Klinik für Nuklearmedizin
Universitätsklinikum Ulm
Professor Dr. med. Sven N. Reske

Bestimmung der Verweildauern von ^{111}In-markierten anti-CD66 und anti-CD45 Antikörpern im Rahmen der Konditionierung vor Blutstammzelltransplantation

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Marguerite Müller
geboren in Sigmaringen

2007

Amtierender Dekan: Prof. Dr. med. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Glatting

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Marx

Tag der Promotion: 18.12.08

Für Janbert

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Grundlagen der Behandlung von Leukämien 2

1.1.1 Chemotherapie 2

1.1.2 Ganzkörperbestrahlung 3

1.1.3 Knochenmarkstransplantation, Blutstammzelltransplantation. 3

1.2 Andere Indikationen für PBSCT 5

1.3 Biologische Wirkung radioaktiver Strahlung.....5

1.4 Radioimmuntherapie, Markierung von Antikörpern.....7

1.4.1 Markierung von Antikörpern.....8

1.4.2 Dosimetrie.....10

2 Material und Methode 14

2.1 Patientenkollektiv 14

2.2 Radioimmuntherapie, Markierung von Antikörpern.....14

2.3 Unterschiede CD66, CD45.....16

2.4 Das Radionuklid ^{90}Y.....17

2.5 Ablauf der Dosimetrie ……...…..……...18

2.6 Gammakameraaufnahmen …….....…..…….....20

2.7 Die UlmDos Software und Unterschiede NSC, TEW.....21

2.8 Statistik.....22

3 Ergebnisse 23

3.1 Verteilung CD45, ^{111}In.....23

3.2 Verteilung CD66, ^{111}In.....28

3.3 Unterschiede NSC, TEW.....33

3.4 Unterschiede kalter Antikörper.....35

3.5 Unterschiede Belegungsgrad.....37

3.6 Vergleich CD45, CD66 38

4 Diskussion.. 39

5 Zusammenfassung 44

6 Literaturverzeichnis 46

Dank 51

Tabellarischer Lebenslauf 52

Abkürzungsverzeichnis

ALL = Akute Lymphatische Leukämie

AMG = Arzneimittelgesetz

AML = Akute Myeloische Leukämie

CD = Cluster of Differentiation

DNA = Desoxyribonucleic Acid

DTPA = Diethylene Triamine Pentaacetic Acid

Fab = Fragment, antigen binding

Fc = Fragment, crystallizable

Gl. = Gleichung

GMP = Good Manufacturing Practice

GvHD = Graft versus Host Disease

GvL = Graft versus Leukaemia

Gy = Gray

HEPES = N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N’-(2-ethanesulfonic acid)

HPLC = High-Performance Liquid Chromatography

i.v. = intravenös

IgG = Immungloblin G

In = Indium

kD = Kilodalton

keV = Kiloelektronenvolt

KG = Körpergewicht

KM = Knochenmark

KMT = Knochenmarktransplantation

LWK = Lendenwirbelkörper

MBq = Megabecquerel

MDS = Myelodysplastisches Syndrom

MIRD = Medical Internal Radiation Dose

NSC = No Scatter Correction

p.i. = post injection

PBSCT = Peripheral Blood Stem Cell Transplant

Re = Rhenium

RIT = Radioimmuntherapie

ROI = Region of Interest

SCID = Severe Combined Immunodeficiency

SNM = Society of Nuclear Medicine

TEW = Triple Energy Window

Y = Yttrium

Z.n. = Zustand nach

1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit untersucht die Dosimetrie von ^{111}In- und ^{188}Re-markierten anti-CD66 und anti-CD45 Antikörpern zur Behandlung Leukämie-kranker Patienten vor einer Stammzelltranspantation.

Die Knochenmarktransplantation (KMT) ist eine weit verbreitete und effektive Therapiemöglichkeit zur Behandlung von Leukämie, wobei heutzutage hauptsächlich periphere Blutstammzellen transplantiert werden. Ein großes Problem ist jedoch die hohe Rezidivrate nach einer solchen Transplantation. Intensive Vorbehandlung mit Chemotherapeutika und Ganzkörper-Bestrahlung reicht nicht immer aus, um alle Tumor-Zellen vor einer peripheren Blutstammzelltransplantation (PBSCT) abzutöten. Dadurch kommt es bei Patienten, die jenseits der ersten Remission oder im Rezidiv transplantiert werden, bei 40-60% zum Rezidiv (7). Höhere Dosen an Ganzkörper-Bestrahlung können das Rezidivrisiko senken, jedoch nicht die Gesamtüberlebensrate, aufgrund der erhöhten Organtoxizität vor allem der Leber (7). Eine zusätzliche Behandlung mit radioaktiv markierten Antikörpern, welche sich an oder in der Nähe der Tumorzellen anreichern, kann die schädigende Wirkung gezielt auf diese Zellen erheblich steigern. Hierfür können entweder Antikörper verwendet werden, die speziell an diese Tumorzellen binden oder solche, die zwar an andere Zellen binden, sich aber dann in den Gebieten der höchsten Tumorzelldichte (Knochenmark und Milz) anreichern. Bei Patienten, die sich solch einer Behandlung unterziehen, muss vorab eine genaue Dosimetrie durchgeführt werden, um die absorbierte Strahlungsdosis der wichtigsten Organe möglichst genau voraussagen zu können. Bei einer Dosimetrie wird dem Patienten eine geringe Menge, etwa 100 MBq ^{111}In, des radioaktiv markierten Antikörpers injiziert und dessen Verteilung im Körper über einen Zeitraum von bis zu 7 Tagen beobachtet. Hierzu werden zu 6 Zeitpunkten (2, 4, 24, 48, 72, und 144 h p.i.) Bilder mit der Gammakamera erstellt, welche aus dem Patienten austretende Gammastrahlung misst. Daraus wird dann die voraussichtlich absorbierte Energiedosis der einzelnen Organe bei einer folgenden Therapie errechnet. Eine hohe Energiedosis in Knochenmark und Milz ist erwünscht, wohingegen die Leber und die Niere die kritischen Organe sind, die ungewollt mitbelastet werden. Wenn an einem der

kritischen Organe die absorbierte Dosis bestimmte Werte überschreitet, ist eine Radioimmuntherapie bei diesen Patienten nicht sinnvoll.

Das Ziel dieser Arbeit liegt in der Untersuchung der Biokinetik der unterschiedlichen Nuklide und Antikörper anhand der Verweildauern und deren Abhängigkeit von verschiedenen Parametern als Voraussetzung für die mögliche Optimierung der Dosimetrie sowie der anschließenden Therapie.

1.1 Grundlagen der Behandlung von Leukämien

Leukämie ist eine Krebserkrankung des blutbildenden Systems. Sie ruft in der Regel eine Überproduktion von weißen Blutkörperchen hervor. Man unterscheidet zwischen akuten Leukämieformen, die schnell und heftig auftreten, und chronischen, die langsam fortschreiten.

1.1.1 Chemotherapie

Bei der Therapie mit Zytostatika werden 4 verschiedene Therapieansätze unterschieden. Die Remissions- bzw. Induktionstherapie, die Konsolidierungstherapie, die Erhaltungstherapie und die Rezidivtherapie. Das Ziel der Remissions- bzw. Induktionstherapie ist die komplette Remission, was bedeutet, dass mit konventionellen Methoden keine Tumorzellen mehr nachgewiesen werden können. Geschätzt können zu diesem Zeitpunkt noch 10^8-10^9 maligne Zellen im Körper existieren, was bedeutet, dass, wenn vor Therapie 10^{11} Tumorzellen vorlagen, ca. 99,9% vernichtet wurden. Eingesetzt wird hierfür z.B. eine Kombination aus einem Anthrazyklin mit Zytosin-Arabinosid und 6-Thioguanin nach einem festen Schema. Vorraussetzung für eine solche Therapie ist eine optimale Infektionsprophylaxe (z.B. Schleusenpflege), da es hierbei zu einer Knochemarksaplasie mit Agranulozytose und Thrombozytopenie kommt.
Bei einer Konsolidierungstherapie soll die durch eine Induktionstherapie erreichte komplette Remission stabilisiert werden und residuale Blasten vernichtet werden. Dies erreicht man entweder durch eine Wiederholung der intensiven Induktionstherapie oder durch eine Knochenmark- bzw. Stammzelltransplantation.

Die Erhaltungstherapie hat eine Stabilisierung der Remission zum Ziel, indem man residuale Blasten an der Proliferation hemmt.
Die Rezidivtherapie beschreibt die Therapie bei einem Rezidiv, wo das Erreichen einer weiteren kompletten Remission sehr viel schwieriger ist als bei der Ersttherapie. Deshalb wird bei Erreichen einer zweiten Remission nach Rezidiv möglichst eine allogene Fremdspendertransplantation angestrebt (24).

1.1.2 Ganzkörperbestrahlung

Die Ganzkörperbestrahlung wird im Rahmen von Hochdosistherapien bei bestimmten Leukämien und Lymphomen eingesetzt, wobei der gesamte Körper des Patienten bestrahlt wird. Die Bestrahlung erfolgt als Teil der Konditionierung, d. h. zur Beseitigung des körpereigenen Knochenmarks vor der sich anschließenden Knochenmark- oder Stammzelltransplantation. Ziel der Bestrahlung ist die Abtötung der strahlenempfindlichen Leukämie- oder Lymphomzellen und die Zerstörung der Knochenmarkzellen und des Immungedächtnisses, um das Anwachsen der Spenderzellen zu ermöglichen. Dies ist die Voraussetzung insbesondere bei der allogenen Transplantation. Die Dosis bei der Ganzkörperbestrahlung ist unterschiedlich. Meist wird in einem Bereich von 4-12 Gy bestrahlt. Ab einer Ganzkörperdosis von 4 Gy ist eine anschließende Stammzelltransplantation jedoch lebensnotwendig. Da besonders die Lunge sehr empfindlich gegenüber Strahlung ist, muss diese ab einer Gesamtdosis von 8 Gy durch spezielle Abschirmtechniken geschont werden.

1.1.3 Knochenmarktransplantation, Blutstammzelltransplantation

Die Knochenmarktransplantation ist eine Therapie, die eine komplette Heilung der Leukämie und anderer hämatopoietischer Erkrankungen ermöglicht. Hierbei werden zwei Methoden unterschieden. Die allogene- und die autologe KMT. Bei der allogenen KMT wird einem HLA-identischen Spender, meist ein Familienmitglied, ca. 1 Liter Knochenmark entnommen und nach Aufarbeitung dem Empfänger i.v. appliziert. Die autologe KMT wird nur noch selten durchgeführt. Stattdessen verwendet man autologe Blutstammzellen aus dem peripheren Blut des Patienten, die man durch vorherige Stimulation mit G-CSF erhält. Auch bei der allogenen Transplantation werden heutzutage

hauptsächlich peripher gewonnene Stammzellen verwendet. Der Vorteil der allogenen Stammzelltransplantation eines gesunden Spenders liegt zum einen an der Sicherheit eines leukämiefreien Transplantats und zum anderen an der Transplantat-gegen-Leukämie-Reaktion (GvL) (6).

Vor jeder Transplantation muss eine myeloablative Therapie erfolgen, bei der nahezu alle blutbildenden Zellen des Patienten vorher vernichtet werden müssen.

Eine Stammzelltransplantation ist sehr risikoreich für den Patienten. Zum einen besteht vor allem während der ersten zwei Wochen eine sehr hohe Infektionsgefahr, da zu dieser Zeit die eigenen Zellen der Immunabwehr zerstört sind und es eine Zeit braucht, bis die Spenderzellen in ausreichender Zahl zur Verfügung stehen. Daher ist während dieser Zeit eine drastische Minderung der Infektionsgefahr nötig. Um den Patienten zum Beispiel vor Umgebungskeimen zu schützen, werden spezielle Isolationsmaßnahmen ergriffen. Hierzu zählt die Unterbringung in einem Einzelzimmer mit Schleuse, das medizinische Personal und Besucher müssen Schutzkittel und Mundschutz tragen, die Nahrung muss keimarm hergestellt oder in schweren Fällen gar sterilisiert werden und insgesamt muss die Anzahl der Kontaktpersonen bzw. Besucher so klein wie möglich gehalten werden.

Eine weitere Infektionsquelle stellt der Patient selber, durch Haut- und Darmkeime, dar. So muss seine Kleidung und Bettwäsche täglich gewechselt werden, Körper und Haare täglich mit Desinfektionslösungen gewaschen werden, und vor allem muss er auf eine gründliche Reinhaltung seiner Hände achten. Zusätzlich werden mehrmals täglich antimykotische Mundspülungen durchgeführt und auf eine ausreichende Prophylaxe mit Antibiotika, Antimykotika und Virostatika geachtet.

Weiterhin muss z.B. durch regelmäßiges Fiebermessen auf mögliche Infektionen geachtet werden, um diese dann möglichst früh zu erkennen und behandeln zu können.

Bei all diesen drastischen Maßnahmen ist es wichtig, den Patienten im Vorfeld genau zu informieren und ihm die Wichtigkeit der Maßnahmen zu erklären. Auch muss man darauf achten, dass er nicht zu sehr sozial isoliert wird und man muss sich nicht nur körperlich sondern auch psychisch um ihn kümmern, da die gesamte Situation eine starke Belastung darstellt.

Ein weiterer großer Risikofaktor bei der PBSCT ist die graft-versus-host-Reaktion, bei der es sich um eine Abstoßungsreaktion, der weißen Blutkörperchen des Transplantats gegen Zellgewebe des Empfängers handelt (24). Besonders häufig tritt die GvHD nach einer Stammzelltransplantation mit sehr aggressivem vorherigem Konditionierungsschema auf.

So wurden bei besonders aggressiven Transplantationsschemata therapieassoziierte Mortalitäten von bis zu 64% beschrieben (6).

