

Aus der Klinik für Nuklearmedizin, Molekulare Bilddiagnostik und Therapie

(Direktor: Priv.-Doz. Dr. med. habil. Ulf Lützen)

im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Plasmaproteinbindung und Prostatakarzinomzell-Uptake der Radiopharmaka ^{68}Ga -PSMA-11
und ^{177}Lu -PSMA-617 in Abhängigkeit von der Konzentration des kalten Präkursors**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Niklas Nithack

aus Berlin

Kiel 2023

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Maaz Zuhayra

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Frank-André Siebert

Tag der mündlichen Prüfung: 18.03.2025

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 13.01.2025

gez.: Prof. Dr. rer. nat. Maaz Zuhayra

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1 Das Prostatakarzinom	1
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie	1
1.1.2 Diagnostik	1
1.1.2.1 Früherkennung und Primärdiagnostik	1
1.1.2.2 Grading	2
1.1.2.3 Staging	2
1.1.3 Therapie	4
1.1.3.1 Active Surveillance	4
1.1.3.2 Radikale Prostatektomie	4
1.1.3.3 Strahlenmedizin	4
1.1.3.4 Antiandrogene Therapie und Chemotherapie	5
1.1.3.5 Watchful Waiting	5
1.2 Nuklearmedizinische Diagnostik und Therapie beim Prostatakarzinom	6
1.2.1 Radiopharmaka	6
1.2.2 Prostataspezifisches Membranantigen	6
1.2.2.1 PSMA-Liganden	7
1.2.2.2 Small-molecule-Inhibitoren	7
1.2.3 Positronen-Emissions-Tomographie	9
1.2.3.1 PET/CT-Prostatadiagnostik	9
1.2.3.2 ⁶⁸ Ga-PSMA-11	10
1.2.4 Radioligandentherapie mit ¹⁷⁷ Lu-PSMA	11
1.3 Präkursoren	11
1.4 Plasmaproteine und Plasmaproteinbindung	12
1.4.1 Plasmaproteine	12

1.4.2 Plasmaproteinbindung	13
1.4.2.1 Plasmaproteinbindung bei ^{177}Lu -PSMA-Liganden	14
1.4.2.2 Plasmaproteinbindung bei ^{68}Ga -PSMA-Liganden.....	14
1.5 Ziele der Arbeit	15
2. Material und Methoden	16
2.1 Material	16
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	16
2.1.2 Chemikalien	18
2.1.3 Radiopharmaka	19
2.1.4 Prostatakarzinom-Zelllinien und Zellmedien	20
2.1.5 Software	20
2.2 Methoden.....	21
2.2.1 Zellkultivierung	21
2.2.2. Untersuchungen mit ^{68}Ga -PSMA-11.....	21
2.2.2.1 Herstellung von ^{68}Ga -PSMA-11	21
2.2.2.2 Bestimmung der Plasmaproteinbindung von ^{68}Ga -PSMA-11	22
2.2.2.3 Bestimmung des Zell-Uptakes von ^{68}Ga -PSMA-11.....	23
2.2.3 Untersuchungen mit ^{177}Lu -PSMA-617	24
2.2.3.1 Herstellung von ^{177}Lu -PSMA-617.....	24
2.2.3.2 Bestimmung der Plasmaproteinbindung von ^{177}Lu -PSMA-617.....	24
2.2.3.3 Bestimmung des Zell-Uptakes von ^{177}Lu -PSMA-617	24
2.2.4 Zellproteinquantifizierung.....	25
2.2.5 Statistische Auswertung	25
3. Ergebnisse.....	26
3.1 Synthese der Radiopharmaka	26
3.2 Plasmaproteinbindung und Zell-Uptake von ^{68}Ga -PSMA-11	27
3.2.1 Plasmaproteinbindung von ^{68}Ga -PSMA-11	27

3.2.2 Uptake von ^{68}Ga -PSMA-11 durch LNCaP- und PC-3-Zellen	28
3.2.3 Vergleich der Plasmaproteinbindung und des Zell-Uptakes von ^{68}Ga -PSMA-11	29
3.3 Plasmaproteinbindung und Zell-Uptake von ^{177}Lu -PSMA-617	31
3.3.1 Plasmaproteinbindung von ^{177}Lu -PSMA-617	31
3.3.2 LNCaP-Zell-Uptake von ^{177}Lu -PSMA-617	32
4. Diskussion	34
4.1 Diagramme und Kurvenverläufe	34
4.2 Bedeutung der Plasmaproteinbindung für den Einsatz von PSMA-Liganden	36
4.3 Einfluss des Prostatakarzinomzell-Uptakes von PSMA-Liganden auf die Diagnostik und Therapie des Prostatakarzinoms	38
4.4 Schlussfolgerung und Ausblick	40
5. Zusammenfassung.....	43
6. Literaturverzeichnis	45
7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	55
Danksagung	57
Veröffentlichungen.....	58

Abkürzungsverzeichnis

Bq	Becquerel
CPM	Counts per minute; Zählrate zur Messung von radioaktivem Zerfall
CT	Computertomographie
Da	Dalton
DRU	Digitale rektale Untersuchung
^{18}F	$^{18}\text{Fluor}$
FBS	Fetales Kälberserum
FDG	Fluordesoxyglucose
^{68}Ga	$^{68}\text{Gallium}$
^{68}Ge	$^{68}\text{Germanium}$
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
LDR	Low-Dose-Rate
^{177}Lu	$^{177}\text{Lutetium}$
mCRPC	Metastasiertes kastrationsresistentes Prostatakarzinom
MRT	Magnetresonanztomographie
NaCl	Natriumchlorid-Lösung, Kochsalzlösung
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PSMA	Prostata-spezifisches Membranantigen
TRUS	Transrektaler Ultraschall
^{90}Y	$^{90}\text{Yttrium}$

1. Einleitung

1.1 Das Prostatakarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Prostatakrebs ist weltweit die am häufigsten diagnostizierte Krebserkrankung bei Männern (Bray et al. 2018). In Deutschland sind knapp ein Viertel aller Krebsneuerkrankungen bei Männern durch das Prostatakarzinom verursacht sowie 12 % aller Krebssterbefälle. Im Jahr 2018 sind hierzulande 65.200 Männer in einem mittleren Erkrankungsalter von 71 an Prostatakrebs erkrankt und 14.963 daran verstorben (Robert Koch-Institut 2021). Prostatakarzinome werden vor dem 50. Lebensjahr kaum beobachtet. So liegt das Risiko für einen 75-jährigen Mann, in den nächsten zehn Jahren zu erkranken, bei etwa 6 %, das Risiko eines 35-jährigen Mannes beträgt dagegen unter 0,1 %. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate für Prostatakrebs ist mit 89 % vergleichsweise günstig (Robert Koch-Institut 2021).

„Ursachen für die Entstehung des Prostatakarzinoms und die den Verlauf beeinflussenden Faktoren sind im Wesentlichen unbekannt“ (Robert Koch-Institut 2021, S. 106). Neben dem Alter ist eine genetische Disposition als Risikofaktor belegt. Zudem sind Männer schwarzafrikanischen Ursprungs häufiger von Prostatakrebs betroffen als Europäer und weiße Nordamerikaner. Asiaten erkranken deutlich seltener (Pernar et al. 2018, Robert Koch-Institut 2021). Die Prävention von Prostatakrebs ist eine Herausforderung, da etablierte Risikofaktoren, einschließlich Alter, ethnische Herkunft, Familiengeschichte und genetische Varianten, in erster Linie nicht veränderbar sind (Pernar et al. 2018).

1.1.2 Diagnostik

1.1.2.1 Früherkennung und Primärdiagnostik

Das gesetzliche Früherkennungsprogramm in Deutschland wird derzeit für Männer ab einem Alter von 45 Jahren empfohlen. Die Vorsorgeuntersuchung beinhaltet unter anderem die Untersuchung der äußeren Geschlechtsorgane sowie die digitale rektale Untersuchung (DRU). Die Bestimmung des Prostataspezifischen Antigens (PSA) im Blut ist kein Bestandteil der gesetzlichen Früherkennung, da dessen Nutzen nicht zweifelsfrei belegt werden konnte (Robert Koch-Institut 2021). Dennoch wird der PSA-Test immer häufiger, auch auf Patientenwunsch hin, in Anspruch genommen. Neben Tastuntersuchung und PSA-Wert-Bestimmung kann die transrektale

Ultraschalluntersuchung (TRUS) als ergänzende bildgebende Diagnostik eingesetzt werden. Laut neuester Leitlinie sollte eine Magnetresonanztomographie (MRT) ebenfalls im Rahmen der Primärdiagnostik des Prostatakarzinoms durchgeführt werden (Leitlinienprogramm Onkologie 2021).

