of Radioactive Isotopes*, J. Wiley & Sons,
New York (1986).
- [7] S.J. Adelstein, A.I. Kassis, Criteria for the Selection of Radioimmunotherapy in
Radiolabeled Monoclonal Antibodies for Imaging and Therapy,
Ed.: S.C. Srivastara, Plenum Press, New York (1988).
- [8] F. Rösch, S.M. Qaim, G. Stöcklin, *Appl. Radiat. Isot.* 44, 677 (1993).
- [9] K.H. Lieser, *Einführung in die Kernchemie*, Verlag Chemie, Weinheim, 45 (1980).
- [10] R.F. Doering, W.D. Tucker, L.G. Stang, *J. Nucl. Med.* 4, 54 (1963).
- [11] C.C. Boring, T.S. Squires, T. Tong, S. Montgomery,
CA Cancer J. Clin. 44, 7 (1994).
- [12] P.M. Mauch, M.A. Drew, Treatment of metastatic cancer to bone in *Cancer:*
Principles and Practise of Oncology, Eds.: V.T. DeDivita, S. Hellman,
S.A. Rosenberg , J. B. Lippincott, 1 (1985).
- [13] H.S. Poulsen, O. S. Nielsen, M. Klee, M. Roth,
Cancer Treatment Reviews 16, 41 (1989).
- [14] R.G. Robinson, *Clinics in Oncology* 5, 39 (1986).
- [15] P.J. Hoskin, *Cancer Surveys* 7, 69 (1988).
- [16] T. Matsubayashi, H. Koga, Y. Nishiyama, S. Tominaga, T. Sourada,
Jap. J. Clin. Oncol. 11, 253 (1981).
- [17] O.M. Salazar, P. Rubin, F. Hendricksen, R. Komaki, C. Poulter, J. Newall, S. As-
kell, M. Mohuiddin, J. van Ess, *Cancer* 58, 29 (1986).
- [18] J.G. Smart, *Br. J. Urol.* 37, 139 (1965).
- [19] B. Werner, C. Tsacson, G. Lundell, *Acta Radiol. Oncol.* 19, 327 (1980).
- [20] J.N. Hall, R.P. Tokars, R.E. O'Mara, *J. Nucl. Med.* 16, 532 (1975).
- [21] E.C.K. Tong, S. Rubenfeld, *Am. J. Roentgenol.* 99, 422 (1967).
- [22] N. Firusian, *Med. Welt* 24, 1614 (1973).
- [23] N. Firusian, P. Mellin, C.G. Schmidt, *J. Urol.* 116, 764 (1976).
- [24] R. Greiff, *Med. Nucl.* 1, 93 (1989).
- [25] J. Kutzner, W. Dähnert, T. Schreyer, W. Grimm, K.H. Brod, M. Becker,
Nucl. Med. 20, 229 (1981).
- [26] J. Kutzner, K. Hahn, W. Grimm, H.P. Rösler, A. Eckmann, S. Bender,
NUC Compact 21, 128 (1990).
- [27] J. Kutzner, M. Mittas, W. Grimm, *Nucl. Med.* 20, 35 (1981).