Ein großes Problem nach PBSCT ist das Rezidiv der Erkrankung, welches daran liegt, dass die myeloablative Therapie vor der PBSCT nicht alle Tumorzellen abgetötet hat und residuale Blasten zu einem Rezidiv geführt haben. Um dies zu verhindern, versucht man die myeloablative Therapie möglichst effektiv zu gestalten. Hierfür wurden bisher eine starke Chemotherapie und eine Ganzkörperbestrahlung durchgeführt. Das Problem bei der Ganzkörperbestrahlung liegt darin, dass man keine genügend hohe Dosis in den hämatopoietischen Organen erreichen kann, da sonst die Toxizität auf die restlichen Organe, die geschont werden sollten, zu hoch wird. Die RIT ist hierbei eine sehr erfolgversprechende Therapiealternative oder Zusatztherapie, da sie durch radioaktive Markierung spezifischer Antikörper eine hohe Strahlendosis in die hämatopoietischen Zielorgane transportieren und dabei die restlichen Organe schonen kann (s. Abschnitt 4.2).

1.2 Andere Indikationen für PBSCT

In Studien wurde gezeigt, dass Stammzelltransplantation auch bei anderen Krankheiten zur Besserung und Heilung führen kann. Ein Beispiel hierfür sind SCID (29), Beta-Thalassämie (23), und hämolytische Anämie, die in dieser Arbeit mit berücksichtigt wurden.

1.3 Biologische Wirkung radioaktiver Strahlung

Generell sind die radiobiologischen Prinzipien von externer und interner Bestrahlung ähnlich, jedoch handelt es sich bei externer Bestrahlung meist um Photonen-Strahlung, während die Strahlung, die bei der Therapie mit Radionukliden von Bedeutung ist, aus Teilchen besteht (16).

γ-und β-Strahlen aktivieren beide mitochondriale Pfade der Apoptose jedoch mit unterschiedlicher Kinetik und Dosisrate. Bei γ-Strahlung zeigt sich eine schnellere Einleitung der Apoptose, wobei sich β-Strahlen effektiver zeigen in der Apoptose-

Induktion bei kleineren Dosen. Resistenzen gegenüber Apoptose scheinen auf die Induktion von DNA-Reparaturmechanismen zurückzuführen zu sein (17).

α-Teilchen haben eine Energie im Bereich von 5-9 MeV und eine Reichweite im Gewebe von 5-10 Zell-Durchmessern. Sie bewegen sich geradeaus und geben hierbei eine Energie von 80-100 keV/μm ab, wobei sich diese Energieabgabe zum Ende der Strecke hin bis auf 300 keV/μm steigert (16).

β-Teilchen spielen zurzeit die Hauptrolle in der internen Bestrahlung. Es handelt sich hierbei um schnelle Elektronen, die aus einem zerfallenden Kern emittiert werden. Sie haben eine Reichweite im Gewebe von bis zu 1 cm und geben hierbei eine Energie ab von ~0.2 keV/μm. Aufgrund der hohen Reichweite kommt hier der Kreuzfeuer-Effekt, bei dem Zellen in der Nähe der eigentlich markierten Zelle bestrahlt werden, besonders zur Geltung (16).

Das Hauptziel der ionisierenden Strahlung ist die DNA, welche entweder direkt durch die Strahlen geschädigt wird oder durch entstandene freie Radikale. Hierbei entstehen z.B. Einzel- oder Doppelstrangbrüche, oder Schäden an den Basen der DNA. Ein Phänomen der bestrahlten Zelle ist die Verzögerung des Zellzyklus, wobei Zellen, die sich im prämitotischen Stadium G2 befinden, die größte Verzögerung aufweisen, solche im G1 Stadium eine mittlere Verzögerung, jene im S Stadium nur noch eine mäßige Verzögerung aufweisen und Zellen, die sich gerade in der Mitose befinden, sich ungestört weiter teilen. Kann die Zelle den Schaden an der DNA nicht reparieren, so durchläuft sie im Allgemeinen einen programmierten Zelltod. Die Wahrscheinlichkeit der Apoptose ist bei lymphatischen Zellen höher als bei epithelialen, was den Erfolg der Radioimmuntherapie speziell bei Lymphomen erklärt. Jedoch ist die Entstehung von Strahlenschäden an menschlichen Zellen noch nicht komplett geklärt, da es Phänomene wie den ‚bystander effect' gibt, bei dem benachbarte der bestrahlten Zellen, die aber selbst keine Strahlung abbekommen, auch untergehen. Diese stellen die Theorie infrage, dass Schäden nur durch direkte Strahleneinwirkung oder freie Radikale entstehen (16).

1.4 Radioimmuntherapie

Die Radioimmuntherapie ist eine besondere Form der Radiotherapie von Leukämien. Sie verwendet radiomarkierte monoklonale Antikörper, um gezielt leukämische Zellen bzw. Zellen des hämatopoetischen Knochenmarks abzutöten (7). Heutzutage werden für die Radioimmuntherapie hauptsächlich intakte Antikörper vom IgG Typ verwendet, die man sich als Y-förmige Strukturen vorstellen kann. Sie besitzen ein Molekulargewicht von ca. 150 kD, wobei die zwei Fab Fragmente und das konstante Fc Fragment jeweils 50kD haben. Der für die Antigenbindung verantwortliche Teil des Antiköpers ist der variable Teil der beiden Fab Fragmente.

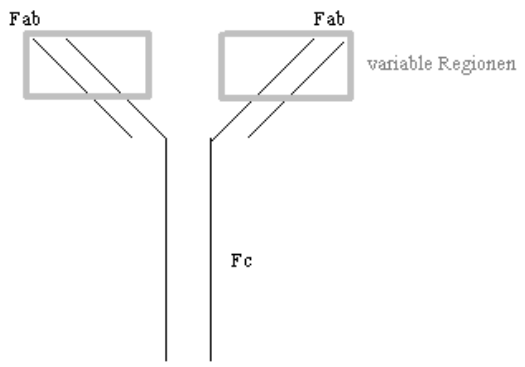

Abb. 1 Schema eines Antikörpers wobei Fab (Fragment, antigen binding) für die Antigenbindende Region steht und Fc für die kristalline Region (Fragment, crystallizable).

Es ist auch möglich, statt intakter Antikörper nur Antikörperfragmente zu benutzen, bei denen die Antigenspezifität und Bindungsaffinität noch erhalten ist. Das Problem bei diesen Fragmenten ist allerdings, dass sie wegen des geringen Molekulargewichts sehr schnell glomerulär filtriert werden und dadurch zu einer zu niedrigen Zielgewebsdosis führen würden(6).

Ein Vorteil gegenüber der konventionellen Radiotherapie liegt in der hohen Selektivität und großen lokalen Schädigung leukämischer Zellen bei gleichzeitiger Schonung der Normalgewebe. Dies wird ermöglicht durch die gute Zugänglichkeit des Kompartiments leukämischer Stammzellen im Knochenmark und der hohen Strahlenempfindlichkeit leukämischer Zellen. Durch tumorselektive Immunglobuline oder Immunglobulinfragmente und der Wahl des geeigneten Therapienuklids (β-, oder α-Strahler) kann das Zielvolumen direkt adressiert werden, wobei durch den ‚crossfire'- und/oder ‚bystander'-Effekt noch viele Tausend, dem adressierten Zelltyp benachbarte Zellen eradiziert werden können. Ein Beispiel hierfür sind Zielantigen-negative leukämische Zellen und leukämische Stammzellen im Knochenmark.

Die Radioimmuntherapie ist eine weitere Möglichkeit zur Therapie chemoresistenter oder immunologisch refraktärer Leukämien, durch ihre fehlende Kreuzresistenz mit Chemotherapeutika und ihre Fähigkeit auch chemotherapeutisch schlecht zugängliche Reservoirs wie das Zentralnervensystem oder den Hoden zu sanieren (7).

1.4.1 Markierung von Antikörpern

Die Markierung der monoklonalen Antikörper erfolgt mit einer großen Vielfalt an Radiometallen und Radiohalogenen. Bei der Auswahl des Nuklids sind die Zerfallsart und Halbwertszeit wichtige Kriterien. So sind Nuklide, die α- oder β-Strahlen emittieren, zur Bestrahlung von Volumina mit multizellulären, zellulären und subzellulären Dimensionen gut geeignet. Auch ein wichtiges Kriterium bei der Radiomarkierung ist die Stabilität der Verbindungen (7). So hat es sich gezeigt, dass Nuklid-Antikörper Verbindungen von geringerer Stabilität eine erhöhte Nierentoxizität aufweisen (8).

Prinzipiell werden Antikörper entweder mit Metallen (z.B. ^{188}Re) oder mit Halogenen (z.B. ^{131}I) markiert. Bei manchen Nukliden kann die Markierung des Antikörpers direkt erfolgen und bei anderen erfordert es den Einsatz von bifunktionellen Liganden.

Zur Markierung des Antikörpers mit Rhenium werden hauptsächlich Direktmarkierungsverfahren verwendet. Dieses Verfahren erfordert die Reduzierung intramolekularer Disulfidbrücken der Antikörper, welche dann eine hohe Affinität zu

Rhenium aufweisen. Reduziert wird der Antikörper mit Tris-(2-carboxyethyl)phosphin und dann in Gegenwart von Zinn und Methylendiphosphonat mit einer $[^{188}Re]ReO_4^-$Lösung mit dem ^{188}Re markiert. Durch diese Bindungsart zeigt Rhenium jedoch eine hohe Reoxidationstendenz und somit auch Instabilität. Daher werden bei der Therapie lieber Radiometallmarkierungsmethoden mit bifunktionellen Liganden, die mit Hilfe eines Chelatorkomplexes, welcher einerseits zur koordinativen Bindung des Radiometalls und andererseits zur kovalenten Bindung an den Antikörper führt, verwendet. Dadurch wird eine höhere Stabilität des Antikörper-Nuklid-Komplexes erreicht. Für ^{111}In und ^{90}Y werden hauptsächlich Chelatoren verwendet, die zur Gruppe der Polyamincarbonsäuren gehören. Der hierbei am häufigsten verwendete Ligand ist (2-(p-SCN-Bz)-6methyl-DTPA).

Die Methylgruppe hat zur Folge, dass die Anordnung des freien Liganden im freien Komplex dem Radiometall-Komplex ähnelt. Dieses Prinzip nennt man Präorganisation, welches in der Synthese von Makrozyklen wie DOTA weiterentwickelt wurde. Durch den makrozyklischen Effekt wird eine noch höhere Stufe der Präorganisation und damit der Komplexstabilität erreicht. Die Starrheit dieser Komplexe hat eine niedrige Transchelierung und Abdissoziation zur Folge. Weiterhin wichtig ist für die nuklearmedizinische Anwendung eine rasche Markierbarkeit sowie eine hohe Inertheit.

Die in vivo Stabilität (Biodegradation und Radiometall-Freisetzung) des Radioimmunkonjugats kann nach Applikation durch Serumanalysen mittels Gelausschlusschromatographie kontrolliert werden (7). Zur Sicherung der Anforderungen der verwendeten Radiopharmaka wird eine GMP- und AMG-konforme Arzneimittelproduktion durchgeführt. Hierbei wird zunächst der Antikörper mit dem bifunktionellen Liganden konjugiert und anschließend mit dem Radiometall markiert, welches vorher z.B. im Zyklotron produziert wurde. Darauf folgen eine Entkeimungsfiltration und eine Qualitätskontrolle, bei der Radioimmunreaktivität, radiochemische Reinheit, chemische Reinheit, Endotoxingehalt und Sterilität überprüft werden. Die Ergebnisse werden dokumentiert (GMP-Dokumentation) und schließlich erfolgt die in vivo Evaluation und Metabolitenanalyse.

Um optimales und reproduzierbares Verhalten der markierten Antikörper bei der klinischen Anwendung zu erhalten, ist es wichtig, das Verhältnis zwischen der Wirksamkeit und der Anzahl der Liganden pro Molekül zu ermitteln. Um diesen Belegungsgrad zu ermitteln, gibt es verschiedene analytische Methoden (22).

1.4.2 Dosimetrie

1976 wurde von der Arbeitsgruppe „Medical Internal Radiation Dose“ (MIRD) der Nuklearmedizinischen Gesellschaft der USA (SNM) der Formalismus für die Abschätzung der Strahlendosis entwickelt (19). Danach müssen zur Bestimmung der Strahlendosis im Patienten zwei Komponenten, (Strahlen)Physik und Biologie, berücksichtigt werden. Zur physikalischen Komponente zählen die applizierte Aktivität sowie die räumliche und zeitliche Verteilung der Deposition der beim Zerfall abgegebenen Energie um den Ort des Zerfalls. Diese sind abhängig von der Energie der verschiedenen Zerfallswege und deren Wahrscheinlichkeit für das eingesetzte Nuklid. Zur biologischen Komponente gehören die Form und Masse der Organe, die Lagebeziehungen zwischen strahlenden und bestrahlten Organen sowie die Biodistribution und Biokinetik der verwendeten radioaktiven Substanz.

Die mittlere absorbierte Energie-Dosis wird durch folgende Gleichung abgeschätzt (1).

$$\overline{D} = \frac{\tilde{A} \cdot \Delta \cdot \phi}{m} = \tilde{A} \cdot S \quad ; \quad S = \frac{\Delta \cdot \phi}{m} \qquad \text{(Gleichung 1)}$$

Dabei ist $\overline{D}$ die mittlere absorbierte Dosis in Gray (Gy = J/kg), $\tilde{A}$ die Gesamtzahl der Zerfälle (Bq · s), Δ die mittlere emittierte Energie pro Zerfall, ϕ der Anteil der emittierten Energie, welcher in der Quellenregion emittiert wurde und in der Zielregion absorbiert wird, und m steht für die Masse des Zielvolumens. Der Wert *S*, der mittleren absorbierten Dosis pro Zerfall, fasst die physikalischen und geometrischen Anteile zusammen.

Durch Integration kann die gesamte Anzahl an Zerfällen $\tilde{A}$ im Zeitintervall [*t1*,*t2*] aus der Zeit-Aktivitäts-Kurve berechnet werden:

$$\tilde{A} = \int_{t1}^{t2} A(t)dt \qquad \text{(Gl. 2)}$$

Bezieht man die Gesamtzahl an Zerfällen $\tilde{A}$ auf die dem Patienten applizierte Aktivität A_0 so folgt für die mittlere absorbierte Dosis

$$\overline{D} = A_0 \cdot \tau \cdot S \quad ; \quad \tau = \frac{\tilde{A}}{A_0} \qquad \text{(Gl. 3)}$$

mit der Verweildauer τ .