Bei karzinomverdächtigen Befunden sollte eine systematische transrektale sonographiegesteuerte Stanzbiopsie, sogenannte TRUS-Biopsie, durchgeführt werden (Leitlinienprogramm Onkologie 2021). Alternativ besteht die Möglichkeit einer transperinealen Biopsie. Sie weist die gleiche Diagnosegenauigkeit wie die transrektale Prostatabiopsie auf, birgt jedoch ein geringeres Risiko für Infektionen und rektale Blutungen (Xiang et al. 2019). Bei Patienten mit Verdacht auf ein Prostatakarzinom wird vermehrt direkt eine Fusionsbiopsie durchgeführt. Hierbei werden in der MRT auffällige Befunde in das Ultraschallbild integriert, wodurch sowohl MRT-gezielt als auch systematisch biopsiert werden kann (Leitlinienprogramm Onkologie 2021).

1.1.2.2 Grading

Die entnommenen Biopsien werden histologisch untersucht und im Rahmen des Gradings nach Gleason eingestuft. Hierfür werden Form und Anordnung der Prostataadrüsen beurteilt und die Befunde in 5 Gleason-Muster eingeteilt. Je höher der so vergebene Wert, desto höher ist der Grad der Entdifferenzierung des Tumorgewebes. Es wurde jedoch festgelegt, die Gleason-Muster 1 und 2 nicht mehr zu vergeben, da sie in Karzinomen kaum vorkommen. Der Gleason-Score ergibt sich aus der Addition des primären und des sekundären Grades. Der primäre Grad wird dabei immer durch das im Tumor am häufigsten vorkommende Gleason-Muster gebildet. Der sekundäre Grad ist bei der Prostatastanzbiopsie das am schlechtesten differenzierte, beim Prostatektomiepräparat das am zweithäufigsten vorkommende Gleason-Muster. Der so berechnete Score kann somit Werte zwischen 6 und 10 annehmen. Je höher der Score, desto größer ist das Risiko einer Erkrankungsprogression (Schlomm und Sauter 2016).

1.1.2.3 Staging

Bei Karzinomnachweis in der histologischen Untersuchung muss die Tumorausdehnung bestimmt werden. Hierfür werden die Ergebnisse der bereits durchgeführten Primärdiagnostik berücksichtigt. Ergänzende bildgebende Untersuchungen im Rahmen des Stagings können MRT

und Computertomographie (CT) sowie bei begründetem Verdacht auf Skelettmetastasen eine Skelettszintigraphie sein (Leitlinienprogramm Onkologie 2021).

Die Staging-Ergebnisse werden mithilfe der TNM-Klassifikation dargestellt (vgl. Tabelle 1). Die Stadien T1 und T2 werden als lokal begrenztes, die Stadien T3-4 als lokal fortgeschrittenes Prostatakarzinom zusammengefasst. Sobald befallene Lymphknoten (N1) oder Fernmetastasen (M1) vorliegen, wird von einem fortgeschrittenen bzw. metastasierten Prostatakarzinom gesprochen. Im Rahmen der lymphogenen Metastasierung sind primär die lokalen, pelvinen Lymphknotenstationen betroffen. Fernmetastasen treten am häufigsten im Knochen, hier insbesondere in der Wirbelsäule, auf. Die Filialisierung in anderen Lokalisationen wie Leber oder Lunge ist möglich, kommt jedoch seltener vor (Bubendorf et al. 2000).

Tabelle 1: Vereinfachte Darstellung der TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms (nach Wittekind 2017)

TNM	Tumorausdehnung
T1	Tumor klinisch nicht erkennbar
T2	Tumor auf Prostata begrenzt a: < 50% eines Seitenlappens b: > 50% eines Seitenlappens c: beide Seitenlappen betroffen
T3	Tumor durchbricht die Prostatakapsel
T4	Tumor infiltriert Nachbarorgane (außer Samenblase)
N1	Regionärer Lymphknotenbefall
M1	Fernmetastasen vorhanden

Die lokal begrenzten Prostatakarzinome können nach D'Amico weiter stratifiziert werden. Diese Risikoeinteilung spielt eine entscheidende Rolle für die Planung des Therapiekonzepts. Maßgeblich hierfür sind PSA-Wert, Gleason-Score und T-Kategorie. Ein geringes Risikoprofil (Low-Risk) haben $\leq$ T2a Prostatakarzinome mit einem PSA-Wert unter 10 ng/ml und einem Gleason-Score $\leq$ 6. Tumoren mit mittlerem (PSA 10-20 ng/ml oder Gleason-Score 7 oder T2b) und hohem Risiko (PSA >20 ng/ml oder Gleason-Score $\geq$ 8 oder T2c) werden als Intermediate- bzw. High-Risk Prostatakarzinome bezeichnet (D'Amico et al. 1998, Leitlinienprogramm Onkologie 2021).

1.1.3 Therapie

Prostatakarzinome werden in den meisten Fällen in einem nicht fortgeschrittenen Stadium erkannt und haben eine insgesamt gute Prognose. Ungefähr 65 Prozent der erstdiagnostizierten Prostatakarzinome zählen zu den lokal begrenzten Prostatakarzinomen (Robert Koch-Institut 2021). Männer mit der Diagnose eines Prostatakarzinoms im Frühstadium (T1 oder T2) oder eines niedrigen oder mittleren Grades haben ein Sterblichkeitsrisiko, das mit dem von Männern ohne Krebs vergleichbar ist (Ketchandji et al. 2009). Die Therapieoptionen beim Prostatakarzinom sind vielfältig. Je nach Tumorstadium stehen verschiedene Therapien zur Auswahl.

1.1.3.1 Active Surveillance

Active Surveillance, also „aktives Überwachen“, stellt bei einem lokal begrenzten Prostatakarzinom mit geringem Risikoprofil eine Therapiemöglichkeit dar (Leitlinienprogramm Onkologie 2021). Hierbei werden regelmäßige Kontrolluntersuchungen, wie PSA-Wert-Bestimmung, DRU und Rebiopsien, durchgeführt. Sollte eine Progression eintreten, wird in kurativer Absicht die weitere Therapie eingeleitet. Das Ziel von Active Surveillance ist es, eine Übertherapie zu vermeiden bei gleichzeitiger Möglichkeit des schnellen Reagierens auf eine Befundverschlechterung (Heidenreich et al. 2014).

1.1.3.2 Radikale Prostatektomie

Die radikale Prostatektomie (ggf. mit Lymphadenektomie) ist in allen Stadien ohne Fernmetastasierung eine mögliche Therapieoption mit kurativer Absicht. Die Erhaltung der Potenz sowie der Kontinenz ist bei diesem operativen Verfahren besonders herausfordernd. Im Vergleich zu einem abwartenden Verhalten profitieren Patienten erheblich von einer radikalen Prostatektomie (Bill-Axelson et al. 2018). Selbst bei Rezidiven nach primärer Strahlentherapie kann eine Prostatektomie mit kurativer Absicht durchgeführt werden (sogenannte Salvage-Prostatektomie).

1.1.3.3 Strahlenmedizin

Eine wichtige Rolle in der kurativen Therapie spielt die Strahlenmedizin. Sowohl bei lokal begrenzten Karzinomen als alleinige Therapie als auch bei lokal fortgeschrittenen Karzinomen in

Kombination mit einer antiandrogenen Therapie ist die perkutane Bestrahlung eine gleichwertige Alternative zur radikalen Prostatektomie (Hamdy et al. 2016, Leitlinienprogramm Onkologie 2021). Bei Rezidiven nach vorheriger Prostatektomie ist eine Radiatio mit kurativer Intention eine mögliche Therapie (Salvage-Strahlentherapie). Bei lokal begrenzten Prostatakarzinomen mit geringem Risikoprofil kann die Low-Dose-Rate-Brachytherapie (LDR-Brachytherapie) mit transperinealen Jod-125- bzw. Palladium-103-Seeds erfolgreich eingesetzt werden (Heidenreich et al. 2014).

1.1.3.4 Antiandrogene Therapie und Chemotherapie

Die antiandrogene Therapie wird bei fortgeschrittenen Prostatakarzinomen in Kombination mit einer Bestrahlung oder als adjuvante Hormontherapie nach Prostatektomie eingesetzt. Der Hormonentzug wird entweder durch Orchiektomie oder durch medikamentöse Androgensuppression erreicht. Da Testosteron das Wachstum von Prostatazellen stimuliert, kann die Hormonentzugstherapie das androgenabhängige Wachstum von Prostatakarzinomen einschränken und damit den Progress deutlich verlangsamen (Banerjee et al. 2018). Kommt es trotz Hormontherapie und niedrigem Testosteronspiegel zu einem erneuten Wachstum, spricht man von einem kastrationsresistenten Prostatakarzinom. Bei Kastrationsresistenz sind die systemische Therapie mit Abirateron oder Enzalutamid oder eine Chemotherapie mit Docetaxel mögliche Optionen (Leitlinienprogramm Onkologie 2021).