- [28] H. Herzog, F. Rösch, G. Stöcklin, C. Lueders., S. M. Qaim, L.E. Feinendegen, *J. Nucl. Med.* 34, 2222 (1993).
- [29] M. Farhangi, R. A. Holmes, W. A. Volkert, K. W. Logan, A. Singh, *J. Nucl. Med.* 33, 1451 (1992).
- [30] C. Collins, J. F. Eary, G. Donaldson, C. Vernon, *J. Nucl. Med.* 34, 1839 (1993).
- [31] W.F. Goeckeler, B. Edwards, W.A. Volkert, R.A. Holmes, J. Simon, D. Wilson, *J. Nucl. Med.* 28, 495 (1987).
- [32] A.R. Ketring, *Nucl. Med. Biol.* 14, 223 (1987).
- [33] B.M. Ansell, A. Crook, J.R. Mallard, E.G.L. Bywaters, *Ann. Rheum. Dis.* 22, 435 (1963).
- [34] K. Fellinger, J. Schmid, *Z. inn. Med.* 33, 351 (1952).
- [35] J. Müller-Brand, *Schweiz. med. Wschr.* 120, 676 (1990).
- [36] G.J. Ehrhardt, D.E. Day, *Nucl. Med. Biol.* 14, 233 (1987).
- [37] J.C. Andrews, S.C. Walker, R.J. Ackermann, L.A. Cotton, W.D. Enslinger, B.Shapiro, *J. Nucl. Med.* 35, 1637 (1994).
- [38] F.L. Otsuka, M.J. Welch, *Nucl. Med. Biol.* 14, 243 (1987).
- [39] K.K. Bhargava, S.A. Acharya, *Sem. Nucl. Med.* 19(3), 187 (1989).
- [40] S.C. Srivastava, R. C. Mease, *Nucl. Med. Biol.* 18, 589 (1991).
- [41] B.W. Wessels, R.D. Rogus, *Med. Phys.* 11, 638 (1984).
- [42] Liu Yuanfang, Wu Chuanchu, *Pure and Appl. Chem.* 63, 427 (1991).
- [43] M.K. Moi, C.F. Meares, M.J. McCall, *Anal. Biochem.* 148, 249 (1985).
- [44] A. Yokoyama, Y. Ohmomo, K. Horiuchi, *J. Nucl. Med.* 23, 909 (1982).
- [45] J.A. Mercer-Smith, S.D. Figard, D.K. Lavallee, *J. Nucl. Med.* 26, 437 (1985).
- [46] J. Schumacher, R. Matys, H. Hauser, *Eur. J. Nucl. Med.* 12, 397 (1986).
- [47] M.K. Haseman, D.A. Goodwin, C.F. Meares, *Eur. J. Nucl. Med.* 12, 455 (1986).
- [48] C.F. Meares, M.J. McCall, S.V. Desphande, *Int. J. Cancer, Suppl.* 2, 99 (1988).
- [49] R.L. Wahl, C.W. Parker, G.W. Philpott, *J. Nucl. Med.* 24, 316 (1983).
- [50] N. S. MacDonald, R.E. Nusbaum, G.V. Alexander, F. Ezmirlian, P. Spain, D.E. Rounds, *J. Biol. Chem.* 195, 837 (1952).
- [51] H.M. Russell, D.M. Gould, *Am. J. Med. Sci.* 227, 572 (1954).
- [52] B. Rosoff, E. Siegel, G. L. Williams, H. Spencer, *Int. J. Appl. Rad. Isot.* 14, 129 (1963).
- [53] S. L. Hood, C.L. Comar in *Rare Earths in Biochemical and Medical Research*, Oak Ridge, Eds.: F. Anderson, B. Elisabeth, 280 (1955).
- [54] H.C. Dudley, St. Albans, *J. Lab. Clin. Med.* 45, 792 (1955).
- [55] H.C. Dudley, St. Albans, *J. Lab. Clin. Med.* 47, 881 (1956).
- [56] H.C. Dudley, J. Greenberg, *J. Lab. Clin. Med.* 52, 539 (1958).
- [57] E.A. Daigneault, *Toxicology and Appl. Pharmacology* 5, 331 (1963).
- [58] P. W. Durbin, M. H. Williams, M. Gee, R. H. Newman, J. G. Hamilton, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 91, 78 (1956).
- [59] T.J. Haley, *J. Pharm. Sciences* 54, 663 (1965).
- [60] D.J. Hnatowich, M. Chinol, D.A. Siebecker et al., *J. Nucl. Med.* 29, 1428 (1988).