Bei den obigen Definitionen wurde nur von einer einzigen Quellenregion ausgegangen. Lässt man mehrere Quellenregionen *h* zu und betrachtet die Dosis in einer Zielregion *k* so folgt

$$\overline{D}_k = A_0 \sum_h \tau_h \cdot S_{h \to k} \quad . \qquad \text{(Gl. 4)}$$

Sind zusätzlich mehrere Zerfallswege möglich, so muss die mittlere emittierte Energie Δ_i pro Zerfallsweg *i* und der zugehörige Anteil ϕ_i der emittierten Energie, welcher in der Quellenregion emittiert wurde und in der Zielregion absorbiert wird, im Wert S berücksichtigt werden:

$$S_{h \to k} = \sum_i \frac{\Delta_i \, \phi_{i,h \to k}}{m_k} \quad . \qquad \text{(Gl. 5)}$$

Der Index *i* läuft dabei über alle Zerfallswege. Tabellen mit den Werten für Δ_i für eine Vielzahl von Radionukliden können in verschiedenen Publikationen gefunden werden. Die absorbierten Anteile ϕ_i können entweder analytisch – im Falle einfacher Geometrien und homogener Medien – oder mittels Monte-Carlo-Methoden bestimmt werden. Hierbei handelt es sich um ein Verfahren aus der Stochastik, bei dem sehr häufig durchgeführte Zufallsexperimente die Basis darstellen. Es wird aufgrund der Ergebnisse versucht, mit Hilfe der Wahrscheinlichkeitstheorie analytisch unlösbare Probleme im mathematischem Kontext numerisch zu lösen.

Für eine quantitative Bestimmung der Aktivitätsverteilung müssen verschiedene Effekte, welche die Bildqualität beeinflussen, beachtet und korrigiert werden. Als Nachteil der Gammakameras bleibt deren relativ schlechte räumliche Auflösung, welche durch eine Halbwertsbreite von etwa 10 mm bestimmt ist. Wichtige Korrekturen sind zudem die Streukorrektur (z.B. die hier durchgeführte TEW-Methode) und die Schwächungskorrektur. Zusätzlich erschweren hochenergetische Photonen, welche die Septen durchdringen, und das, aufgrund der niedrigen Impulszahlen erhebliche Rauschen, die Quantifizierung. Eine wichtige Rolle spielt gerade bei kleineren Organen auch die Untergrundaktivität in den Geweben vor und hinter der akkumulierenden Läsion. Deshalb lässt sich die Aktivität vor allem in kleinen Läsionen nur sehr ungenau zu bestimmen.

Wegen der Überlagerung verschiedener Gewebe und der geringen Auflösung wird bei den Auswertungen immer von einer homogenen Aktivitätsverteilung in den Geweben ausgegangen. Eine solche Nährung trifft nur selten zu. Zudem können aufgrund der oben genannten Limitationen die Organvolumina nur sehr ungenau aus den Gamma-Kamera-Aufnahmen geschätzt werden.

Da die verschiedenen Messungen zur Erfassung der Biokinetik über mehrere Tage erfolgen, sollte auf die Konstanz der Empfindlichkeit jedes Kamerakopfes geachtet werden. Dies erfolgt üblicherweise durch die Messung eines Aktivitäts-Standards zusammen mit dem Patienten. Abgesehen von dem Zerfall des Nuklids im Standard muss der gemessenen Aktivitätsstandard konstant bleiben (12).

Planare Aufnahmen mit Zweikopf-Kameras werden am häufigsten eingesetzt (13, 27). Bei gegenüberliegenden Kameraköpfen kann das geometrische Mittel als erste Näherung für die Aktivität im entsprechenden Pixel verwendet werden. Die Abhängigkeit der gemessenen Zählrate I_{PQ} [Impulse/s] von der Aktivität A_{PQ} [MBq] einer Punktquelle PQ lautet:

$$I_{PQ} = C \cdot A_{PQ} \cdot e^{-\mu_e x} \qquad \text{(Gl. 6)}$$

Dabei ist C der Kalibrierfaktor [Impulse/MBq/s] des Kamerakopfes, μ_e [1/cm] der effektive lineare Schwächungskoeffizient und x [cm] die Tiefe der Punktquelle im untersuchten Körper. Das geometrische Mittel der Zählraten G [Impulse/s] bei zwei gegenüberliegenden Kameraköpfen und einer Dicke des untersuchten Körpers D [cm] kann deshalb nach

$$G = \sqrt{I_a \cdot I_p} = A_{PQ} \cdot C \cdot \sqrt{e^{-\mu_e x} \cdot e^{-\mu_e (D-x)}} = A_{PQ} \cdot C \cdot e^{-\mu_e D/2} \qquad \text{(Gl. 7)}$$

berechnet werden. Dabei sind I_a und I_p die anterior und posterior gemessenen Zählraten und $C = \sqrt{C_a \cdot C_p}$ der Kalibrierfaktor für das geometrischen Mittel der beiden Kameraköpfe. Die Auflösung von Gl. 7 nach der gesuchten Aktivität der Punktquelle führt sofort auf

$$A_{PQ} = \frac{\sqrt{I_a \cdot I_p}}{C} e^{\mu_e D/2} \qquad \text{(Gl. 8)}$$

Somit wird zur Bestimmung der Aktivität einer Punktquelle mittels zweier gegenüberliegender Kameraköpfe nur die Dicke des untersuchten Körpers benötigt, unter der Annahme, dass die Empfindlichkeit des Kamerakopfes nicht vom Abstand der Punktquelle vom Kamerakopf abhängt. Dies ist nur näherungsweise richtig und tatsächlich kann der Fehler – je nach eingesetztem Nuklid, Energiefenster und Kollimator – bezogen auf die Mittellage der Punktquelle durchaus bis zu 100% betragen.

Im Falle einer ausgedehnten Quelle muss bei der Berechnung der Aktivität in der Quellenregion A_R [MBq] zusätzlich noch der Selbstschwächungsfaktor f berücksichtigt werden

$$A_R = \frac{\sqrt{I_a \cdot I_p}}{C} e^{\mu_e D/2} f \quad ; \quad f = \frac{\mu_e d_R/2}{\sinh(\mu_e d_R/2)} \quad . \qquad \text{(Gl. 9)}$$

Dabei ist d_R [cm] die Dicke der betreffenden Quellenregion. Bei der Herleitung dieser Beziehung wurde allerdings explizit angenommen, dass außerhalb der Quellenregion keine Aktivität vorliegt. Deshalb ist Gl. 9 nur dann eine akzeptable Näherung, wenn die Aktivität in der Quellenregion sehr groß gegenüber der darüber oder darunter liegenden Aktivität ist. Für die Korrektur dieser Untergrundaktivität wird oft die in einer benachbarten Region gemessene Aktivität abgezogen. Eine bessere Näherung für die Aktivität in der Quellenregion wird erreicht, indem die rechte Seite der Gl. 9 zusätzlich mit dem Faktor

$$F = \left\{ \left[1 - \frac{\sqrt{I_{a,U} \cdot I_{p,U}}}{I_a} \left(1 - \frac{d_R}{D} \right) \right] \cdot \left[1 - \frac{\sqrt{I_{a,U} \cdot I_{p,U}}}{I_p} \left(1 - \frac{d_R}{D} \right) \right] \right\}^{\frac{1}{2}} \qquad \text{(Gl. 10)}$$

multipliziert wird (27). $I_{a,U}, I_{p,U}$ sind die in anteriorer und posteriorer Richtung gemessenen Impulsraten der Untergrundregion.

2 Material und Methode

2.1 Patientenkollektiv

Es wurden 10 Patienten untersucht, welche mit ^{111}In markierte anti-CD45-Antikörper erhalten hatten. Davon waren 5 Männer und 5 Frauen. Das Alter der Patienten reichte von 3 bis 61 Jahre. Alle Patienten litten an Akuter Myeloischer Leukämie. Bei 6 der 10 Patienten wurde im Anschluss an die Dosimetrie eine Radioimmuntherapie durchgeführt. Der Zeitraum, in dem die Dosimetrie stattfand war vom 08.12.2003 bis zum 26.04.2005.

Des Weiteren wurden 12 Patienten untersucht, welche mit ^{111}In markierte anti-CD66-Antikörper erhalten hatten. Davon waren 9 Männer und 3 Frauen. Das Alter reichte von 4 bis 63 Jahre. 5 der Patienten litten an AML, 4 an ALL, 1 an SCID (Severe combined immunodeficiency), 1 an Beta-Thalassämie und 1 an hämolytischer Anämie. Bei allen Patienten wurde im Anschluss eine Radioimmuntherapie durchgeführt. Der Zeitraum der Dosimetrie war hier vom 31.08.2004 bis zum 14.06.2005.

2.2 Radioimmuntherapie, Markierung von Antikörpern

Der anti-CD45 Antikörper YAML568 erkennt ein gemeinsames Epitop aller Isoformen des CD45-Antigens (3). Die Affinitätskonstante für die Bindung des Antikörpers an die kernhaltigen Zellen des peripheren Blutes war ~$4{,}8*10^9$ M^{-1} (4).

Der original Hybrid stammte von einer Fusion aus Milz-Zellen der Ratte und der Zelllinie Y3-Ag.1.2.3 (11). Dieser exprimierte eine irrelevante κ-Leichtkette. Um den Antikörper für den klinischen Gebrauch vorzubereiten, wurde eine Variante ausgewählt, welche nur die spezifische Schwer- und Leichtkette ausschüttete und daraus wurde eine ‚master-cell bank' vorbereitet. Die Zellen wurden in einem Hohlfaser Fermenter (Acusyst-Jr.) kultiviert. YAML568 wurde Affinitäts-Chromatographie(protein G), Kationen-Austausch-Chromatographie (SP-Sepharose), Anionen-Austausch-Chromatograpie (Sartobind-Q) und Filtration durch einen 20 nm Filter (Millipore NFP) von dem Überstand gereinigt. Das Endprodukt wurde einem Qualitätssicherungstest unterzogen und Tests mit in vitro Vollblut zeigten, dass YAML568 wesentlich weniger Ausschüttung von TNFα und

Interferonβ bewirkt als die Ratten IgG2b CD45-Antikörper YTH24.5 und YTH54.12. Herstellungs- und Qualitätskontrollen wurden nach den Richtlinien im Therapeutic Antibody Centre, Oxford, UK durchgeführt (21).

HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) wurde auf einem Dionex HPLC System durchgeführt. Die Größenauschluss-Chromatography (Size-exclusion chromatography SEC) wurde bei Raumtemperatur bei 1ml/min mit einer BioSep-SEC-S 3000 Säule (300 * 7,8 mm; Phenomex) durchgeführt. Die UV-Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 280nm gemessen und die Radioaktivität wurde mit einem Na(I) Scintillationsdetektor (Raytest) gemessen, welcher mit dem Abfluss des UV-Systems verbunden war. Für die Konjugation von Isothiocyanato-Benzyl-Methyl-Diethylenetriaminepentaacetic Acid (Isothiocyanato-Benzyl-MX-DTPA) mit dem Anti-CD45-Antikörper wurden alle Puffer mit hochreinem Wasser (Fluka) hergestellt und steril, durch einen 0,22 µm Porendicke Millex-GV Filter (Millipore), gefiltert. Alle Herstellungen wurden aseptisch in einem laminar flow hood hergestellt. Aminobenzyl-MX-DTPA (2-(4-aminobenzyl)-6-methyl-diethylenetriaminepentaacetic acid) wurde von Macrocyclics bezogen. Aminobenzyl-MX-DTPA wurde dann in Isothiocyanato-Benzyl-MX-DTPA konvertiert (21). Das Isothiocyanato-Benzyl-MX-DTPA wurde zu dem anti-CD45, in einem Puffer (50mmol/l, pH=9,5), hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde bei 23°C 20 Stunden lang inkubiert. Das konjugierte anti-CD45 wurde durch eine PD 10 Säulen Chromatographie (Pharmacia) von dem unkonjugierten Isothiocyanato-Benzyl-MX-DTPA getrennt. Das Endprodukt wurde steril durch einen Millex-GV Filter mit der Porendicke von 0,22 µm (Millipore) gefiltert und bei –20°C aufbewahrt.

Für die Radiomarkierung wurde ^{111}In-$InCl_3$ in 0,05 mol/l HCL (Tyco Healthcare) mit der zweifachen Menge an Zitrat/Acetat-Puffer verdünnt. Die gepufferte ^{111}In Lösung wurde zu 1mg des Antikörperkonjugates hinzugefügt. Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Antikörper mit isotonischer Kochsalzlösung verdünnt. Eine kleine Teilprobe wurde durch Größenausschluss-Chromatographie untersucht, um die radiochemische Reinheit zu ermitteln (100MBq/mg Protein, >95% ^{111}In an Antikörper gebunden). Immunreaktivität wurde durch fluoreszenzaktivierte Zellsortieranalyse ermittelt und war bei über 97%.

Der CD66-Antikörper war der monoklonale Antikörper Scintimun granulocyte von Cis Bio International. Hierbei handelt es sich um einen Maus IgG1 Antikörper mit einer hohen Affinität zu dem CD66-Antigen ($2*10^9$ mol/L) (26). Bei den Patienten einer vorangegangenen Studie wurden keine humanen anti-Maus Antikörper gefunden (30).

Der anti-CD66 Antikörper wurde in 2 Stufen mit ^{111}In markiert. In der ersten Stufe wurde der bifunktionale Chelator (2-parathiocyanatobenzyl-6-methyl-diethylenetriaminepentaacetic acid) an den Antikörper angefügt. In einem zweiten Schritt wurde das Radiometall über den Chelator zu einem komplex hinzugefügt. 10mg des Antikörpers wurden in 1ml N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid) (HEPES) Puffer (0,05 mol/l, pH 7,9) aufgelöst.18mg p-isothiocyanatobenzyl-diethylenetriaminepentaacetic acid (mx-DTPA; Macrocyclics) wurde in HEPES Puffer gelöst, auf pH 7,9 angepasst und zur Antikörperlösung hinzugefügt. Die Immunreaktivität wurde als über 90% ermittelt. Eine kleine Teilprobe wurde durch Größenausschluss-Chromatographie untersucht, um die radiochemische Reinheit zu ermitteln (96% ± 3%). Anschließend wurde die Antikörperlösung durch Filtration (Millipore) sterilisiert(30).