Bei metastasierten Prostatakarzinomen sollte neben einer antiandrogenen Therapie eine Chemotherapie mit Docetaxel eingeleitet werden, da die Hormon-Chemotherapie einen Überlebensvorteil bei metastasierten hormonsensitiven Prostatakarzinomen bietet (Leitlinienprogramm Onkologie 2021, Kyriakopoulos et al. 2018).

1.1.3.5 Watchful Waiting

Bei Patienten, die sich gegen eine kurative Therapie entscheiden, können durch das Konzept des Watchful Waiting mögliche unerwünschte Therapiefolgen vermieden werden. Die Patienten werden palliativ, jedoch symptomorientiert behandelt. Dieser Ansatz sollte vor allem bei einer Lebenserwartung von weniger als zehn Jahren diskutiert werden (Leitlinienprogramm Onkologie 2021).

1.2 Nuklearmedizinische Diagnostik und Therapie beim Prostatakarzinom

Das Prostatakarzinom gilt als der Krebs des alten Mannes. Gerade in Anbetracht des demographischen Wandels und der jährlich zunehmenden Lebenserwartung muss von einer immer weiter steigenden Anzahl von Prostatakarzinom-Diagnosen ausgegangen werden. Mit dem erwarteten Anstieg der Fallzahlen wird sich auch der Bedarf an Diagnostik und Therapie erhöhen. Hier kommt der Nuklearmedizin bei Patienten mit Prostatakrebs ein immer größerer Stellenwert zu. Diagnostisch wird die Positronen-Emissions-Tomographie zur Darstellung von Metastasen und Tumorherden eingesetzt. Therapeutisch kommen Radiopharmaka unter anderem bei für metastasierte Prostatakarzinome häufig auftretenden Knochenmetastasen zum Einsatz, da gezeigt werden konnte, dass der Alpha-Strahler Radium-223 das Gesamtüberleben verbessert (Parker et al. 2013). Zudem kann bei kastrationsresistenter, progredienter Erkrankung nach Ausschöpfen der empfohlenen Therapieoptionen eine individuelle Therapie mittels Radioligandentherapie versucht werden.

1.2.1 Radiopharmaka

Radiopharmaka, auch Tracer genannt, sind in der Nuklearmedizin eingesetzte Arzneistoffe, die Strahlung aussenden. Diese werden durch Kopplung von radioaktiven Nukliden an eine nicht-radioaktive Trägersubstanz, die sogenannten Präkursor, hergestellt. Je nach Trägersubstanz können verschiedene Organsysteme dargestellt beziehungsweise angesteuert werden.

Für nuklearmedizinische Interventionen bei Prostatakrebs stehen verschiedene Radiopharmaka zur Verfügung. Zu den möglichen Tracern für die diagnostische Prostata-Bildgebung mittels der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) zählen ^{18}F -FDG (^{18}F -Fluordesoxyglukose), cholinbasierte Tracer (^{18}F - oder ^{11}C -Cholin, ^{18}F -Methylcholin, ^{18}F -Ethylcholin) sowie ^{68}Ga -markierte Prostataspezifische Membranantigen-Liganden (PSMA-Liganden) wie z.B. ^{68}Ga -PSMA-11. Als therapeutische Radiopharmaka können zum Beispiel ^{177}Lu -PSMA-617 und ^{131}I -MIP-1466 eingesetzt werden (Haberkorn et al. 2016).

1.2.2 Prostataspezifisches Membranantigen

Das Prostataspezifische Membranantigen (PSMA) ist eine Protease, deren genaue physiologische Funktion weitestgehend unbekannt ist. Neben bekannten enzymatischen Aktivitäten und der Wirkung als Folat-Hydrolase wird unter anderem eine mögliche Rezeptorfunktion und eine Rolle

bei der Zellmigration und -proliferation diskutiert (Rajasekaran et al. 2005, Chang 2004). Als Zelloberflächenprotein ist PSMA in der Transmembran lokalisiert und hat eine dreiteilige Struktur, bestehend aus einer großen extrazellulären Domäne mit 707 Aminosäuren, einem transmembranen Anteil mit 24 Aminosäuren und einem zytosolischen Teil mit 19 Aminosäuren (Afshar-Oromieh et al. 2013, Chang 2004). Das Molekulargewicht des nicht modifizierten PSMA beträgt 84 kDa (Dalton), durch posttranslationale Modifikation kann die molekulare Masse um die 100 kDa erreichen (Barinka et al. 2004, Schülke et al. 2003).

PSMA wird fast ausschließlich in der Prostata exprimiert. In anderen gesunden Geweben des Mannes wurden keine signifikanten PSMA-Spiegel festgestellt (Sokoloff et al. 2000). Bei verschiedenen soliden Malignomen konnte jedoch in der Neovaskulatur eine PSMA-Expression nachgewiesen werden (Silver et al. 1997, Chang et al. 1999).

Bei Untersuchungen an Mäusen konnte gezeigt werden, dass PSMA in vivo die knöchernen Metastasierung fördern kann, indem es die sklerotische Destruktion der Prostatakarzinomzellen erhöht (Zhao et al. 2012). Zudem scheint eine erhöhte Expression von PSMA mit einem höheren Tumorgrad einherzugehen und eine PSMA-Überexpression eine ungünstige Prognose, wie Metastasierung und PSA-Rezidiv, vorhersagen zu können (Ross et al. 2003).

1.2.2.1 PSMA-Liganden

Prostatakarzinomzellen weisen sowohl in der Primärläsion als auch in Metastasen häufig eine stark erhöhte PSMA-Expression im Vergleich zu gesundem Prostatagewebe auf (Bostwick et al. 1998, Haberkorn et al. 2016). Das PSMA konnte daher als mögliche Zielstruktur für Antikörper und Bindungsproteine bei Prostatakrebs detektiert werden, weshalb verschiedene PSMA-Liganden entwickelt wurden. Hierzu zählen monoklonale Antikörper und Small-molecule-Inhibitoren. Diese künstlichen PSMA-Liganden können an Radionuklide gekoppelt und anschließend für die nuklearmedizinische Diagnostik und Therapie von Prostatakrebs eingesetzt werden (Haberkorn et al. 2016).

1.2.2.2 Small-molecule-Inhibitoren

Als Trägersubstanz für Radionuklide zum Andocken an die Prostata haben sich niedermolekulare PSMA-Inhibitoren bewährt. Die Small-molecule-Inhibitoren wurden auf Harnstoffbasis entwickelt und weisen ein Glutamat-Urea-Lysin-Motiv auf (vgl. Abbildung 1), welches an der extrazellulären

Domäne des PSMA-Moleküls bindet (Machulkin et al. 2016, Kwon et al. 2019). Die Größe dieser PSMA-Liganden beträgt nur 1–2 kDa (Haberkorn et al. 2016). Vorteile der Small-molecule-Inhibitoren sind die sehr schnelle Entfernung aus dem Blut, die erhöhte Tumorpermeabilität im Vergleich zu größeren Molekülen wie Antikörpern sowie eine rasche Tumoraufnahme (Barrett et al. 2013). Zu den Small-molecule-Inhibitoren zählen unter anderem PSMA-11 und PSMA-617 (Abbildung 1). Radioaktive Nuklide können an die komplexbildende Einheit der PSMA-Inhibitoren gekoppelt werden, wodurch das Radiopharmakon entsteht.