- [61] J.S.W. Stewart, V. Hird, D. Snook et al., *J. Clin. Oncol.* 8, 1941 (1990).
- [62] R.D. Shannon, *Acta Cryst.* A32, 751 (1976).
- [63] K. Schomäcker, *Habilitationsschrift*, Universität zu Köln, 69 (1992).
- [64] W. Kaim, B. Schwederski, *Bioanorganische Chemie*, B.G. Teubner, Stuttgart, 310 (1991).
- [65] G. Pfeiffer, *Nucl. Med.* 15, 273 (1976).
- [66] T. Higase, Y. Nakayama, A. Murata, K. Nakamura, M. Sugiyama, T. Kwaguchi, S. Susuki, *J. Nucl. Med.* 13, 196 (1972).
- [67] R.L. Hayes, D.H. Brown, B.L. Byrd, J.E. Carlton, *J. Nucl. Med.* 15, 501 (1974).
- [68] W.-G. Franke, K. Hennig, G.-J. Beyer, E. Henke, V.A. Khalkin, *Radiobiol. Radiother.* 20, 412 (1979).
- [69] W.-G. Franke, Th. Schmiedel, A. Grundmann, U. Pöpel, K. Schomäcker, J. Gössel, *Nucl. Med.* 32, 188 (1993).
- [70] P. Vaupel, *NMR in Biomedicine* 5, 220 (1992).
- [71] S.M. Larson, Z. Grunbaum, J.S. Rasey, *Int. J. Nucl. Med. Biol.* 8, 257 (1981).
- [72] S.M. Larson, J. Rasey, D.R. Allen, Z. Grunbaum, *J. Nucl. Med.* 20, 843 (1979).
- [73] S. R. Vallabhajosula, J. F. Harwig, W. Wolf, *Int. J. Nucl. Med. Biol.* 8, 363 (1981).
- [74] S. R. Vallabhajosula, J. F. Harwig, J. K. Siemsen, W. Wolf, *J. Nucl. Med.* 21, 650 (1980).
- [75] J.S. Rasey, N.J. Nelson, S.M. Larson, *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 18, 661 (1982).
- [76] L. J. Anghileri, M.C. Crone, P. Thouvenot, F. Brunotte, C. Marchal, J. Robert, *Nucl. Med.* 23, 59 (1984).
- [77] R.L. Hayes, J.J. Rafter, B.L. Byrd, J.E. Carlton, *J. Nucl. Med.* 22, 325 (1981).
- [78] R. Sephton, *Int. J. Nucl. Med. Biol.* 8, 323 (1981).
- [79] A. Ando, I. Ando, K. Sakamoto, T. Hiraki, K. Hisada, M. Takeshita, *Eur. J. Nucl. Med.* 8, 440 (1983).
- [80] A. Ando, I. Ando, T. Hiraki, M. Takeshita, K. Hisada, *Eur. J. Nucl. Med.* 7, 298 (1982).
- [81] S. Kojima, Y. Hama, T. Sasaki, A. Kubodera, *Eur. J. Nucl. Med.* 8, 52 (1983).
- [82] L.J. Anghileri, *Z. Krebsforsch.* 81, 109 (1974).
- [83] R.A. Hickie, H. Kalant, *Cancer Res.* 27, 1053 (1967).
- [84] L.J. Anghileri, M. Heidbreder, *Oncology* 34, 74 (1977).
- [85] L.J. Anghileri, *J. Nucl. Biol. Med.* 17, 177 (1973).
- [86] K. Schomäcker, D. Mocker, R. Münze, G.-J. Beyer, *Appl. Radiat. Isot.* 39, 261 (1988).
- [87] A. Catsch, *Naturwissenschaften* 43, 242 (1956).
- [88] F. Gensicke, *Strahlentherapie* 118, 369 (1962).
- [89] K. G. Stern in *Rare Earths in Biochemical and Medical Research*, Oak Ridge, Eds.: F. Anderson, B. Elisabeth, 143 (1955).
- [90] B. Rosoff, R. Lewin, H. E. Hart, G. L. Williams, D. Laszlo, *Arch. of Biochem. Biophys.* 78, 1 (1958).
- [91] L. Ekman, E. Valmet, B. Aberg, *Int. J. App. Radiat. Isot.* 12, 32 (1961).