2.3 Unterschiede CD66, CD45

Das CD45 Antigen ist eine Tyrosinphosphatase, welche auf der Oberfläche der meisten kernhaltigen hämatopoietischen Zellen, nicht jedoch auf Zellen, die nicht der hämatopoietischen Zellreihe angehören, präsentiert wird. Dieses Antigen wird in einer relativ hohen Anzahl (200000 Bindungsstellen pro Zelle) auf der Oberfläche exprimiert (21) und nach Bindung mit einem Liganden nicht nennenswert internalisiert. Radioaktiv markierte Antikörper entfalten ihren zytotoxischen Effekt einerseits durch direktes Abtöten der Zelle, an die sie gebunden haben, oder durch Vernichtung von in der nähe befindlichen Zellen, abhängig von der spezifischen Reichweite der emittierten Strahlung des jeweiligen Radionuklids. Dieser Mechanismus, der auch ‚bystander'-Effekt genannt wird, zeigt einen möglichen Vorteil bei der Behandlung von Krankheiten, bei denen nicht alle erkrankten Zellen dieses Antigen exprimieren, zum Beispiel Leukämien und Lymphome. Durch diesen Effekt und die relativ hohe Expression des Antigens auf der Oberfläche erkrankter und

nicht erkrankter Zellen können auch im Remissionszustand der Krankheit noch übriggebliebene Leukämiezellen bestrahlt werden (21).

Der verwendete anti-CD66 Antikörper ist ein monoklonaler Mausantikörper vom IgG_1 Isoptyp, mit einer hohen Spezifität für das CD66 Antigen. CD66 ist ein Differenzierungsantigen der normalen Granulopoese. Das CD66 Antigen wird in ungefähr $2*10^5$ Kopien pro Zelle exprimiert. Es ist auf myelopoietischen Zellen zu finden vom Stadium des Promyelozyten bis hin zu reiferen Zellen dieser Linie (25) nicht jedoch auf der erythropoietischen, thrombopoietischen und lymphatischen Zellreihe (7). Auf myeloische Blasten wird das CD66 Antigen in der Regel nicht exprimiert (8) aber bei myeloischen Leukämien kann die CD66 Expression variieren (7). Nachdem der Antikörper an das CD66 Antigen gebunden hat, erfolgt weder eine Internalisierung noch ein Shedding des membrangebundenen Antikörper-Antigen Komplexes (8). Die Affinität des anti-CD66 Antikörpers beträgt ungefähr $2*10^9$l/mol (25). Ein weiterer Vorteil des anti-CD66 Antikörpers ist die Verfügbarkeit als handelsübliches Kit, welches für andere Zwecke in der Nuklearmedizin verwendet wird (17).

Für eine erfolgreiche Radioimmuntherapie benötigt man eine möglichst hohe Bindungsaffinität des radioaktiv markierten Antikörpers an die Zielzelle des Patienten, was mittels Durchflusszytometrie bestimmt werden kann. Dadurch kann die Qualität der Antikörper auch nach Markierung mit dem Nuklid beurteilt und kontrolliert werden.

2.4 Das Radionuklid ^{90}Y

Yttrium-90 ist ein reiner β^--Strahler mit einer mittleren Reichweite von 2.7mm und einer Halbwertszeit von 64 h. Für die Markierung mit einem Antikörper benötigt man einen Chelator (17). Durch die fehlende γ-Strahlung ist es nicht nötig, die Patienten während der Behandlung zu isolieren, jedoch wird dann für die vorherige Dosimetrie ein anderes vergleichbares Nuklid mit γ-Anteil benötigt.

2.5 Ablauf der Dosimetrie

Für die praktische Durchführung der Dosimetrie muss der Patient nüchtern sein und ein großlumiger Gefäßzugang muss vorhanden sein. Kontraindiziert ist eine RIT bei stark pflegebedürftigen Patienten aus Strahlenschutzgründen, und bei Patienten mit einem Karnofsky-Index unter 60. Der Karnofsky-Index gibt die Leistungsfähigkeit des Patienten in einer Skala wieder.(s.u.)

Tab. 1 Einteilung des Karnofsky-Index

Zustand des Patienten	**Karnofsky-Index**
Normalzustand, keine Beschwerden, keine manifeste Erkrankung	100%
Normale Leistungsfähigkeit, minimale Krankheitssymptome	90%
Normale Leistungsfähigkeit mit Anstrengung, geringe Krankheitssymptome	80%
Eingeschränkte Leistungsfähigkeit, arbeitsunfähig, kann sich selbst versorgen	70%
Eingeschränkte Leistungsfähigkeit, braucht gelegentlich fremde Hilfe	60%
Eingeschränkte Leistungsfähigkeit, braucht krankenpflegerische und ärztliche Betreuung, nicht dauernd bettlägrig	50%
Patient ist bettlägrig, braucht spezielle Pflege	40%
Patient ist schwer krank, Krankenhauspflege notwendig	30%
Patient ist schwer krank, Krankenhauspflege und supportive Maßnahmen erforderlich	20%
Patient ist moribund, Krankheit schreitet rasch fort	10%

Auch sollte sichergestellt sein, dass der Patient unter keiner Infektion, vor allem des Darmtraktes, leidet. Leber und Nierenfunktion sollten regelrecht sein, wobei hierfür innerhalb einer Woche vor Therapiebeginn eine Nierensequenzszintigraphie durchgeführt werden sollte.

Sind alle Vorraussetzungen gegeben, wird der markierte Antikörper über den Zugang über einen Zeitraum von einer Minute appliziert und die Spritze zur Messung der verbliebenen Restaktivität aufgehoben. In bestimmten Zeitabständen wird 1ml Blut entnommen und die darin enthaltene Aktivität mittels Bohrlochszintillationszähler gemessen. Dadurch kann die Biokinetik des markierten Antikörpers im Blut bestimmt werden. Eine solche Messung erfolgt auch mit dem Urin, der über 72 Stunden gesammelt wird. Die Ganzkörperaufnahmen werden mit einer Doppelkopf Gamma-Kamera (s.4.5) in definierten Zeitabständen erstellt. Auf diesen Bildern werden die Organe, in denen sich das radioaktive Arzneimittel angesammelt hat, identifiziert und mittels ROI-Technik die prozentuale Aufnahme des Arzneimittels in den jeweiligen Organen bestimmt. Der zeitliche Verlauf der Aktivität in den einzelnen Organen wird mit dem UlmDos-Programm ausgewertet und die jeweiligen Verweildauern erfasst (s. 4.7)

Aufgrund der relativ kleinen Mengen an radioaktiv markierten Antikörpern, die bei der Dosimetrie verwendet werden, kann diese ambulant erfolgen und die medikamentöse Therapie der Grunderkrankung muss nicht unterbrochen werden, da derzeit keine Medikamenteninteraktion mit radioaktiv markierten Antikörpern bekannt ist.

Ergibt sich aus der Dosimetrie eine günstige Verteilung, kann die Therapie durchgeführt werden, wobei aus Strahlenschutzgründen ein 2-tägiger stationärer Aufenthalt nötig ist. Hierbei werden zur Qualitätssicherung dieselben Analysen mit Blut und Urinsammlung wie bei der Dosimetrie durchgeführt. Auch muss eine eventuell notwendige Ganzkörperbestrahlung bei der Berechnung der therapeutisch applizierten Aktivität mitbedacht werden (7).

2.6 Gammakamera Aufnahmen

Um die Verteilung und Elimination der Radiotracer zu beurteilen, wurde Ganzkörperszintigrafieaufnahmen, anterior und posterior, mittels einer Doppelkopf Gammakamera (ECAM, Siemens), zu den Zeitpunkten 2, 4 h, 1, 2, 3 oder 5 d und 6 d nach Applikation, angefertigt (27). Um die Aktivität in den akkumulierenden Organen (Nieren, Leber, Knochenmark und Milz), sowie dem Abdomenhintergrund zu ermitteln, wurde eine Region of Interest (ROI) Analyse durchgeführt (12). Die Aufnahme ins Knochenmark wurde durch eine ROI über die Wirbelkörper L2-L4 und mit einem Skalierungsfaktor eines Referenzmodells des Menschen definiert (12). Die ROIs wurden individuell auf einem Bild jedes Patienten gezeichnet und in die weiteren Bilder kopiert und angepasst (12). Für das Knochenmark, die Milz und die Nieren wurde eine Hintergrundkorrektur angefertigt, indem man annahm, dass die organspezifischen Anteile des Abdomenhintergrundes 0,8; 0,67 und 0,75 betragen (12). Die Verteilung der Zählraten innerhalb des geometrisch gemittelten Bildes wurde als proportional zur Aktivitätsverteilung innerhalb des Körpers angenommen, da keine Übertragung zur Korrektur der Abschwächung vorgenommen wurde (18). Die zerfallkorrigierten Zeit-Aktivitätsdaten. wurden mit bis zu 3 Exponentialfunktionen angepasst (12). Die Organ-Verweildauern, welche ein Maß für die relative Anzahl der Zerfälle in jedem Organ sind, wurden mit diesen Ergebnissen berechnet und für den physikalischen Zerfall von ^{90}Y korrigiert, welches das Nuklid ist, das für die Therapie vorgesehen ist.

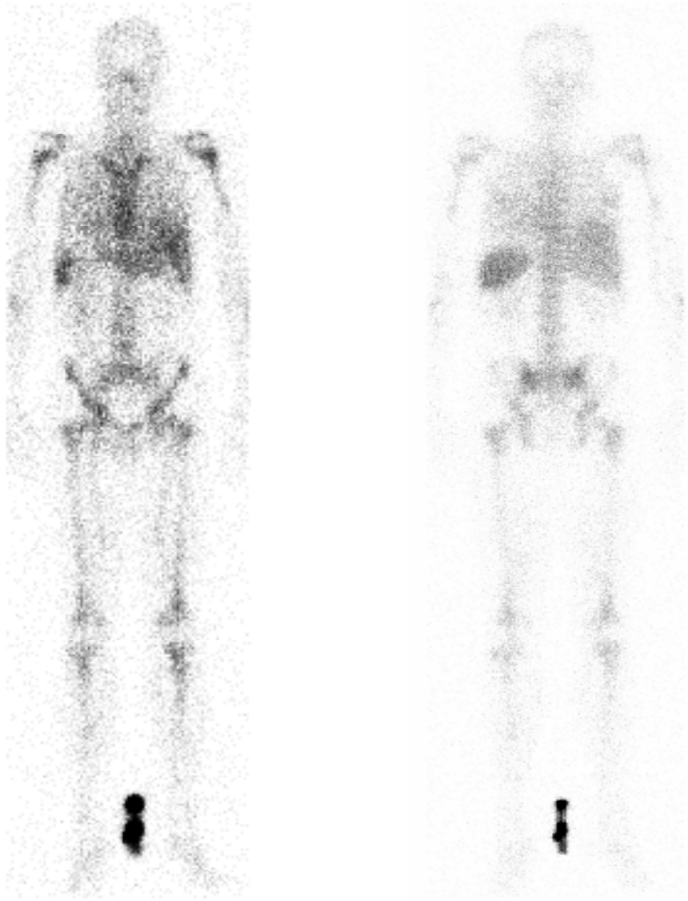

Abb. 2 Die Abbildung zeigt die beiden Aufnahmen eins Patienten, mittels Doppelkopfkamera, aus denen das geometrische Mittel berechnet wird.

2.7 Die UlmDos Software und Unterschiede NSC, TEW

Zur Auswertung der Dosimetrie jedes einzelnen Patienten wurde die UlmDos Software verwendet (12). Hierbei handelt es sich um ein Programm, welches die dosimetrischen Berechnungen erleichtert sowie eine adäquate Dokumentation ermöglicht. Zunächst werden die Patienten- und Radionukliddaten als auch die einzelnen Serum- und Urinwerte eingegeben. Nachdem die Bilder der Gammakamera auch geladen wurden, können die

ausgewählten ROIs eingezeichnet werden und daraus die Verweildauern ausgerechnet werden, indem man Exponentialfunktionen der Zeit-Aktivitäts-Daten erstellt. Für weitere Verwendungszwecke können die Daten im ASCII Format abgespeichert werden (12). Im Rahmen der Auswertung wurde UlmDos getestet und weiter optimiert.

Prinzipiell sollen bei der Bildgebung mit der Gammakamera nur jene Photonen berücksichtigt werden, welche senkrecht auf den Detektor treffen (10). Durch Streuung und andere Effekte treffen aber auch Photonen auf den Detektor, die nicht senkrecht ankommen, welche dann die Auswertungen verfälschen, wenn keine Korrektur dieser Streuung erfolgt (NSC = no scatter correction). Um diese Streuung zu korrigieren, verwendeten wir TEW (triple energy window) und verglichen beide Methoden miteinander. Für die Streukorrektur (TEW) wurden die folgenden 3 Energiefenster verwendet: 247 keV (20% Breite), 205 keV (10%), 300 keV (10%).

Zeit-Aktivitäts-Kurven wurden mittels der „region of interest“ (ROI) Methode in den akkumulierenden Organen erzeugt und daraus die Verweildauern („residence times“) durch Integration berechnet (12). Die Verweildauern der einzelnen Organe wurden einmal ohne Streukorrektur und einmal unter Verwendung von TEW unter Verwendung derselben ROIs berechnet. So konnte der Einfluss der Streukorrektur auf die Dosimetrie-Ergebnisse untersucht werden.