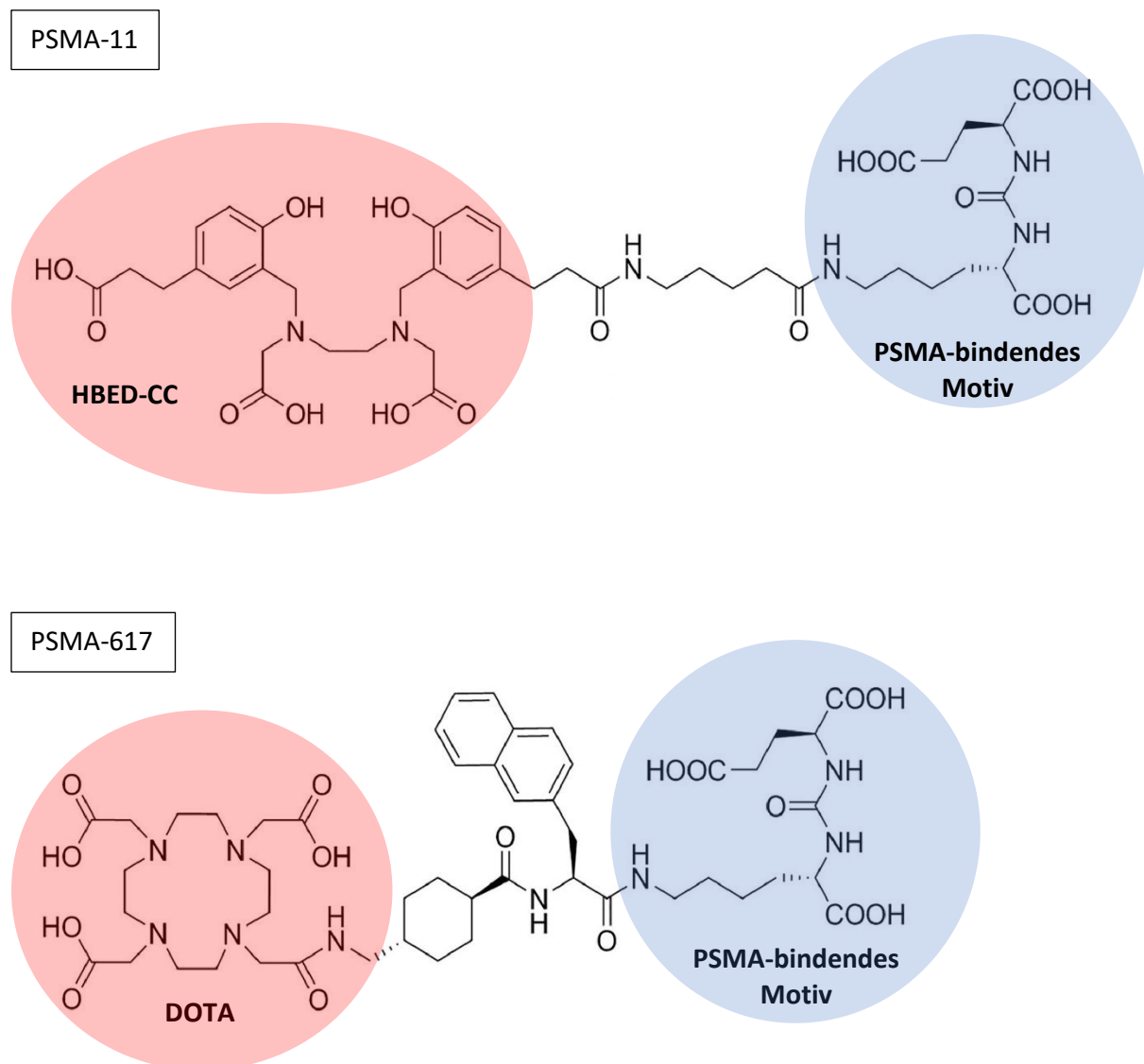


Abbildung 1 Strukturformel der Small-molecule-Inhibitoren PSMA-11 und PSMA-617. Das Glutamat-Urea-Lysin-Motiv (blaue Fläche) und die jeweilige komplexbildende Einheit (rote Fläche) sind markiert (umgezeichnet nach Wester und Schottelius 2019).

1.2.3 Positronen-Emissions-Tomographie

Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) ist ein bildgebendes Untersuchungsverfahren zur Darstellung des Gewebestoffwechsels. Die mit Positronen emittierenden Radionukliden, wie ^{18}F , ^{68}Ga oder ^{11}C , markierten Trägermoleküle reichern sich nach Applikation im Zielgewebe an. Beim Zerfall reagiert das emittierte Positron mit einem freien Elektron, wodurch zwei Gammaquanten entstehen, welche in einem 180 Grad Winkel voneinander wegfliegen. Diese Vernichtungs- bzw. Gammastrahlung wird von um den Patienten ringförmig angeordneten Detektoren registriert (Martínez et al. 2008). Beide Gammaquanten der Vernichtungsstrahlung werden durch eine Prüfung auf Gleichzeitigkeit (Koinzidenzabfrage) zu einem Ereignis verknüpft, wodurch eine hohe Empfindlichkeit bei hoher räumlicher Auflösung erreicht wird (Deutsche Gesellschaft für Nuklearmedizin 2015). Die dabei entstehenden PET-Bilder können mit einer gleichzeitig durchgeführten CT fusioniert werden, wodurch eine präzise Aussage über die Lokalisation der Nuklidanreicherung und damit Stoffwechselaktivität getroffen werden kann.

1.2.3.1 PET/CT-Prostatadiagnostik

Die PET-Untersuchung mit ^{18}F -FDG gilt als Standardverfahren der Nuklearmedizin. Radioaktiv markierte Glucose reichert sich besonders stark in Zellen mit hohem Glukoseumsatz, wie Krebszellen, an, wodurch diese sichtbar gemacht werden. Für die Darstellung von Prostatakrebs ist das FDG-PET jedoch nur bedingt einsetzbar und aktuell nicht zu empfehlen, da die Tumoraufnahme gering ist und es eine Überschneidung der FDG-Aufnahme mit Prostatitis und benigner Prostatahyperplasie gibt (Kitajima et al. 2014, Jadvar 2016).

Auch der Einsatz cholinbasierter Tracer ist im Rahmen der Diagnostik und des Stagings nicht angezeigt. Die diagnostische Genauigkeit für die Beurteilung des Primärtumors ist unzureichend, zudem kann nicht zwischen bösartigen und gutartigen Prostataerkrankungen unterschieden werden (Schuster et al. 2016, Jadvar 2011, Igerc et al. 2008). Für den Rezidiv- und Metastasennachweis bei Restaging-Untersuchungen ist die diagnostische Evidenz dagegen deutlich höher (Umbehre et al. 2013, Schuster et al. 2016).

Neu entwickelte PSMA-Liganden in Kombination mit ^{68}Ga scheinen anderen Tracern bei der Diagnostik von Prostatakarzinomen überlegen zu sein. PSMA wird bei gutartigen Prostataerkrankungen kaum bis gar nicht exprimiert, daher können diese mit PSMA-Liganden von Prostatakarzinomen unterschieden werden (Verburg et al. 2016). Die radioaktiv markierten PSMA-Liganden zeigten bessere Ergebnisse bei der Rezidiv- und Metastasenerkennung im Vergleich zu

cholinbasierten Tracern. So weist ^{68}Ga -PSMA-11 gegenüber ^{18}F -Fluormethylcholin eine höhere Erkennungsrate bei PSA-Anstieg nach kurativer Therapie auf (Morigi et al. 2015). Die ^{68}Ga -PSMA-PET/CT ist genauer und hat einen höheren negativen Vorhersagewert als die ^{18}F -Ethylcholin-PET/CT für die Identifizierung lokal rezidivierender Läsionen und von Becken- oder abdominellen Lymphknotenmetastasen (Sensitivität: 87 vs. 71 %, Spezifität: 93 vs. 87 %) (Pfister et al. 2016). Zudem wurde beschrieben, dass die ^{68}Ga -PSMA-PET/CT bei fast 44 % der Patienten mit negativen ^{18}F -Cholin-PET/CT ein rezidivierendes Geschehen zeigte (Bluemel et al. 2016).

Der Einsatz der PET/CT wird im Rahmen der Primärdiagnostik des Prostatakarzinoms aktuell nicht empfohlen. Hier ist die MRT das Untersuchungsverfahren der Wahl für die Bildgebung der Prostata und die Identifizierung von suspekten Arealen, die gezielt biopsiert werden können (Bhanji et al. 2022). Im Rahmen der Rezidivdiagnostik nach primär kurativer Therapie hat sich das PSMA-PET/CT bereits als Goldstandard etabliert. Auch für das Primärstaging des Prostatakarzinoms, insbesondere bei mittlerem und hohem Risikoprofil, hat die PET/CT einen immer bedeutenderen Stellenwert (Afshar-Oromieh et al. 2019).

1.2.3.2 ^{68}Ga -PSMA-11

Das ^{68}Ga wird aus einem $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generator gewonnen. Das ebenfalls radioaktive Mutternuklid, ^{68}Ge , zerfällt im Generator mit einer Halbwertszeit von etwa 270 Tagen zu ^{68}Ga , das täglich durch Elution mit 0,1 M Salzsäure vom Mutternuklid getrennt und als $^{68}\text{GaCl}_3$ erhalten wird. Durch eine anschließende radiochemische Markierungsreaktion wird der Small-molecule-Inhibitor PSMA-11 (Präkursor) mit dem ^{68}Ga zum Radiopharmakon ^{68}Ga -PSMA-11 gebunden. Für ^{68}Ga -PSMA-11 existieren verschiedene Bezeichnungen, hierzu zählen ^{68}Ga -HBED-PSMA, HBED-CC, Glu-urea-Lys(AHX)-HBED-CC oder Prostamedix (Deutsche Gesellschaft für Nuklearmedizin 2019).