- [92] E. R. Birnbaum, J. E. Gomez, D. W. Darnhall, *J. Am. Chem. Soc.* 92(17), 5287 (1970).
- [93] A. Seidel, M. Vladoar, V. Volf, *Strahlentherapie* 140, 717 (1970).
- [94] J. Reuben, *J Biochem.* 10(15), 2834 (1971).
- [95] B. Rosoff, H. Spencer, *Clin. Chim. Acta* 93, 311 (1979).
- [96] G. Sosnovsky, N. Uma Maheswara Rao, J. Lukszo, R. Brasch, *Z. Naturforsch.* 41b, 1170 (1986).
- [97] E. Ohyoshi, S. Kohata, *J. Inorg. Biochem.* 52, 157 (1993).
- [98] P.J. Kelley, J.B. Bassingthwaite, *Fed. Proc.* 36, 2634 (1977).
- [99] A.G. Jones, M.D. Francis, M.A. Davis, *Sem. Nucl. Med.* 6, 3 (1976).
- [100] F. Rösch, S.M. Qaim, G. Stöcklin, *Appl. Radiat. Isot.* 44, 677 (1993).
- [101] V.A. Khalkin, N.A. Lebedev, *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 88(1), 153 (1985).
- [102] T. Peters, *Adv. Prot. Chem.* 37, 161 (1985).
- [103] U. Kragh-Hansen, *Pharmacological Reviews* 33(1), 17 (1981).
- [104] R.H. McMenamy in *Albumin Structure, Function and Uses*, Eds.: V.M. Rosenoer, M. Oratz, M.A. Rothschild, Pergamon Press, 143 (1977).
- [105] K. O. Pedersen, *Scand. J. clin. Lab. Invest.* 28, 459 (1971).
- [106] L.I. Irons, D.J. Perkins, *Biochem. J.* 84, 152 (1962).
- [107] H.A. Saroff, M.S. Lewis, *J. Phys. Chem.* 67, 1211 (1963).
- [108] P. Aisen, E.B. Brown, *Sem. Hemat.* 14, 31 (1977).
- [109] J.H. Brock in *Metalloproteins Part II*, Ed.: P.M. Harrison, Verlag Chemie, Weinheim, *Top. Mol. Struct. Biol.* 7, 183 (1985).
- [110] D.C. Harris and P. Aisen in *Iron Carriers and Iron Proteins*, Ed.: T.M. Loehr, VCH Publishers, New York, 239 (1989).
- [111] M.R. Schlabach, G.W. Bates, *J. Biol. Chem.* 6, 2182 (1975).
- [112] W.R. Harris, Y. Cheng, *J. Inorg. Biochem.* 54, 1 (1994).
- [113] W.R. Harris, D. Nessel-Toffelson, J.Z. Stenback, N. Mohamed-Hani, *J. Inorg. Biochem.* 38, 175 (1990).
- [114] N. Kojima, G.W. Bates, *J. Biol. Chem.* 256, 12034 (1981).
- [115] S.B. Nadler, J.U. Hidalgo, T. Bloch, *Surgery* 52, 22 (1962).
- [116] A.E. Martell, R.M. Smith, *Critical Stability Constants 1-6*, Plenum Press, New York, (1974-1989).
- [117] T.V. Beloedova, *Zhur. Neorg. Khim.* 17(6), 1580 (1972).
- [118] G. Thiele, *Handlexikon der Medizin*, Urban & Schwarzberg, München, 280 (1982).
- [119] J.F. Foster in *Albumin Structure, Function and Uses*, Eds.: V.M. Rosenoer, M. Oratz, M.A. Rothschild, Pergamon Press, 53 (1977).
- [120] E. Breslow in *Inorganic Biochemistry Vol.1*, Ed.: G.L. Eichhorn, Elsevier, New York, 227 (1973).
- [121] A. Ando, I. Ando, T. Hikari, K. Hisada, *Nucl. Med. Biol.* 16, 57 (1989).
- [122] J. Kutzner, G. Alfter, W. Grimm, *Nucl. Med.* 25, 78 (1986).
- [123] R.E. O'Mara, J.G. McAfee, G. Subramanian, *J. Nucl. Med.* 10, 49 (1969).