2.8 Statistik

Für die beschreibende statistische Auswertung wurden Mittelwerte mit einfacher Standardabweichung, sowie die Mediane berechnet. Statistische Tests wurden nicht durchgeführt, da einerseits nur grundlegende Daten zur Biokinetik mit Hilfe von ULMDOS generiert werden sollten und andererseits aufgrund der geringen Patientenzahl bei gleichzeitig hoher biologischer Variabilität bei retrospektiven Untersuchungen kein Informationsgewinn erwartet werden kann

3 Ergebnisse

Im Rahmen der Auswertung haben wir die UlmDos software noch weiter getestet und optimiert. Die hier aufgeführten Ergebnisse wurden dann mit der aktuellsten Version ausgewertet.

3.1 Verteilung CD45, ^{111}In

Für die Patienten, die ^{111}In markierte Anti-CD45-Antikörper erhalten hatten, ergaben sich folgende Verteilungen:

NSC:

Tab. 2 Einzelwerte der Verweildauern (in Stunden) von ^{111}In-markierten anti-CD45-Antikörpern (CD = Cluster of Differentiation) ohne Streukorrektur

Ganzkörper	**Nieren**	**Leber**	**KM**	**Milz**
76,8 ± 1,0	1,8 ± 1,0	9,7 ± 2,0	26,2 ± 6,0	4,0 ± 4,3
65,9 ± 3,4	0,6 ± 0,1	16,6 ± 8,7	33,6 ± 9,4	6,2 ± 2,3
71,0 ± 1,6	0,7 ± 0,1	8,1 ± 2,2	28,0 ± 3,6	7,8 ± 1,1
66,4 ± 0,6	0,6 ± 0,1	18,8 ± 2,5	18,0 ± 2,2	27,9 ± 4,8
76,3 ± 0,8	0,5 ± 0,2	24,0 ± 1,9	19,0 ± 1,8	16,6 ± 1,6
81,7 ± 7,0	1,4 ± 0,1	15,2 ± 4,8	37,5 ± 8,5	8,5 ± 4,5
75,2 ± 1,0	0,4 ± 0,2	10,2 ± 4,4	28,1 ± 0,1	18,3 ± 1,7
75,8 ± 1,8	1,4 ± 0,2	15,5 ± 3,5	32,0 ± 2,6	15,6 ± 2,7
70,1 ± 0,1	0,4 ± 0,4	10,2 ± 1,0	30,1 ± 0,1	24,8 ± 2,0
74,1 ± 5,2	1,6 ± 2,8	11,0 ± 2,8	29,3 ± 1,5	6,3 ± 1,1
Mittelwert: **75,1 ± 2,7**	**0,9 ± 0,5**	**14,0 ± 3,4**	**28,2 ± 3,5**	**13,6 ± 2,6**
Median: **75,2**	**0,7**	**13,1**	**28,7**	**12**

Fortsetzung

Fortsetzung Tab. 2

Restkörper	**Serum**
34,5 ± 2,8	16,1 ± 2,6
9,8 ± 7,0	3,8 ± 0,8
25,6 ± 1,6	7,1 ± 0,5
0,1 ± 15,0	0,9 ± 0,1
16,3 ± 6,0	2,9 ± 0,1
17,6 ± 9,4	6,9 ± 2,1
13,5 ± 4,2	19,5 ± 1,9
12,6 ± 0,1	5,3 ± 0,8
7,0 ± 0,1	2,9 ± 0,1
31,1 ± 2,0	31,7 ± 5,9
Mittelwert: 16,8 ± 4,9	**9,7 ± 1,5**
Median: 14,9	**6,1**

KM = Knochenmark

TEW:

Tab. 3 Einzelwerte der Verweildauern (in Stunden) von ^{111}In-markierten anti-CD45-Antikörpern (CD = Cluster of Differentiation) mit Streukorrektur

Ganzkörper	**Nieren**	**Leber**	**KM**	**Milz**
67,3 ± 0,8	2,2 ± 0,6	10,9 ± 2,9	31,5 ± 6,7	5,5 ± 6,6
64,1 ± 1,0	0,6 ± 0,2	17,0 ± 12,1	37,8 ± 10,5	7,1 ± 4,5
62,8 ± 19.3	0,5 ± 0,1	7,4 ± 3,4	30,2 ± 3,7	10,7 ± 2,8
61,8 ± 0,6	0,2 ± 0,1	19,9 ± 3,1	18,6 ± 1,3	31,6 ± 5,4
71,3 ± 6,1	0,1 ± 0,5	25,3 ± 2,3	13,0 ± 3,4	20,8 ± 1,4
74,3 ± 3,9	1,4 ± 0,2	16,5 ± 1,8	46,2 ± 9,8	11,3 ± 2,6
73,5 ± 1	0,1 ± 0,8	9,4 ± 4,4	28,7 ± 0,1	21,4 ± 6,4
71,7 ± 0,7	1,2 ± 0,9	16,7 ± 3,1	36,8 ± 4,1	20,5 ± 4,3
66,4 ± 4,2	0,2 ± 0,2	10,5 ± 0,6	27,4 ± 3,0	30,3 ± 2,6
69,5 ± 8,6	1,8 ± 1,6	10,8 ± 2,0	29,0 ± 0,3	6,8 ± 2,9
Mittelwert: **68,3 ± 4,6**	**0,8 ± 0,4**	**14,4 ± 3,6**	**29,9 ± 4,3**	**16,6 ± 3,9**
Median: **68,4**	**0,6**	**13,7**	**29,6**	**15,9**

Fortsetzung

Fortsetzung Tab. 3

Restkörper	Serum
18,1 ± 5,0	16,3 ± 2,6
3,2 ± 13,6	3,8 ± 0,8
15,0 ± 4,8	7,1 ± 0,5
0,1 ± 22,5	0,9 ± 0,1
11,6 ± 2,1	2,9 ± 0,3
1,2 ± 2,7	6,9 ± 2,1
6,9 ± 1,5	19,5 ± 1,9
1,2 ± 2,0	5,3 ± 0,8
0,5 ± 1,1	2,9 ± 0,1
27,3 ± 2,7	31,8 ± 6,4
Mittelwert: 8,5 ± 5,8	**9,8 ± 1,5**
Median: 5,0	**6,1**

KM = Knochenmark

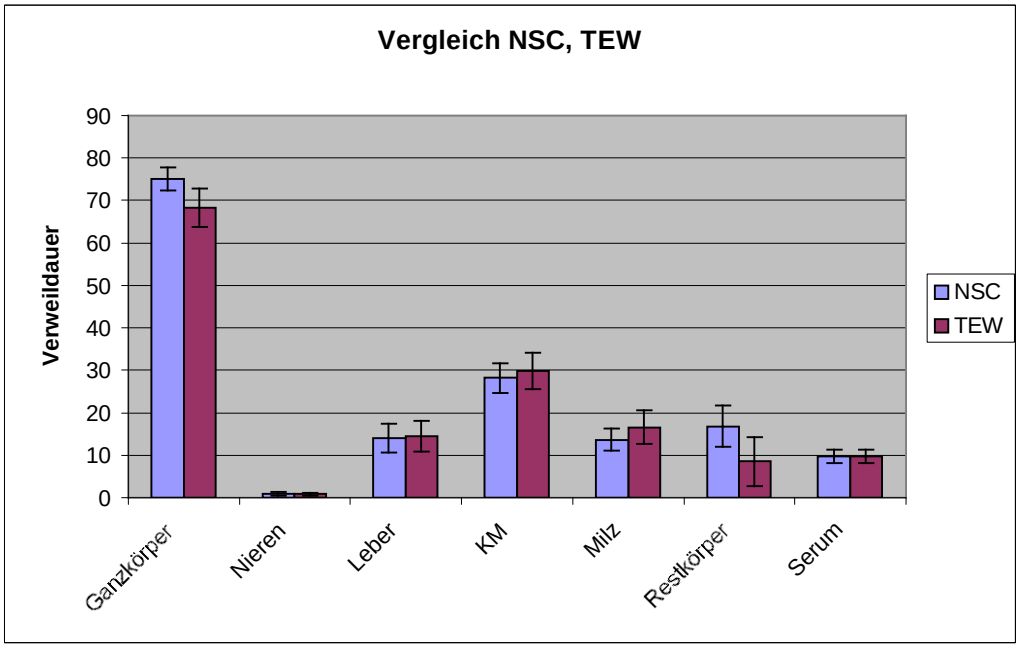

Abb. 3 Mittelwerte mit Standardabweichung der Verweildauern (in Stunden) von ^{111}In-markierten anti-CD45-Antikörpern (CD = Cluster of Differentiation) mit und ohne Streukorrektur. Die verwendete Streukorrektur hat keinen Einfluss auf den Serumwert, da dieser mittels Bohrlochszintillationszähler gemessen wird. Der Vollständigkeit halber haben wir diese Werte dennoch in der Abbildung aufgeführt. KM = Knochenmark; NSC = no scatter correction; TEW = triple energy window

3.2 Verteilung CD66, ^{111}In

Für die Patienten, die ^{111}In markierte Anti-CD66-Antikörper erhalten hatten, ergaben sich folgende Verteilungen:

NSC:

Tab. 4 Einzelwerte der Verweildauern (in Stunden) von ^{111}In-markierten anti-CD66-Antikörpern (CD = Cluster of Differentiation) ohne Streukorrektur

Ganzkörper	Nieren	Leber	KM	Milz
75,3 ± 4,9	0,7 ± 0,1	5,8 ± 1,0	57,5 ± 1,2	7,8 ± 0,2
73,8 ± 6,8	0,4 ± 0,1	5,2 ± 0,7	56,4 ± 3,8	3,5 ± 0,4
51,9 ± 4,3	1,1 ± 0,2	8,3 ± 0,4	14,7 ± 1,9	1,7 ± 0,8
65,5 ± 5,9	0,1 ± 0,1	7,7 ± 0,8	39,6 ± 1,5	6,6 ± 0,2
80,2 ± 11,0	0,6 ± 0,1	6,1 ± 4,9	54,7 ± 8,4	5,1 ± 1,1
75,5 ± 26,5	0,4 ± 0,1	7,0 ± 4,0	33,3 ± 5,4	5,4 ± 0,4
78,8 ± 1,2	0,5 ± 0,1	6,7 ± 0,3	46,3 ± 5,6	-
77,6 ± 3,9	0,7 ± 0,1	7,2 ± 0,1	34,1 ± 1,7	4,7 ± 0,8
71,4 ± 6,1	0,6 ± 0,1	7,6 ± 0,1	42,3 ± 4,7	7,5 ± 1,2
85,1 ± 6,8	0,3 ± 0,1	4,9 ± 0,2	45,6 ± 0,1	3,3 ± 0,9
83,4 ± 4,3	0,3 ± 0,1	7,8 ± 0,3	59,5 ± 2,7	-
73,2 ± 6,1	0,5 ± 0,1	4,1 ± 0,4	63,2 ± 2,5	5,0 ± 0.3
Mittelwert: 74,3 ± 7,3	0,5 ± 0,1	6,5 ± 1,1	45,6 ± 3,3	5,1 ± 0,6
Median: 75,4	0,5	6,8	46,0	5,1

(2 Patienten mit Z.n. Splenektomie)

Fortsetzung

Fortsetzung Tab. 4

Restkörper	**Serum**
2,9 ± 0,2	15,5 ± 5,3
9,0 ± 5,0	19,2 ± 0,1
26,0 ± 9,9	18,7 ± 7,0
11,6 ± 8,2	9,3 ± 1,4
13,3 ± 0,2	7,9 ± 2,6
30,2 ± 2,5	4,0 ± 1,6
24,1 ± 7,4	10,4 ± 2,2
31,1 ± 1,3	11,4 ± 4,7
9,9 ± 3,8	6,3 ± 1,3
30,4 ± 0,7	15,1 ± 2,5
14,1 ± 5,6	13,0 ± 2,5
0,5 ± 2,7	15,4 ± 4,6
Mittelwert: 16,9 ± 3,9	12,2 ± 3,0
Median: 13,7	12,2

KM = Knochenmark

TEW:

Tab. 5 Einzelwerte der Verweildauern (in Stunden) von ^{111}In-markierten anti-CD66-Antikörpern (CD = Cluster of Differentiation) mit Streukorrektur

Ganzkörper	**Nieren**	**Leber**	**KM**	**Milz**
73,2 ± 4,2	0,4 ± 0,7	5,3 ± 1,0	62,1 ± 3,8	8,7 ± 0,3
71,5 ± 15,7	0,3 ± 0,1	4,6 ± 0,7	61,3 ± 3,4	4,0 ± 0,5
76,6 ± 5,2	1,5 ± 0,2	13,8 ± 1,7	22,7 ± 5,2	3,3 ± 0,6
63,3 ± 21,7	0,1 ± 0,1	7,1 ± 0,2	42,1 ± 2,4	8,0 ± 0,7
77,3 ± 10,0	0,3 ± 0,1	5,2 ± 3,7	62,5 ± 16,6	6,2 ± 1,6
72,0 ± 7,3	0,2 ± 0,1	5,9 ± 4,7	36,8 ± 11,5	5,5 ± 2,2
75,3 ± 10,8	0,4 ± 0,1	6,6 ± 0,5	47,8 ± 24,3	-
74,3 ± 8,0	0,4 ± 0,1	6,3 ± 1,0	37,3 ± 1,9	5,7 ± 1,0
67,8 ± 21,8	0,3 ± 0,1	6,0 ± 0,2	44,4 ± 7,8	9,0 ± 1,9
81,0 ± 17,7	0,2 ± 0,4	3,7 ± 0,1	48,7 ± 0,1	3,5 ± 1,2
80,1 ± 5,6	0,2 ± 0,1	7,6 ± 0,2	64,7 ± 5,0	-
70,8 ± 23,4	0,4 ± 0,1	3,1 ± 0,5	69,4 ± 8,2	5,5 ± 0,4
Mittelwert: 73,6 ± 12,6	0,4 ± 0,1	6,3 ± 1,2	50,0 ± 7,5	5,9 ± 1,0
Median: 73,7	0,3	6,0	48,3	5,6

(2 Patienten mit Z.n. Splenektomie)