Das ^{68}Ga -PSMA-11 bindet an die exprimierten PSMA-Proteine der Prostatazellen, wird von diesen aufgenommen und kann im Anschluss detektiert werden. Die Biodistribution des ^{68}Ga -PSMA-11-Tracers zeigte innerhalb gesunder Organe die höchste Radiotracer-Aufnahme bei Nieren und Speicheldrüsen, wohingegen bei Tränendrüsen, Leber, Milz und Darm nur eine relativ mäßige Aufnahme erfolgte (Afshar-Oromieh et al. 2013). Die Strahlenbelastung für Patienten ist relativ gering und die Untersuchung wird generell gut vertragen (Pfob et al. 2016).

1.2.4 Radioligandentherapie mit ^{177}Lu -PSMA

Beim kastrationsresistenten progredienten Prostatakarzinom kann ein Therapieversuch mit ^{177}Lu -PSMA angeboten werden. Hierbei wird das an PSMA-Liganden gekoppelte ^{177}Lu nach der Patienteninjektion über Endozytose in die Prostatakarzinomzellen eingeschleust und bestrahlt diese von innen heraus. ^{177}Lu ist ein Beta-Emitter mit einer maximalen Energie von 0,5 MeV und einer maximalen Gewebedurchdringung von <2 mm. Die kurze β -Reichweite ermöglicht eine effektive Bestrahlung kleiner Tumoren und Metastasen, ohne das umgebende Gewebe allzu stark zu schädigen. Darüber hinaus hat ^{177}Lu eine relativ lange physikalische Halbwertszeit von 6,65 Tagen, wodurch Prostatakrebszellen mit hoher Aktivität von ^{177}Lu -PSMA versorgt werden können (Emmett et al. 2017).

Die Radioligandentherapie ist eine relativ neue Option zur Behandlung des metastasierten kastrationsresistenten Prostatakarzinoms (mCRPC), die vielversprechende Ansprechraten aufweist (Kratochwil et al. 2016, Fendler et al. 2017). Die Therapie zeigt PSA-Reduktionen, die mit der derzeit verfügbaren systemischen Therapie vergleichbar sind (Rahbar et al. 2016, Calopedos et al. 2017). Schon vor einigen Jahren wurde publiziert, dass die Radioligandentherapie systemischen Drittlinien-Therapien überlegen zu sein scheint (Rahbar et al. 2017). Dies konnte in einer aktuellen Metaanalyse bestätigt werden, in welcher Drittlinientherapien bei Patienten mit mCRPC in einem Zeitraum von 2006 bis 2021 verglichen wurden. Die Drittlinientherapie mit Abirateron oder Enzalutamid führte zu einem medianen Gesamtüberleben von 4 Monaten, mit Cabazitaxel zu einem medianen Gesamtüberleben von 13 bis 14 Monaten. Die Radioligandentherapie hingegen steigerte das mediane Gesamtüberleben auf 15,3 Monate. Die Ergebnisse dieser Metaanalyse veranlassten die Autoren dazu, die PSMA-basierte Radioligandentherapie als bevorzugte Drittlinienbehandlung zu benennen (von Eyben et al. 2021). Verschiedene Studien belegen, dass die Therapie mit ^{177}Lu -PSMA-617 sicher und gut verträglich ist sowie ein niedriges Nebenwirkungsprofil im Frühstadium darstellt (Khreish et al. 2022, Fendler et al. 2017, Ahmadzadehfar et al. 2015).

1.3 Präkursoren

Bei der Herstellung der Radiopharmaka werden radioaktive Nuklide an Trägersubstanzen, welche als Präkursoren bezeichnet werden, gekoppelt. Radiopharmaka (Radiotracer) sind somit ein Radiotracer-Präkursor-Gemisch. Da die eingesetzte Menge der Präkursoren die der Nuklide um ein Vielfaches übersteigt, ist nur ein Bruchteil der Präkursoren radioaktiv markiert und damit

„heiß“. Präkursoren, die sich in dem Radiotracer-Präkursor-Gemisch befinden, jedoch nicht an ein Radionuklid gebunden sind, werden als „kalt“ beziehungsweise in ihrer Gesamtheit als kalte Substanz bezeichnet. Wird bei der Herstellung der Tracer die eingesetzte Präkursor-Menge verändert, ändert sich dadurch auch die Konzentration des kalten Präkursors im Radiopharmakon.

Zu den wichtigsten Präkursoren, die aus nuklearmedizinischer Sicht bei der Behandlung von Prostatakarzinom-Patienten eingesetzt werden, gehören die Small-molecule-Inhibitoren PSMA-11 und PSMA-617. Das PSMA-11 enthält neben der Glutamat-Urea-Lysin-Bindungseinheit und dem Spacer die komplexbildende Einheit HBED-CC, welche das ^{68}Ga bindet. HBED-CC besitzt jedoch eine hohe Selektivität für ^{68}Ga und ist daher nicht für die Radiomarkierung mit therapeutischen Radionukliden wie ^{177}Lu oder ^{90}Y geeignet (Benešová et al. 2015).

PSMA-617 enthält hingegen eine chelatisierende komplexbildende DOTA-Einheit (1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure), die sowohl ^{68}Ga als auch ^{177}Lu und ^{90}Y binden kann. Es handelt sich bei PSMA-617 um ein sogenanntes Theranostikum. Es kann sowohl zur Diagnostik durch Kopplung an ^{68}Ga als auch zur Therapie durch Kopplung an ^{177}Lu oder ^{90}Y bei Prostatakarzinompatienten eingesetzt werden (Afshar-Oromieh et al. 2015). Es wurde jedoch gezeigt, dass PSMA-617 eine langsamere Tumorakkumulation und Ausscheidungskinetik aufweist als PSMA-11. Daher bietet PSMA-11 mit seiner vermeintlich schnelleren Clearance einen Vorteil, wenn es mit Radionukliden mit kurzer Halbwertszeit wie ^{68}Ga markiert wird und gilt als das bevorzugte Diagnosemittel (Giesel et al. 2017, Afshar-Oromieh et al. 2015).

1.4 Plasmaproteine und Plasmaproteinbindung

1.4.1 Plasmaproteine

Neben Elektrolyten und niedermolekularen Substanzen sind im Blutplasma hauptsächlich Plasmaproteine gelöst. Die Gesamtkonzentration dieser Plasmaproteine liegt in der Regel bei 65-80 g/l. Zu den Aufgaben der Plasmaproteine zählen unter anderem die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks und der Transport von wasserunlöslichen Stoffen, Hormonen und Enzymen. Außerdem sind Plasmaproteine wichtige Bestandteile des Immun- und Gerinnungssystems (Schmidt und Lang 2007).

Die Plasmaproteine können elektrophoretisch in verschiedene Proteinfractionen unterteilt werden. Hierzu zählen Albumine sowie α_1 -, α_2 -, β - und γ - Globuline. Eine Übersicht über einige Vertreter sowie ihrer molekularen Massen ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Übersicht ausgewählter Plasmaproteine und ihrer Molekülmassen (umgezeichnet nach Schmidt und Lang 2007)

Fraktion	Protein	Vorkommen im Plasma [g/l]	Molekulare Masse [kDa]
Albumin	Präalbumin	0,3	61
	Albumin	40,0	69
α_1 -Globuline	Saures α_1 -Glykoprotein	0,8	44
	α_1 -Lipoprotein	3,5	200
α_2 -Globuline	α_2 -Makroglobulin	2,5	820
	α_2 -Haptoglobin	1,0	85
β -Globuline	Transferrin	3,0	90
	Fibrinogen	3,0	340
γ -Globuline	Immunglobulin G	12,0	156
	Immunglobulin M	1,2	960

1.4.2 Plasmaproteinbindung

Wenn Pharmaka in die Blutlaufbahn gelangen, können diese an Plasmaproteine gebunden werden. Insbesondere Albumin kann aufgrund seiner verschiedenen Bindungsstellen viele Arzneistoffe binden (Freissmuth 2016). Solange die Bindung zwischen Plasmaprotein und Arzneistoff besteht, werden diese zusammen im Blut transportiert, sind jedoch pharmakologisch unwirksam (Seifert 2018). Die Wirkung eines Medikaments wird somit nicht allein von der Gesamtkonzentration im Blutkreislauf bestimmt, vielmehr sind die ungebundene Konzentration im Plasma sowie die Halbwertszeit des Medikaments entscheidend (Kratochwil et al. 2002).