- [124] R.J. Hunter, *Foundations of Colloid Science* Vol.1, Clarendon Press Oxford, 450 (1986).
- [125] G. Scatchard, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 51, 660 (1949).
- [126] M. Walser, *J. Clin. Invest.* 40, 723 (1961).
- [127] S. W. Gunasekera, L. J. King, P. J. Lavender, *Clin. Chim. Acta* 39, 401 (1972).
- [128] F. Rösch, H. Herzog, C. Plag, B. Neumaier, U. Braun, H.-W. Müller-Gärtner, G. Stöcklin, *J. Nucl. Med.* (1995), im Druck.
- [129] A.A. Keeling, A.T.M. Vaughan, R.P. Beaney, *Br. J. Cancer* 60, 74 (1989).
- [130] A.S. Posner, F. Betts, *Acc. Chem. Res.* 8, 273 (1975).
- [131] R.S. Robinson, M.L. Watson, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 60, 596 (1955).
- [132] J. Jowsey, R. E. Rowland, J. H. Marshall, *Rad. Research* 8, 490 (1958).
- [133] J. Jowsey, H.A. Sissons, J. Vaughan, *J. Nucl. Energy* 2, 168 (1965).
- [134] A. van Langevelde, O.M.J. Dreisser, E.K.J. Pauwels, C.W. Thesing, *Eur. J. Nucl. Med.* 2, 47 (1977).
- [135] D. Chirby, S. Franck, D. E. Troutner, *Appl. Radiat. Isot.* 39(6), 495 (1988).
- [136] E.N. Baker, P.F. Lindley, *J. Inorg. Biochem.* 47, 147 (1992).
- [137] W.R. Harris, *Inorg. Chem.* 25, 2041 (1986).
- [138] G. Wunderlich, G. Knop, G. Kampf, W.-G. Franke, *Nucl.Med.* 34, A121 (1995).
- [139] B. Meloun, L. Moravek, V. Kosta, *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.* 58, 134 (1975).
- [140] R.T.A. MacGillivray, E. Mendez, S. K. Sinha, M.R. Sutton, J. Lineback-Zins, K. Brew, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 2504 (1982).

8 Danksagungen

Herrn Prof. Dr. G. Stöcklin danke ich herzlich für die interessante Themenstellung und wertvolle Anregungen.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank Herrn PD Dr. F. Rösch für die intensive Betreuung, tatkräftige Unterstützung und viele gewinnbringende Diskussionen während der Durchführung dieser Arbeit.

Ferner bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. S.M. Qaim für seine Diskussionsbereitschaft in kernchemischen Fragen.

Auch danke ich den Betriebsgruppen des Kompaktzyklotrons CV 28 und des Babyzyklotrons des Instituts für Nuklearchemie des Forschungszentrums Jülich GmbH für die Durchführung der Bestrahlungen.

Zudem danke ich Herrn W. Wutz für die Durchführung tierexperimenteller Studien.

Des weiteren möchte ich mich auch für die fruchtbare Zusammenarbeit bei den Mitarbeitern des IME, insbesondere Herrn PD Dr. H. Herzog bedanken.

Auch danke ich besonders herzlich unseren Partnern am Vereinigten Institut für Kernforschung in Dubna (Rußland) Herrn Dr. A.F. Novgorodov und Herrn Dr. N.A. Lebedev für die Bereitstellung verschiedenster Radionuklide und die gesamte Kooperation.

In diesem Zusammenhang danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Gewährung der Reise nach Rußland im Rahmen der DFG-Sachmittelbeihilfe Ro 985/2-1.

Überdies gilt mein Dank meinen Laborkollegen Dipl. Chem. J. Brockmann, Dipl. Chem. F.-O. Denzler und speziell Dipl. Chem. A. Klein für ihre ständige Hilfsbereitschaft. Auch bei Herrn Dipl. Chem. H.-J. Wester bedanke ich mich für zahlreiche Ratschläge und Diskussionen.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Dipl. Chem. R. Klopries für die sehr sorgfältige Durchsicht des Manuskripts und die angenehme Zusammenarbeit bedanken.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei allen anderen namentlich nicht genannten Institutsangehörigen für die gute Arbeitsatmosphäre und vielfältigen Hilfestellungen.

Jül-3236
Juni 1996
ISSN 0944-2952