Fortsetzung

Fortsetzung Tab. 5

Restkörper	Serum
0,1 ± 0,1	15,5 ± 5,3
1,4 ± 0,6	19,2 ± 0,1
35,6 ± 9,4	18,7 ± 7,0
6,5 ± 2,2	9,3 ± 1,4
2,9 ± 2,3	7,9 ± 2,6
24,1 ± 3,7	4,0 ± 1,6
20,2 ± 5,0	10,4 ± 2,2
25,2 ± 2,2	11,4 ± 4,7
6,9 ± 4,0	6,3 ± 1,3
25,7 ± 1,5	15,1 ± 2,5
6,4 ± 5,3	13,0 ± 2,5
0,4 ± 0,1	15,4 ± 4,6
Mittelwert: 14,1 ± 3,3	12,2 ± 3,0
Median: 6,9	12,2

KM = Knochenmark

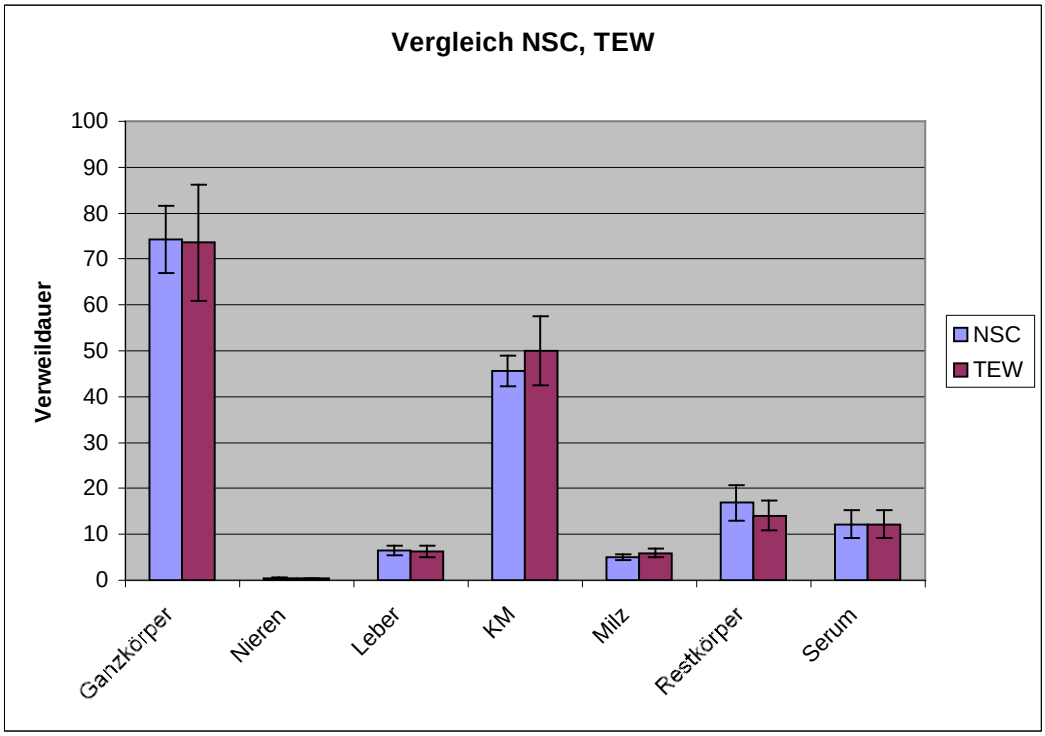

Abb. 4 Mittelwerte und Standardabweichung der Verweildauern (in Stunden) von ^{111}In-markierten anti-CD66-Antikörpern (CD = Cluster of Differentiation) mit und ohne Streukorrektur. Die verwendete Streukorrektur hat keinen Einfluss auf den Serumwert, da dieser mittels Bohrlochszintillationszähler gemessen wird. Der Vollständigkeit halber haben wir diese Werte dennoch in der Abbildung aufgeführt. KM = Knochenmark; NSC = no scatter correction; TEW = triple energy window

3.3 Unterschiede NSC, TEW

Die Verweildauern (in Stunden) für Ganzkörper, Nieren, Leber, Knochenmark und Milz waren: ohne Streukorrektur 73,3±4,9; 0,9±0,5; 14,0±5,0; 28,2±6,0 und 13,6±8,3 h und mit TEW 68,3±4,5; 0,8±0,8; 14,4±5,6; 29,9±9,4; 16,6±9,7 h. Das Verhältnis der Verweildauern ohne Streukorrektur zu TEW war für den Ganzkörper 1,07±0,04; die Nieren 2,3±2,0; Leber 0,98±0,07; das Knochenmark 0,99±0,19; die Milz 0,81±0,07. Durch die TEW-Methode wurden 36±6 % der gemessenen Impulse als gestreute Ereignisse eliminiert.

	247 keV	**TEW**	**247 keV / TEW**
Knochenmark	28,2±6,0	29,9±9,4	0,99±0,19
Milz	13,6±8,3	16,6±9,7	0,81±0,07
Leber	14,0±5,0	14,4±5,6	0,98±0,07
Nieren	0,9±0,5	0,8±0,8	2,3±2,0
Ganzkörper	73,3±4,9	68,3±4,5	1,07±0,04

Tab. 6 Mittelwerte der Verweildauern (in Stunden) mit und ohne Streukorrektur (TEW = triple energy window, keV = Kiloelektronenvolt).

Abb. 5 Die Abbildung zeigt das Gammakamerabild eines Patienten links ohne und rechts mit Streukorrektur mittels (TEW = triple energy window).

3.4 Unterschiede kalter Antikörper

Bei der Verteilung zeigten sich Unterschiede zwischen den Patienten, die keine oder nur die niedrige Dosis an unmarkierten Antikörpern erhalten hatten, und denen mit einer Dosis von 0,5 mg/kg KG unmarkierter Antikörper. Bei der Clearance im Blut zeigte sich, dass bei den Patienten, die keine oder nur die geringe Dosis an unmarkierten Antikörpern erhalten hatten, innerhalb der ersten 10 min 83% ± 12% der Aktivität eliminiert wurde.

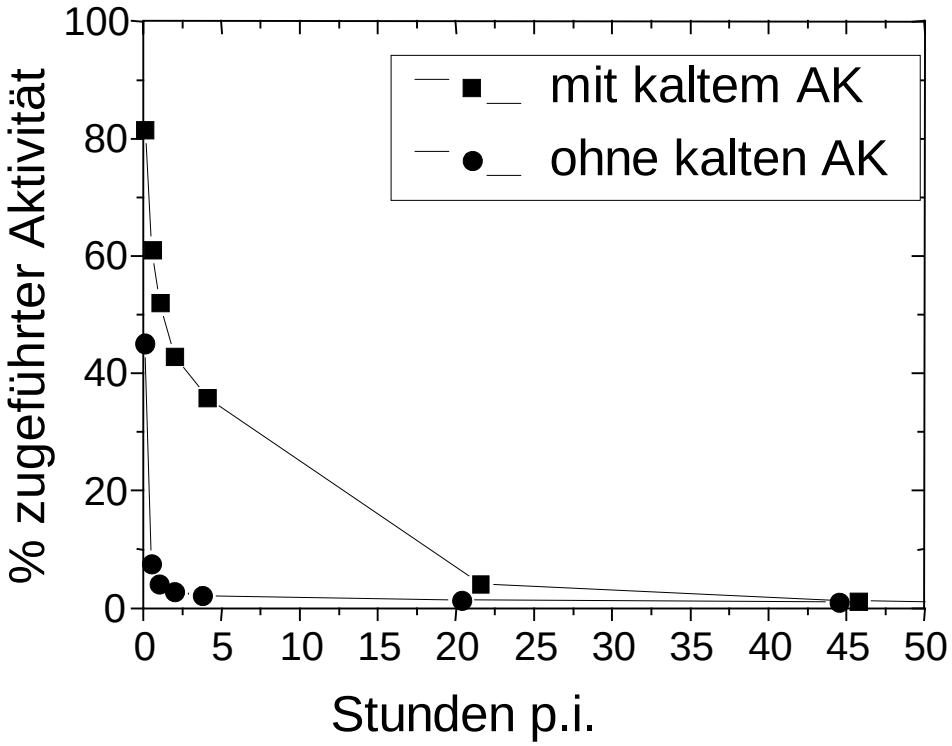

Abb. 6 Einzelwerte der Serumaktivitätsmessung bei 2 Patienten mit und ohne vorherige Gabe von kaltem Antikörper. AK = Antikörper; p.i. = post injection

Ebenso zeigten die Patienten ohne bzw. mit niedriger Dosis unmarkierter Antikörper eine hohe initiale Aufnahme in Leber (37% ± 9%) und Milz (34% ± 9%) sowie eine niedrige Aufnahme im Knochenmark (16% ± 2%).

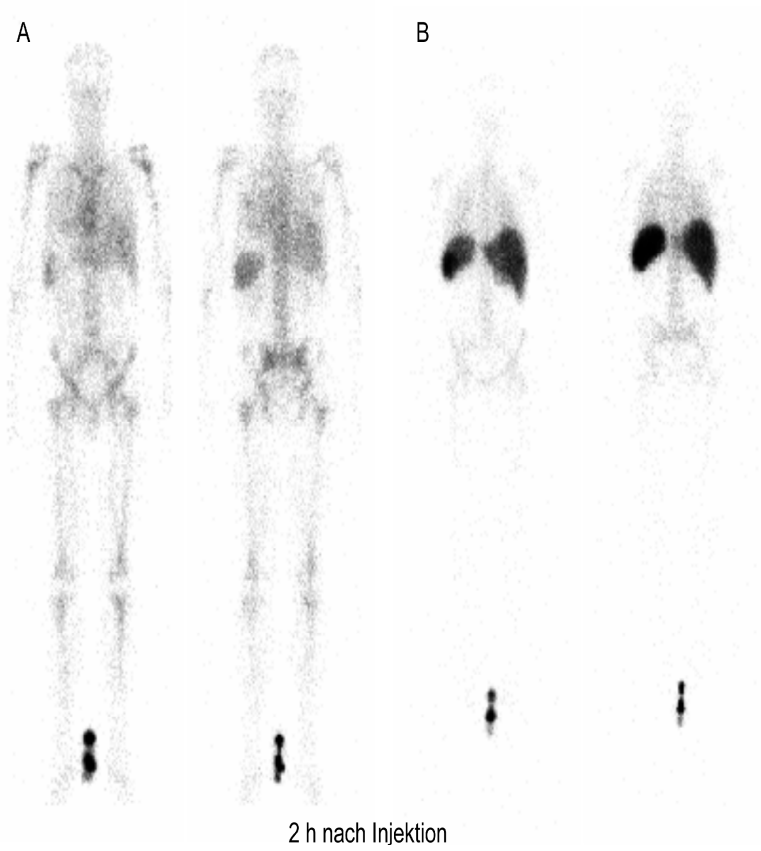

Abb. 7 Die Abbildung zeigt den Unterschied der Verteilung bei zwei Patienten einmal mit A (links) und einmal ohne B (rechts) vorheriger Gabe unmarkierter Antikörper. Hier wird vor allem die starke initiale Aufnahme in die Leber und die Milz deutlich, wenn keine vorherige Gabe unmarkierter Antikörper erfolgt ist.

3.5 Unterschiede Belegungsgrad

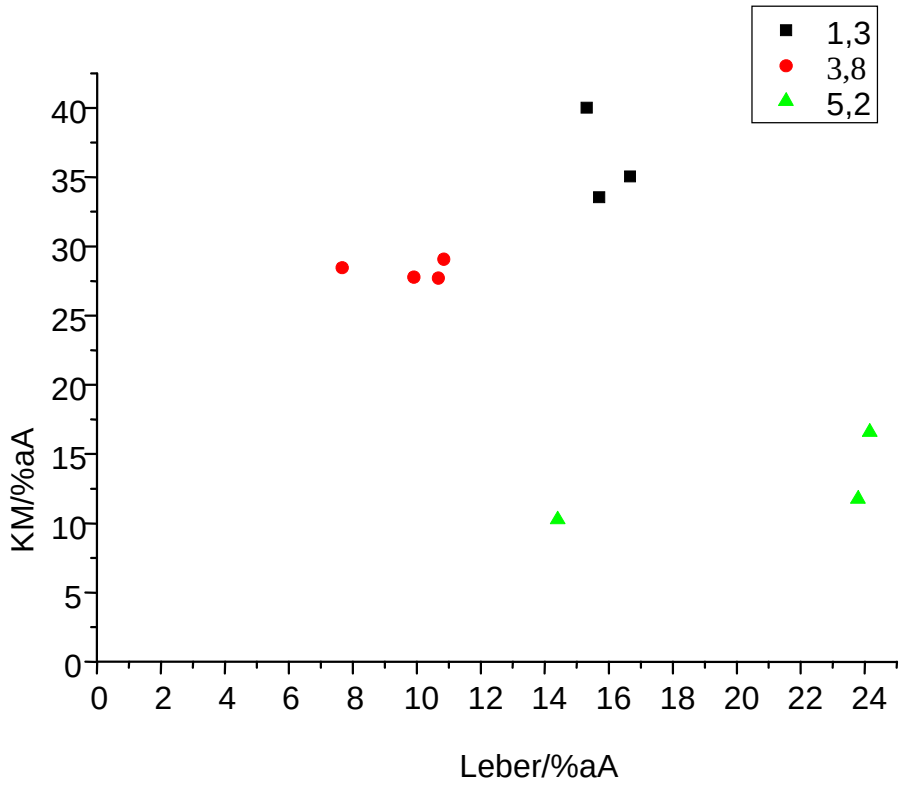

Abb. 8 Einzelwerte der Aktivitätsverteilung in Leber und Knochenmark in Abhängigkeit vom Belegungsgrad. Die grünen Dreiecke stehen für diejenigen Patienten, deren Antikörper mit einem Belegungsgrad von 5,2 markiert wurden, die roten Punkte für einen Belegungsgrad von 3,8 und die schwarzen Kästchen für einen Belegungsgrad von 1,3. KM = Knochenmark, %aA = % applizierte Aktivität

Das Schaubild zeigt die Verteilung der Verweildauern in Knochenmark und Leber. Daraus ergibt sich eine ungünstige Verteilung (viel Aktivität in der Leber, wenig im KM) für den Belegungsgrad 5,2. Bei einem Belegungsgrad von 1,3 wird viel ins Knochenmark aufgenommen, wobei aber auch die Leber stärker belastet wird, wohingegen bei einem Belegungsgrad von 3.8 die Belastung der Leber kleiner ist, aber auch die Aufnahme in das KM geringer ist.