Die Bindung von Arzneimitteln an Plasmaproteine, vor allem an Serumalbumin und α_1 -Säureglykoprotein, ist ein Faktor, der die Arzneimittelverfügbarkeit für den Körper maßgeblich beeinflusst. So können Arzneimittel-Protein-Komplexe als Arzneimittelreservoir dienen, da das Pharmakon, solange es sich in der Bindung befindet, weder renal noch hepatisch eliminiert wird.

Mit steigender Plasmaproteinbindung des Pharmakons verlängert sich somit dessen Halbwertszeit, wodurch sich die Dauer der Arzneimittelwirkung verlängert (Freissmuth 2016).

1.4.2.1 Plasmaproteinbindung bei ^{177}Lu -PSMA-Liganden

Auch für die in der Nuklearmedizin verwendeten Radiopharmaka ist die Plasmaproteinbindung von Bedeutung. Insbesondere bei der Radioligandentherapie mit ^{177}Lu konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Plasmaproteinbindung verschiedener ^{177}Lu -markierter PSMA-Liganden zu einem vermehrten Tumor-Uptake über die Zeit führt (Deberle et al. 2020, Benešová et al. 2018, Choy et al. 2017). In einer weiteren Studie wurde eine hochaffine Albumin-bindende Gruppe verwendet, wodurch sich die Blutverweilzeit signifikant verlängerte und dies eine erhöhte Tumoraufnahme und -retention bewirkte (Kelly et al. 2018). In Tumormodellen steigert eine hohe Tumoraufnahme die therapeutische Wirksamkeit (Choy et al. 2017). Die Aufnahme in anderen Organen, vor allem Nieren und Milz, ist jedoch bei steigender Plasmaproteinbindung ebenfalls erhöht und die Gefahr der Nephro- oder Hämatotoxizität könnte somit dosislimitierend wirken (Wirtz et al. 2018).

1.4.2.2 Plasmaproteinbindung bei ^{68}Ga -PSMA-Liganden

Der Einfluss der Plasmaproteinbindung auf die Diagnostik mit ^{68}Ga -PSMA-Liganden ist nicht ansatzweise so gut beschrieben und erforscht. Festzustehen scheint, dass Kontrast und Bildqualität der PET-Untersuchung umso besser sind, je höher das Verhältnis von Tumor- zu Hintergrundaktivität ist. Eine niedrige Plasmaproteinbindung könnte daher vorteilhaft für die PET-Diagnostik sein. Insbesondere da gezeigt wurde, dass ^{68}Ga markierte Radioliganden mit höherer Albumin-Bindungsaffinität eine nachweislich höhere Blutpool-Aktivität zeigten als Liganden mit geringerer Albuminaffinität (Kelly et al. 2018). Die erhöhte Aktivität im Blut kann mit einer erhöhten Hintergrundaktivität insbesondere zu frühen Zeitpunkten einhergehen (Wirtz et al. 2018). Gerade zu Beginn sind stark plasmaproteinbindende PSMA-Inhibitoren den Verbindungen mit geringer Plasmaproteinbindung daher unterlegen. Das Tumor-zu-Hintergrund-Verhältnis nimmt zwar mit der Zeit zu und führt theoretisch langfristig zu günstigeren Bildeigenschaften, dies wird jedoch durch die sehr kurze Halbwertszeit von ^{68}Ga limitiert (Schmidt 2017).

1.5 Ziele der Arbeit

Die Abhängigkeit der Bioverfügbarkeit der Radiopharmaka ^{68}Ga -PSMA-11 und ^{177}Lu -PSMA-617 von der Konzentration des kalten Präkursors ist bisher nicht beschrieben. Es wird daher im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob und in welchem Umfang die Plasmaproteinbindung und damit die Verfügbarkeit des Radiopharmakons, das an Zielzellen binden kann, von der Präkursor-Konzentration abhängig ist.

Darüber hinaus soll der Effekt unterschiedlicher Konzentrationen von kaltem PSMA-11 und PSMA-617 auf die Prostatakarzinomzellen untersucht werden. Hierfür wird das an die Zellmembran gebundene sowie in die Zellen internalisierte Radiopharmakon als ein Maß für den Zell-Uptake bestimmt.

Die Zusammenschau der Ergebnisse aus Plasmaproteinbindung und Zell-Uptake kann ein erster Anhalt dafür sein, welche Konzentrationen des Präkursors für die nuklearmedizinische Diagnostik und Therapie des Prostatakarzinoms vorteilhaft sind.

Zusammengefasst ergeben sich für diese Arbeit folgende Fragestellungen:

1. Wie unterscheidet sich die Plasmaproteinbindung der Radiopharmaka ^{68}Ga -PSMA-11 und ^{177}Lu -PSMA-617 bei unterschiedlichen Präkursor-Konzentrationen?
2. In welchem Maße wird die Aufnahme des Radiopharmakons in die Prostatakarzinomzellen von der Konzentration des Präkursors beeinflusst?
3. Welche Präkursor-Konzentrationen sind für den Einsatz von ^{68}Ga -PSMA-11 und ^{177}Lu -PSMA-617 für die Diagnostik und Therapie des Prostatakarzinoms zu empfehlen?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 3 und Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 3: Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Bohrlochdetektor (Qualitätskontrolle erfolgt)	Multi-Logger LB 5310	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Bohrlochdetektor (Qualitätskontrolle erfolgt)	ISOMED 200	MED Nuklearmedizin-Technik Dresden GmbH, Dresden
Gefrierschrank	GSPN 2926 Premium NoFrost	LIEBHERR-Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen
Schüttler	Reax I	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Zellinkubator	HERAcell 150 CO2 Incubator	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Zentrifuge	Biofuge 17RS	Heraeus Holding GmbH, Hanau

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Typ	Hersteller
Petrischale	100 x 21 mm	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pipetten	0,5 – 10 µl 10 – 100 µl 500 µl 200 – 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen	0,1 – 20 µl 2 – 200 µl 100 – 1000 µl	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Reaktionsgefäße	SafeSeal 2ml Schraubröhre 15ml Schraubröhre 50ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Zellschaber	TC CELL SCRAPER 25CM 2PO/CS100	Sarstedt Inc., Newton, USA
Zentrifugen-Sammelröhrchen mit Filterereinheit	Amicon Ultra – 0.5mL Ultracel – 30K, regenerated cellulose 30,000 NMWL	Merck Millipore Ltd., Tullagreen, Irland

2.1.2 Chemikalien

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Fetales Kälberserum (FBS)	Gibco® by life Technologies, Darmstadt
Halt™ Protease und Phosphatase Inhibitor-Cocktails	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ham's F-12-Zellmedium	Gibco® by life Technologies, Darmstadt
Humanplasma	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Isotonische Natriumchlorid (0,9%)	Berlin-Chemie AG, Berlin
Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml)	Gibco® by life Technologies, Darmstadt
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Gibco® by life Technologies, Darmstadt
Pierce™ BCA™ Protein-Assay	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PSMA-11-precursor	ABX advanced biochemical compounds GmbH, Radeberg
PSMA-617-precursor	ABX advanced biochemical compounds GmbH, Radeberg
Roswell Park Memorial Institute-Zellmedium (RPMI 1640)	Gibco® by life Technologies, Darmstadt
Trypsin-EDTA	Gibco® by life Technologies, Darmstadt
Wasser für Injektionszwecke (Ampuwa)	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v. d. Höhe

2.1.3 Radiopharmaka

Die verwendeten Radiopharmaka wurden freundlicherweise von den Radiochemikern der Klinik für Nuklearmedizin, Molekulare Bilddiagnostik und Therapie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein zur Verfügung gestellt. Die Radiopharmaka wurden vor Versuchsbeginn jeweils mittels validierter analytischer Verfahren auf chemische und radiochemische Reinheit geprüft.

^{68}Ga -PSMA-11 (Halbwertszeit: 68 Minuten)

^{177}Lu -PSMA-617 (Halbwertszeit: 6,65 Tage)

Die Herstellung erfolgte dabei durch Kopplung der Radionuklide ^{68}Ga llium und ^{177}Lu tetium an die Small-molecule-Inhibitoren PSMA-11 und PSMA-617 (vgl. Tabelle 6). Beide Präkursoren werden von der Firma ABX advanced biochemical compounds GmbH hergestellt und wurden für die durchgeführten Versuche bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Tabelle 6: Vergleich der Small-molecule-Inhibitoren PSMA-11 und PSMA-617 (nach: Eder et al. 2014, Afshar-Oromieh et al. 2015, Mandiwana et al. 2021)

	PSMA-11	PSMA-617
Summenformel	$\text{C}_{44}\text{H}_{62}\text{N}_6\text{O}_{17}$	$\text{C}_{49}\text{H}_{71}\text{N}_9\text{O}_{16}$
Molekulare Masse	947 g/mol	1042,14 g/mol
Klinischer Gebrauch	Diagnostik	Diagnostik, Therapie
Kopplung an Radionuklid	^{68}Ga llium	^{68}Ga llium, ^{177}Lu tetium
Komplexbildner	HBED-CC	DOTA

2.1.4 Prostatakarzinom-Zelllinien und Zellmedien

Die Prostatakarzinom-Zelllinien LNCaP (ACC 256) und PC-3 (ACC 465) stammen vom Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH mit Sitz in Braunschweig. Die Kultivierung der Zellen wurde in den unten aufgeführten Zellmedien durchgeführt.