3.6 Vergleich CD45, CD66

Um die Verteilung der beiden Antikörper besser vergleichen zu können, benutzen wir einen Quotienten aus den Verweildauern von Knochenmark/Leber. Ist dieser Quotient größer als 1, so zeigt dies eine günstigere Verteilung.

Für die Verteilungen beim Anti-CD45-Antikörper ergibt sich ein Mittelwert des Quotienten von 2,5 ± 1,3. Schließt man diejenigen Patienten aus, welche Antikörper mit einem Belegungsgrad von 5,2 (siehe Abschnitt 5.5) erhalten hatten, so wird dieser Mittelwert 3,00 ± 0,97.

Bei den Patienten die anti-CD66-Antikörper erhalten haben ist der Mittelwert 7,6±3,6.

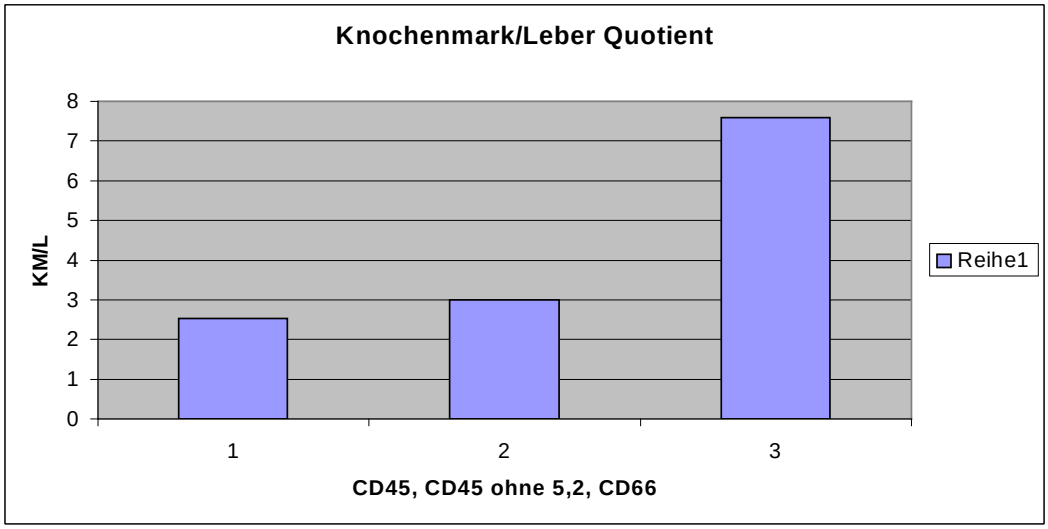

Abb. 9 Mittelwerte für den Quotienten der absorbierten Dosis in Knochenmark und Leber ohne Berücksichtigung derer, die einen Belegungsgrad von 5,2 hatten.
KM/L = Knochenmark/Leber, CD = Cluster of Differentiation

4 Diskussion

In dieser Arbeit untersuchten wir die Verteilung von anti-CD45-, sowie anti-CD66-Antikörpern, anhand der Verweildauern, bei Patienten vor KMT. Hierbei achteten wir besonders auf den Einfluss der vorherigen Gabe kalter Antikörper als auch auf den Belegungsgrad der Antikörper. Bei der Auswertung wurde insbesondere auch die Ulmdos Software zur Dosimetrie getestet und weiterentwickelt. So wurden auch 2 verschiedene Methoden verglichen, um den Einfluss der implementierten Streukorrektur auf die Ergebnisse der Dosimetrie zu prüfen.

Vorherige Gabe unmarkierten Antikörpers

Die intravenöse Gabe von ^{111}In-markiertem anti-CD45-Antikörper ohne, oder mit nur sehr niedrig dosierter vorheriger Gabe von kaltem Antikörper (0,15-0,2 mg/kg KG) resultierte in einer sehr schnellen Elimination des Ak aus dem Blut-Kompartiment, einer erhöhten Aufnahme in Leber und Milz und einer niedrigen Aufnahme in das Knochenmark. Dies zeigt, dass YAML568 eine gezielte Verteilung in die Leber und Milz hat. Somit erscheint dieser Antikörper, welcher nicht an FcR bindet, hier keinen Vorteil gegenüber dem vorher verwendeten Ratten IgG2b-Antikörper aufzuweisen (5). Die Ursache hierfür könnte an der direkten Bindung der Antikörper an Gewebemakrophagen und Lymphozyten in der Leber liegen, da diese auch das CD45-Antigen präsentieren (20).

Im Gegensatz dazu erhöhte die vorherige Gabe von 0,5 mg/kg KG kaltem Antikörper die Aufnahme ins Knochenmark und reduzierte die Aufnahme in Leber und Milz. Dieser Effekt beruht vermutlich darauf, dass durch die vorausgehende Gabe unmarkierter Antikörper diese spezifischen oder unspezifischen Bindungsstellen aufgrund der stärkeren Durchblutung dieser Organe im Vergleich zum Knochenmark abgesättigt sind und somit die Bindung der später applizierten markierten Antikörper geringer ist (28).

Die Aufnahme in die Nieren blieb in jedem Fall gering.

Einfluss des Belegungsgrades

Bei der Untersuchung des Belegungsgrades des Antikörpers mit dem Chelator zeigte sich, dass dieser einen deutlichen Einfluss auf die gesamte Verteilung sowie auf den Knochenmark/Leber Quotienten hat. Die bei unseren Patienten verwendeten Belegungsgrade waren 1,3; 3,8 und 5,2. Bei einem Belegungsgrad von 1,3 zeigte sich eine hohe Anreicherung im Knochenmark, was jedoch auch mit einer Mehrbelastung der Leber verbunden war. Diese war bei einem Belegungsgrad von 3,8 kleiner, hier war aber auch die Anreicherung im Knochenmark geringer. Ein Belegungsgrad von 5,2 sollte vermieden werden, da sich hierbei eine insgesamt ungünstige Verteilung ergab mit wenig Anreicherung im Knochenmark und einer hohen Belastung für die Leber. Betrachtet man noch mal den Knochenmark/Leber Quotienten, so ergibt sich für die Patienten mit einem Belegungsgrad von 1,3 ein Quotient von 2,2±0,3 und für die mit 3,8 ein Quotient von 2,9±0,5. Ein Belegungsgrad von 3,8 ergibt somit, bei isolierter Betrachtung des Knochenmark/Leber Quotienten, die günstigere Verteilung.

Generell hat sich gezeigt, dass der Belegungsgrad bzw. das genaue Markierungsverfahren neben der Gabe von unmarkiertem Antikörper einen starken Einfluss auf die Verteilung der Antikörper in den Patienten hat und es somit wichtig wäre, in der Zukunft auch hierauf besonders zu achten. So könnte bei jedem Patienten individuell der Belegungsgrad, z.B. in Abhängigkeit von der Belastbarkeit der Leber gewählt werden. Um jedoch genaue Schlüsse ziehen zu können, müsste man noch intensiver den Einfluss anderer Größen, insbesondere die unmarkierte Antikörpermenge, zu untersuchen. Vor allem muss der Einfluss des Belegungsgrades von dem der vorherigen Gabe unmarkierter Antikörper getrennt untersucht werden, wozu ein größeres Patientenkollektiv nötig ist.

Verträglichkeit

Der von uns verwendete anti-CD45-Antikörper, YAML568, wurde sehr gut vertragen. Keiner der Patienten entwickelte eine Reaktion mit Ausschüttung von Zytokinen, was daran liegt, dass dieser IgG2a Antikörper nicht in der Lage ist, mit der FcRs auf den Zellen des Patienten zu reagieren. Dies ist ein großer Vorteil von YAML568, da es uns somit möglich war, bis zu 47 mg Antikörper innerhalb einer Minute zu injizieren, ohne dass es zu

unerwünschten Nebenwirkungen kam (14). Im Gegensatz hierzu muss der Murine IgG1 anti-CD45-Antikörper BC8 wegen unerwünschter Nebeneffekte mit einer Geschwindigkeit von 5-10 mg/h über mehrere Stunden gegeben werden, wobei es immer noch zu den Nebenwirkungen kommt (20).

Auch der CD66-Antikörper ist sehr gut verträglich und kann als Bolus injiziert werden. Weniger als 5% der Patienten entwickeln nach einmaliger Gabe humane Anti-Maus-Immunglobulin-Antikörper.

Der in anderen Studien verwendete anti-CD33-Antikörper HuM195 hingegen zeigt unerwünschte Effekte wie Fieber, Rigor und vorübergehender Blutdruckabfall, in Abhängigkeit von der Infusionsgeschwindigkeit (2).

Verteilung anti-CD45, anti-CD66

Vergleicht man die beiden von uns verwendeten Antikörper miteinander, so zeigt sich bei beiden eine günstige Verteilung unter Beachtung des Knochenmark/Leber Quotienten. Jedoch fällt dieser, bezogen auf die Verweildauern, bei den Patienten, die mit anti-CD66-Antikörper behandelt wurden, besser aus (KM/L=7,6) als bei denen mit anti-CD45-Antikörpern (KM/L=2,53). Beide in dieser Studie untersuchten Antikörper zeigten aber eine bessere Verteilung als der in vorherigen Studien untersuchte CD33-Antikörper (KM/L=1,7) (15). Diese Ergebnisse zeigen, dass beide untersuchten Antikörper sich gut für die Radioimmuntherapie im Rahmen der Konditionierung von KMT eignen. Der Vorteil des anti-CD45-Antikörpers liegt in der direkten Bindung an leukämischen Zellen wodurch Ansammlungen solcher Zellen auch durch Nuklide mit kurzer Reichweite getroffen werden.

Vor allem kann die Therapie mit anti-CD45-Antikörper in Zukunft noch optimiert werden unter Berücksichtigung des Belegungsgrades und durch die vorherige Gabe kalter Antikörper.

Dies wird nochmals deutlich, wenn man betrachtet, dass ein Belegungsgrad von 5,2 eine schlechtere Verteilung mit sich bringt, da der Quotient des anti-CD45-Antikörper unter Ausschluss derer, die mit einem Belegungsgrad von 5,2 behandelt wurden, 3,0 wird.

Da beide Antikörper gute Ergebnisse zeigen, bietet sich somit auch die Möglichkeit, von dem einen auf den anderen Antikörper zu wechseln, falls sich bei einzelnen Patienten eine ungünstige Verteilung ergibt.

Beide Antikörper (anti-CD45, anti-CD66) zeigen hinsichtlich der besseren Verteilung, sowie der Verträglichkeit, Vorteile gegenüber dem in anderen Studien verwendeten anti-CD33-Antikörper. Vor allem was die Verträglichkeit des anti-CD45-Antikörper angeht ist der YAML568, dem murinen IgG1 Antikörpers BC8 überlegen (14).

Einfluss der Streukorrektur

Beim Vergleich der Auswertung der Bilder mit oder ohne Streukorrektur (TEW) zeigte sich, dass die Ergebnisse beider Methoden nur im Mittel zu ähnlichen Ergebnissen führen.

Auffällig ist die größere Standardabweichung für die Verweildauern im roten Knochenmark und die höhere Verweildauer in der Milz bei der TEW-Methode, wodurch die Strahlenexposition der Milz ohne Streukorrektur eher unterschätzt wird. Im Einzelfall kann also davon ausgegangen werden, dass die Werte ohne Streukorrektur einen größeren systematischen Fehler besitzen.

Der große Unterschied der beiden Methoden bei den Nieren ist als unkritisch zu bewerten, da hier insgesamt nur sehr kleine Werte gemessen wurden, was auch den großen relativen Fehler erklärt. Die große relative Standardabweichung für das Knochenmark spiegelt die problematische Aktivitäts-Quantifizierung in planaren Aufnahmen für kleine Strukturen (LWK) wider.

Da die Auswertung mit der TEW-Methode, unter Verwendung des UlmDos Programms, mit keinem größeren Aufwand verbunden ist als ohne Streukorrektur, ist diese Methode generell zu empfehlen. Auch hat sich das UlmDos Programm als sehr hilfreiches Programm bei der Dosimetrie erwiesen und konnte im Rahmen unserer Auswertungen noch weiter optimiert werden.

Schlussfolgerung

Der anti-CD66-Antikörper sowie der anti-CD45-Antikörper YAML568 sind gut geeignete Antikörper zur gezielten Bestrahlung des Knochenmarks. Beim anti-CD45-Antikörper ist

die genaue Markierungsart wichtig und sollte beachtet und optimiert werden. Auch sollte eine vorherige Gabe von kaltem Antikörper erfolgen. Die genaue Menge des kalten Antikörpers sollte im optimalen Fall patientenindividuell festgelegt werden, z.B. auf der Grundlage der gemessenen Biokinetik während der Dosimetrie.

Bei der Auswertung sollte eine Streukorrektur mit der TEW Methode erfolgen.

5 Zusammenfassung

Das Ergebnis hämatologischer Stammzelltransplantation kann durch die gezielte interne Bestrahlung hämatopoetischer Organe, mittels Radioimmuntherapie, verbessert werden. Hierfür werden verschiedene Antikörper mit radioaktiven Nukliden markiert, und den Patienten intravenös verabreicht. Vor der eigentlichen Radioimmuntherapie wird zunächst eine geringe Menge an markierten Antikörpern verabreicht und deren Bioverteilung, im Rahmen der Dosimetrie, für den jeweiligen Patienten ausgewertet .

Wir untersuchten die Bioverteilung ^{111}In (Indium) markierter anti-CD66 (CD = Cluster of Differentiation) und anti-CD45-Antikörper in einem Patientenkollektiv von 22 Patienten mit hämatologischen Grunderkrankungen bei denen eine Stammzelltransplantation geplant war.