Zellmedium für LNCaP:	RPMI 1640 ergänzt mit 10 % hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (FBS) und 1 % Penicillin-Streptomycin
-----------------------	---

Zellmedium für PC-3:	44,5 % Ham's F-12 und 44,5 % RPMI 1640 ergänzt mit 10 % hitzeinaktiviertem FBS und 1 % Penicillin-Streptomycin
----------------------	--

2.1.5 Software

Die erhobenen Daten wurden in Microsoft Excel 2019 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) gespeichert und statistisch ausgewertet. Zudem wurde IBM SPSS Statistics 26 (IBM, Armonk, USA) zur Varianzanalyse und Kurvenanpassung verwendet. Die schriftliche Ausarbeitung erfolgte mit Microsoft Word 2019 (Microsoft Corporation, Redmond, USA).

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultivierung

LNCaP-Zellen wurden in einem Kulturmedium, bestehend aus RPMI 1640, 10 % hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum, Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml), kultiviert. Die Kultivierung von PC-3-Zellen erfolgte in einem Kulturmedium aus zu gleichen Anteilen Ham's F-12 und RPMI 1640 sowie 10 % hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum, Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml).

Nach Erreichen einer hohen Zelldichte wurden die Zellen zur Subkultivierung zweifach mit 4 ml PBS gewaschen und mit 2 ml 0,025 % Trypsin/EDTA für zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 4 ml vorgewärmtes Kulturmedium hinzugegeben und anhaftende Zellen vom Boden der Kulturschalen durch Abspülen gelöst. Die Lösung wurde gesammelt und fünf Minuten bei Raumtemperatur mit 1000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellpellets wieder suspendiert und 8 ml neues Medium zu den neu kultivierten Zellen hinzugefügt.

2.2.2. Untersuchungen mit ⁶⁸Ga-PSMA-11

2.2.2.1 Herstellung von ⁶⁸Ga-PSMA-11

An der Klinik für Nuklearmedizin des UKSH, Campus Kiel werden bei der Herstellung von 10 ml Radiopharmakon standardmäßig 10 µg PSMA-11 eingesetzt. Diese hergestellte Lösung hat eine Aktivität von circa 1 GBq (Becquerel), was zum Syntheszeitpunkt einer PSMA-11-Konzentration von 10 µg/GBq entspricht. Für diejenigen Untersuchungen, bei denen die standardmäßige PSMA-11-Konzentration unterschritten werden sollte, wurde bei der Synthese die eingesetzte Menge auf 1 µg/10 ml reduziert. Die Aktivität der so hergestellten Lösung sinkt dabei auf circa 660 MBq, was einer PSMA-Konzentration von 1,5 µg/GBq entspricht.

Zur Untersuchung der Forschungsfragen wurden die hergestellten Lösungen 1:100 verdünnt und in neue Schraubröhren überführt. Je nach gewünschter Endkonzentration wurde in diese Lösungen kaltes, nicht radioaktiv markiertes PSMA-11 hinein pipettiert und somit die Konzentration an PSMA-11 gesteigert. Zur Untersuchung der Plasmaproteinbindung und des Zell-Uptakes wurden die Lösungen mit folgenden PSMA-11-Konzentrationen hergestellt: 1,5 µg/GBq, 7,5 µg/GBq, 10 µg/GBq, 15 µg/GBq, 100 µg/GBq, 500 µg/GBq und 1 mg/GBq.

Bei der Konzentration von PSMA-11 im Verhältnis zur Aktivität bezieht sich die Aktivität immer auf die zum Zeitpunkt der Synthese gemessene Aktivität. Dies ist aufgrund der kurzen Halbwertszeit wichtig zu erwähnen, da sich das Verhältnis von Präkursoren zur Aktivität minütlich rasch verändert und nur so die Ergebnisse vergleichbar sind.

2.2.2.2 Bestimmung der Plasmaproteinbindung von ^{68}Ga -PSMA-11

Die Plasmaproteinbindung von ^{68}Ga -PSMA-11 mit verschiedenen PSMA-11-Konzentrationen wurde mittels eines Ultrafiltrationsverfahrens bestimmt. Der verwendete Filter ist durchlässig für molekulare Größen bis maximal 30 kDa, weshalb Plasmaproteine vom Filter zurückgehalten werden. Mit einer Größe von 1–2 kDa gelangen Small-molecule-Liganden, wie PSMA-11 und PSMA-617, wenn sie nicht an Plasmaproteine gebunden sind, ins Filtrat. So wird eine Trennung der ungebundenen und der plasmagebundenen Radioliganden ermöglicht.

Von den hergestellten ^{68}Ga -PSMA-11-Lösungen (vgl. 2.2.2.1.) wurden 20 μl zu 250 μl Humanplasma hinzugefügt und für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Humanplasma in die Filtereinheit überführt und für 20 Minuten bei 14000 xg und 20 °C zentrifugiert. Die Filtereinheit, die das Proteinkonzentrat enthält, wurde mit der Öffnung nach unten auf ein neues Sammelröhrchen gesteckt und dieses für zwei Minuten bei 1000 xg zentrifugiert, um das Konzentrat aus dem Filter in das Röhrchen zu transferieren. Das Filtrat, das durch den Filter in das Sammelröhrchen gelangt ist, und das Konzentrat wurden im Bohrlochdetektor gemessen und die Counts per minute (CPM) bestimmt. Der gemessene Wert des Konzentrats muss zu dem Zeitpunkt der Messung des Filtrats zurück gerechnet werden, um keine verfälschten Werte aufgrund der kurzen Halbwertszeit von ^{68}Ga zu erhalten. Die Berechnung erfolgt anhand folgender Aktivität-Zeit-Formel:

$$N(t) = N_0 \times 0.5^{\frac{t}{T_{1/2}}}$$

Für die Berechnung des CPM-Wertes des Konzentrats zum Zeitpunkt der Messung des Filtrats ergibt sich daraus:

$$\text{CPM Konzentrat}_0 = \text{CPM Konzentrat}(t) \div 0.5^{\frac{t}{T_{1/2}}}$$

Hierbei ist t die Zeit in Minuten, die seit der Messung des Filtrats vergangen ist. $T_{1/2}$ steht für die Halbwertszeit des Radionuklids ^{68}Ga mit 68 Minuten.

Die Menge der Radioliganden im Humanplasma lässt sich aus den Anteilen der im Filtrat und Konzentrat gemessenen Radioaktivität berechnen.

$$CPM \text{ Filtrat} + CPM \text{ Konzentrat} = CPM \text{ Plasma}$$

Die Radioaktivität des Plasmas wird auf 100 % festgesetzt. Die Plasmaproteinbindung des Radiopharmakons berechnet sich wie folgt:

$$CPM \text{ Konzentrat} \div CPM \text{ Plasma} = \text{Plasmaproteinbindung}$$

2.2.2.3 Bestimmung des Zell-Uptakes von ⁶⁸Ga-PSMA-11

Die Bindung von ⁶⁸Ga-PSMA-11 durch PSMA-positive Prostatakarzinomzellen wurde an den kultivierten LNCaP-Zellen durchgeführt. Den Zellen wurden 4 ml des Zellmediums abgesogen und dann von den hergestellten ⁶⁸Ga-PSMA-11-Lösungen (vgl. 2.2.2.1.) 160 µl zugegeben und der Ansatz bei Raumtemperatur für zehn Minuten inkubiert. Als Kontrollmessung wurden ebenfalls 160 µl der gleichen Lösung in ein Reaktionsgefäß zu 1 ml Natriumchlorid-Lösung (NaCl) gegeben. Nach der Inkubation wurde das Zellmedium verworfen und die Zellen jeweils zweimal mit 2 ml NaCl gewaschen. Das NaCl wird jeweils verworfen. Den Zellen wurde erneut 1 ml NaCl hinzugegeben und diese zur Zellernte mit einem Zellschaber sanft vom Boden der Petrischale abgeschabt. Die geschabten Zellen wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (fünf Minuten, 4000 xg, 4 °C). Die Zellen setzen sich am Boden des Gefäßes ab, der Überstand wird verworfen. Von den Zellen sowie dem Kontrollreaktionsgefäß werden anschließend die CPM im Bohrlochdetektor gemessen. Danach werden die Zellen eingefroren und, wenn die Strahlung nachgelassen hat, die Zellproteinmenge bestimmt (vgl. 2.2.4). Die Messung der Zellproteinmenge ist notwendig, da sich die Menge der Zellen in den Petrischalen im Rahmen der Subkultivierung unterscheiden können.