Die Auswertung der Gammakamerabilder erfolgte mit der UlmDos Software wobei auch die Unterschiede bei der Benutzung von Streukorrekturen untersucht wurde. Bei der Verteilung der anti-CD45-Antikörper untersuchten wir speziell den Einfluss des Belegungsgrades der Antikörper mit dem Nuklid, sowie den Nutzen der vorherigen Gabe an kalten (unmarkierten) Antikörpern, um eine vorzeitige Bindung der Antikörper an antigentragenden peripheren Blutzellen zu verhindern.

Bei der Untersuchung der Biokinetik verschiedener Antikörper, anhand der Verweildauern, zeigte sich, dass sowohl der anti-CD66-Antikörper als auch der anti-CD45-Antikörper geeignete Antikörper für die Radioimmuntherapie bei akuten Leukämien sind und auch bei anderen Erkrankungen wie in unserem Patientenkollektiv (SCID = Severe Combined Immunodeficiency, hämolytische Anämie und Beta-Thalassämie) eingesetzt werden können. Es zeigte sich, dass bei dem Einsatz des CD45-Antikörpers eine vorherige Gabe von 0,5 mg/kg KG (Körpergewicht) unmarkierter Antikörper eine günstigere Verteilung (mehr im Knochenmark, weniger in der Leber) ergibt als ohne oder mit geringerer Menge an unmarkierten Antikörpern. Bei der Betrachtung des Belegungsgrades der Antikörper ergaben Werte um 1,3 und 3,8 eine bessere Verteilung und einen höheren Knochenmark/Leber Quotienten, während ein Belegungsgrad von 5,2 zu ungünstigerer Verteilung führte. Bei der Auswertung der Bilder kamen wir zu dem Ergebnis, dass ohne die Verwendung der Streukorrektur mittels TEW (Triple Energy Window) die Strahlenexposition der Milz eher unterschätzt wurde.

Schlussfolgernd kamen wir zu dem Ergebnis, dass sowohl der anti-CD66-Antikörper als auch der anti-CD45-Antikörper YAML568 Antikörper eine günstige Biokinetik bei der Radioimmuntherapie im Rahmen der Konditionierung vor PBSCT (Peripheral Blood Stem Cell Transplant) aufweisen. Das Markierungsverfahren ist bei allen Antikörpern wichtig und es sollte insbesondere auf den Belegungsgrad der Antikörper geachtet werden. Beim anti-CD45-Antikörper muss eine vorherige Gabe von etwa 0,5 mg/kg KG (Körpergewicht) unmarkiertem Antikörper erfolgen.

Bei der Auswertung sollte eine Streukorrektur z.B. mit der TEW (Triple Energy Window) - Methode erfolgen, weil sich die Ergebnisse damit deutlich verändern.

6 Literaturverzeichnis

1. Adelstein SJ, Green AJ, Howell RW, Humm JL, Leichner PK, O'Donoghue JA, Strand SE, Wessels BW: Absorbed-dose specification in nuclear medicine. J ICRU 2: 1-110 (2002)
2. Amadori S, Stasi R: Monoclonal antibodies and immunoconjugates in acute myeloid leukemia. Best Pract Res Clin Haematol 19:715-36 (2006)
3. Bindon CI, Hale G, Clark M, Waldmann H: Therapeutic potential of monoclonal antibodies to the leukocyte-common antigen. Synergy and interference in complement-mediated lysis. Transplantation 40:538-44 (1985)
4. Bindon CI, Hale G, Waldmann H: Importance of antigen specificity for complement-mediated lysis by monoclonal antibodies. Eur J Immunol 18:1507-14 (1988)
5. Buchmann I, Kull T, Glatting G, Bunjes D, Hale G, Kotzerke J, Rattat D, Dohner H, Reske SN : A comparison of the biodistribution and biokinetics of ^{99m}Tc-anti-CD66 mAb BW 250/183 and ^{99m}Tc-anti-CD45 mAb YTH 24.5 with regard to suitability for myeloablative radioimmunotherapy. Eur J Nucl Med Mol Imaging 30:667-73 (2003)
6. Buchmann I, Meyer RG, Herr W, Helisch A, Bartenstein P: Radioimmunotherapy for treatment of acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndrome: conceptual chances. Nuklearmedizin 44:107-17 (2005)
7. Bunjes D, Glatting G, Neumaier B, Friesen C, Blumstein NM, Reske SN. Radioimmunkonjugate in der Therapie von Leukämien. In: Radioimmuntherapie in der Hämatologie und Onkologie, Trümper L, UNI-MED SCIENCE, Bremen, ISBN 978-3-89599-804-1, S. 56-68, 2007.

8. Bunjes D, Reske N. Einsatz von ^{90}Y-markierten Antikörpern zur Intensivierung der Konditionierung bei Patienten mit hämatologischen Neoplasien und hohem Rezidivrisiko (2007 persönliche Mitteilung)
9. Corson DT, Meares CF: Efficient multigram synthesis of the bifunctional chelating agent (S)-1-p-isothiocyanatobenzyl-diethylene- tetramine pentaacetic acid. Bioconjug Chem 11:300 (2000)
10. Delpon G, Ferrer L, Lisbona A, Bardies M: Impact of scatter and attenuation corrections for iodine-131 two-dimensional quantitative imaging in patients. Cancer Biother Radiopharm 18:191-9 (2003)
11. Galfre G, Milstein C, Wright B: Rat x rat hybrid myelomas and a monoclonal anti-Fd portion of mouse IgG. Nature 277:131-3 (1979)
12. Glatting G, Landmann M, Kull T, Wunderlich A, Blumstein NM, Buck AK, Reske SN: Internal radionuclide therapy: the ULMDOS software for treatment planning. Med Phys 32:2399-405 (2005)
13. Glatting G, Landmann M, Kull T, Wunderlich A, Blumstein N, Koop B, Neumaier B, Reske SN: UlmDos - a software tool for voxelbased dosimetry before radionuclide therapy. Biomed Tech 50: 94-95 (2005)
14. Glatting G, Müller M, Koop B, Hohl K, Friesen C, Neumaier B, Berrie E, Bird P, Hale G, Blumstein NM, Waldmann H, Bunjes D, Reske SN: Anti-CD45 monoclonal antibody YAML568: A promising radioimmunoconjugate for targeted therapy of acute leukemia. J Nucl Med 47:1335-41 (2006)
15. Jurcic JG, Larson SM, Sgouros G, McDevitt MR, Finn RD, Divgi CR, Ballangrud AM, Hamacher KA, Ma D, Humm JL, Brechbiel MW, Molinet R, Scheinberg DA: Targeted alpha particle immunotherapy for myeloid leukemia. Blood 100:1233-9 (2002)

16. Kassis AI, Adelstein SJ: Radiobiologic principles in radionuclide therapy. J Nucl Med 46 Suppl 1:4S-12S (2005)

17. Kotzerke J, Bunjes D, Scheinberg DA: Radioimmunoconjugates in acute leukemia treatment: the future is radiant. Bone Marrow Transplant 36:1021-6(2005)

18. Kotzerke J, Glatting G, Seitz U, Rentschler M, Neumaier B, Bunjes D, Duncker C, Dohr D, Bergmann L, Reske SN: Radioimmunotherapy for the intensification of conditioning before stem cell transplantation: differences in dosimetry and biokinetics of ^{188}Re- and ^{99m}Tc-labeled anti-NCA-95 MAbs. J Nucl Med 41:531-7 (2000)

19. Loevinger R, Budinger TF, Watson EE: MIRD Primer for absorbed dose calculations. New York: The Society of Nuclear Medicine; (1989)

20. Matthews DC, Appelbaum FR, Eary JF, Fisher DR, Durack LD, Bush SA, Hui TE, Martin PJ, Mitchell D, Press OW, Badger CC, Storb R, Nelp WB, Bernstein ID: Development of a marrow transplant regimen for acute leukemia using targeted hematopoietic irradiation delivered by ^{131}I-labeled anti-CD45 antibody, combined with cyclophosphamide and total body irradiation. Blood 85:1122-31 (1995)

21. Nemecek ER, Hamlin DK, Fisher DR, Krohn KA, Pagel JM, Appelbaum FR, Press OW, Matthews DC: Biodistribution of yttrium-90-labeled anti-CD45 antibody in a nonhuman primate model. Clin Cancer Res 11:787-94 (2005)

22. Pippin CG, Parker TA, McMurry TJ, Brechbiel MW: Spectrophotometric method for the determination of a bifunctional DTPA ligand in DTPA-monoclonal antibody conjugates. Bioconjug Chem 3:342-5 (1992)

23. Quek L, Thein SL: Molecular therapies in beta-thalassaemia. Br J Haematol 136:353-65 (2007)

24. Renz-Polster H, Braun J (Hrsg) Basislehrbuch Innere Medizin, 2. Aufl., Urban und Fischer Verlag, S. 283-290 (2001)

25. Reske SN, Bunjes D, Buchmann I, Seitz U, Glatting G, Neumaier B, Kotzerke J, Buck A, Martin H, Dohner H, Bergmann L: Targeted bone marrow irradiation in the conditioning of high-risk leukaemia prior to stem cell transplantation Eur J Nucl Med 28:807-15 (2001)

26. Schubiger PA, Hasler PH, Novak-Hofer I, Blauenstein P: Assessment of the binding properties of Granuloszint. Eur J Nucl Med 15:605-8 (1989)

27. Siegel JA, Thomas SR, Stubbs JB, Stabin MG, Hays MT, Koral KF, Robertson JS, Howell RW, Wessels BW, Fisher DR, Weber DA, Brill BA: MIRD pamphlet no. 16: Techniques for quantitative radiopharmaceutical biodistribution data acquisition and analysis for use in human radiation dose estimates. J Nucl Med 40: 37S-61S (1999)

28. Wong JY, Chu DZ, Yamauchi D, Odom-Maryon TL, Williams LE, Liu A, Esteban JM, Wu AM, Primus FJ, Beatty JD, Shively JE, Raubitschek AA: Dose escalation trial of indium-111-labeled anti-carcinoembryonic antigen chimeric monoclonal antibody (chimeric T84.66) in presurgical colorectal cancer patients. J Nucl Med 39:2097-104 (1998)

29. Yang YL, Lu MY, Jou ST, Lin KH, Lin DT: Hematopoietic stem cell transplantation in Taiwanese children with primary immunodeficiency. J Formos Med Assoc 104:101-6 (2005)

30. Zenz T, Schlenk RF, Glatting G, Neumaier B, Blumstein N, Buchmann I, von Harsdorf S, Ringhoffer M, Wiesneth M, Keller F, Kotzerke J, Rottinger E, Stilgenbauer S, Dohner H, Reske SN, Bunjes D: Bone marrow transplantation

nephropathy after an intensified conditioning regimen with radioimmunotherapy and allogeneic stem cell transplantation. J Nucl Med 47:278-86 (2006)

Dank

Dank all denen, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben, vor allem Herrn Prof. Dr. G. Glatting für seine ständige und gute Betreuung. Dank an Prof. Dr. Sven N. Reske für die Bereitstellung des Themas.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Michael Landmann und Herrn Peter Kletting für ihre Mitarbeit und Hilfsbereitschaft.

Viele Dank an meine Eltern, die mit ihrer Unterstützung und Hilfe immer für mich da waren.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Müller
Vorname	Marguerite
Geburtstag	02. März 1983
Geburtsort	Sigmaringen
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Familienstand	ledig
Eltern	Hugo Müller und Inge Reichle-Müller
Geschwister	Jana Angela Müller, Stefan Müller

Schulbildung

1989 – 1991	Grundschule der Deutschen Schule London
1991 – 1993	Bilharzschule Sigmaringen
1993 – 2002	Hohenzollerngymnasium Sigmaringen mit Abitur Abschluss

Studium/Prüfungen

Okt. 2002 – Aug. 2004	Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Universität Ulm. Grundstudium.
Seit Aug.2004	Abschluss: Ärztliche Vorprüfung am 31.08.2004 Klinischer Abschnitt an der Universität Ulm

Publikationen:

1. G. Glatting, M. Müller, B. Koop, K. Hohl, C. Friesen, B. Neumaier, E. Berrie, P. Bird, G. Hale, N.M. Blumstein, H. Waldmann, D. Bunjes, S.N. Reske. Anti-CD45 monoclonal antibody (YAML568) – a promising radioimmunoconjugate for targeted therapy of acute leukemia. *J Nucl Med* 47(8): 1335-1341, 2006. (IF=4.986)

2. G. Glatting, M. Müller, T. Kull, S.N. Reske. Einfluss der Streukorrektur auf die Dosimetrie-Ergebnisse bei planaren Gammakamera-Messungen mit ^{111}In. In: *Medizinische Physik 2006*, Hrsg.: L. Bogner und B. Dobler, ISBN 3-925218-87-4, Seiten 10-11, Jahrestagung der DGMP, Regensburg, 2006.

3. M. Müller, M. Landmann, T. Kull, S. Reske, G. Glatting. Einfluss der Streukorrektur auf die Dosimetrie-Ergebnisse bei planaren Gammakamera-Messungen von In-111-markiertem anti-CD45 Antikörper. Nuklearmedizin 2006; 45(2): A48, V119

4. G. Glatting, M. Müller, B. Koop, C. Friesen, B. Neumaier, D. Bunjes, S. Reske. Biodistribution von In-111-markiertem anti-CD45 (YAML568) Antikörper in Patienten. Nuklearmedizin 2006; 45(2): A114, P81

5. G. Glatting, M. Müller, B. Koop, C. Friesen, B. Neumaier, K. Hohl, N. M. Blumstein, D. Bunjes, S.N. Reske. Anti-CD45 monoclonal antibody (YAML568) - A promising radioimmunoconjugate for targeted therapy of acute leukemia. J Nucl Med (Suppl 1) 2006; 47(5): 410P-411P, No. 1551

6. F. M. Mottaghy, G. Glatting, M. Müller, B. Neumaier, B. Koop, K. Hohl, C. Friesen, G. Hale, N. M. Blumstein, D. Bunjes, S. N. Reske. Biodistribution of mAb YAML568 labelled with ^{111}In in acute myeloid leukemia. Eur J Nucl Med Mol Imaging 2006; 33 Suppl 2: P753, S375