Die gemessenen Werte werden ins Verhältnis gesetzt, um zu berechnen, wie viel der Anfangsaktivität von den Zellen aufgenommen wurde. Es gilt:

$$CPM \text{ Zellen} \div CPM \text{ Kontrolleppendorf} = \text{Zellproteinbindung}$$

Aus der gemessenen Zellproteinmenge und der berechneten Zellproteinbindung kann daraufhin der Uptake pro Milligramm Zellprotein ermittelt werden.

Als Kontrollexperiment beziehungsweise Negativkontrolle wurden PSMA-negative PC-3-Zellen mit derselben Dosis ^{68}Ga -PSMA-11 inkubiert und anschließend der Zell-Uptake mittels des oben beschriebenen Verfahrens bestimmt.

2.2.3 Untersuchungen mit ^{177}Lu -PSMA-617

2.2.3.1 Herstellung von ^{177}Lu -PSMA-617

Bei der Synthese von ^{177}Lu -PSMA-617 durch die Radiochemiker des UKSH in Kiel werden 10 μg PSMA-617 zu 1 GBq der Radionuklide hinzugegeben. Die Aktivitätsmenge pro ml beträgt circa 1 GBq. Für einen Teil der Untersuchungen wurde die eingesetzte Menge PSMA-617 auf 5 $\mu\text{g}/\text{GBq}$ reduziert.

Zur Untersuchung der Plasmaproteinbindung und des Zell-Uptakes wurden die hergestellten Lösungen 1:20 mit Kochsalzlösung verdünnt und in neue Röhren überführt. Je nach gewünschter Endkonzentration wurde kaltes PSMA-617 hinzugegeben. Für die Untersuchungen wurden die Lösungen mit PSMA-617-Konzentrationen von 5 $\mu\text{g}/\text{GBq}$, 10 $\mu\text{g}/\text{GBq}$, 20 $\mu\text{g}/\text{GBq}$ und 50 $\mu\text{g}/\text{GBq}$ hergestellt.

2.2.3.2 Bestimmung der Plasmaproteinbindung von ^{177}Lu -PSMA-617

Die Plasmaproteinbindung von ^{177}Lu -PSMA-617 mit verschiedenen PSMA-617-Konzentrationen wurde analog zu dem bereits beschriebenen Ultrafiltrationsverfahren bestimmt (vgl. 2.2.2.2). Zu je 250 μl Humanplasma wurden von den verdünnten ^{177}Lu -PSMA-617-Lösungen 10 μl hinzugefügt und für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Zentrifugation der Filtereinheit. Zentrifugiertes Filtrat und Konzentrat wurden im Bohrlochdetektor gemessen und anschließend die Plasmaproteinbindung berechnet. Eine Rückrechnung ist aufgrund der langen Halbwertszeit von über sechs Tagen nicht notwendig.

2.2.3.3 Bestimmung des Zell-Uptakes von ^{177}Lu -PSMA-617

Der ^{177}Lu -PSMA-617-Uptake der LNCaP-Zellen wurde mit dem gleichen Verfahren wie der ^{68}Ga -PSMA-11-Uptake untersucht (vgl. 2.2.2.3.). Die Zellen wurden mit 20 μl der hergestellten ^{177}Lu -PSMA-617-Lösungen (vgl. 2.2.3.1.) versetzt und bei Raumtemperatur für zehn Minuten inkubiert. Nach dem Waschen und Ernten der Zellkulturen sowie der darauffolgenden

Zentrifugation wurden die Zellen im Bohrlochdetektor gemessen und anschließend eingefroren. Nach Bestimmung der Zellproteinmenge konnte der Zell-Uptake berechnet werden.

2.2.4 Zellproteinquantifizierung

Die kultivierten, mit Radiopharmaka versetzten Zellen wurden in 1 ml DLB-Puffer, dem zum Schutz der Proteine 1 % des Halt Protease- und Phosphatase-Inhibitor-Cocktails hinzugegeben wurde, lysiert. Nach kurzer Inkubation (fünf Minuten bei 95° C) wurden die Lysate zentrifugiert (15000 xg bei 4 °C für 15 Minuten), um unlösliche Substanzen zu entfernen. Anschließend wurde die Proteinkonzentration im Überstand mit einem Pierce™ BCA™ Protein-Assay gemessen.

Die im Humanplasma befindliche Proteinmenge wurde testweise ebenfalls mittels Pierce™ BCA™ Protein-Assay bestimmt und auf Plausibilität überprüft.

2.2.5 Statistische Auswertung

Aus den untersuchten Werten der Plasmaproteinbindung und des Zell-Uptakes wurde jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung gebildet. Die Mittelwerte wurden miteinander verglichen und die Signifikanz mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) mit einem Tukey multiplen Vergleichs-Test analysiert. Ein p-Wert von < 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet. Bei p < 0,01 wurden die Daten als sehr signifikant, bei p < 0,001 als hoch signifikant angesehen. Zur Kurvenanpassung wurden verschiedene Modelle mittels SPSS untereinander geprüft und das beste Modell anhand des höchsten korrigierten R-Quadrat ausgewählt. Die Erstellung der Diagramme wurde mit Microsoft Excel 2019 durchgeführt. Das Bestimmtheitsmaß der Trendlinie (R^2) wurde ebenfalls durch Excel bestimmt.

3. Ergebnisse

3.1 Synthese der Radiopharmaka

Bei der Synthese von ^{68}Ga -PSMA-11 wurden zu Herstellung von 10 ml Radiopharmakon entweder 1 μg oder 10 μg PSMA-11 eingesetzt. Tabelle 7 zeigt eine Übersicht der mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) bestimmten radiochemischen Reinheit und der Aktivitätsmenge des Radiopharmakons. Bei sinkender Präkursor-Menge konnte die radiochemische Reinheit hochgehalten werden, die Aktivitätsmenge nahm hingegen deutlich ab.

Tabelle 7: Radiochemische Reinheit und Aktivitätsmenge von 10 ml ^{68}Ga -PSMA-11 nach der Synthese mit 1 μg und 10 μg PSMA-11

PSMA-11 pro 10 ml Radiopharmakon	Radiochemische Reinheit	Aktivitätsmenge
10 μg	> 95 %	1 GBq
1 μg	> 95 %	660 MBq

Bei der Synthese von ^{177}Lu -PSMA-617 wurden 5 μg oder 10 μg PSMA-617 pro GBq ^{177}Lu tetium zu den Radionukliden gegeben. Es zeigte sich, dass es bei der Synthese mit 5 μg PSMA-617 deutlich schwieriger war, eine hohe radiochemische Reinheit zu erzielen (vgl. Tabelle 8). So gelang es erst im dritten Versuch, eine akzeptable Reinheit von mindestens 70 % zu erreichen, mit welcher dann die Experimente mit der niedrigen Präkursor-Konzentration durchgeführt werden konnten.

Tabelle 8: Radiochemische Reinheit von ^{177}Lu -PSMA-11 nach der Synthese mit 5 μg und 10 μg PSMA-617 pro GBq

PSMA-617 pro GBq Radionuklid	Radiochemische Reinheit
10 μg	> 95 %
5 μg	70-90 %

3.2 Plasmaproteinbindung und Zell-Uptake von ^{68}Ga -PSMA-11

3.2.1 Plasmaproteinbindung von ^{68}Ga -PSMA-11

Die mittels Ultrafiltration bestimmte Bindung von ^{68}Ga -PSMA-11 an Plasmaproteine wird in Abbildung 2 dargestellt. Die Bindung des Radiopharmakons lag bei der Standardkonzentration von 10 μg PSMA-11/GBq bei 42,2 %. Eine ähnliche Bindung zeigten auch die Konzentrationen 7,5 μg /GBq, 15 μg /GBq und 100 μg /GBq mit Prozentwerten zwischen 42,0 und 42,6. Die Proteinbindung bei 1,5 μg /GBq lag mit 42,9 % zwar etwas, jedoch nicht signifikant höher als bei der Standardkonzentration ($p > 0,5$). Bei höheren PSMA-11-Konzentrationen (500 μg /GBq und 1 mg/GBq) zeigte sich eine geringe Abnahme der Plasmaproteinbindung, welche jedoch im Vergleich zu den niedrigeren Konzentrationen ebenfalls nicht signifikant ist ($p > 0,5$).

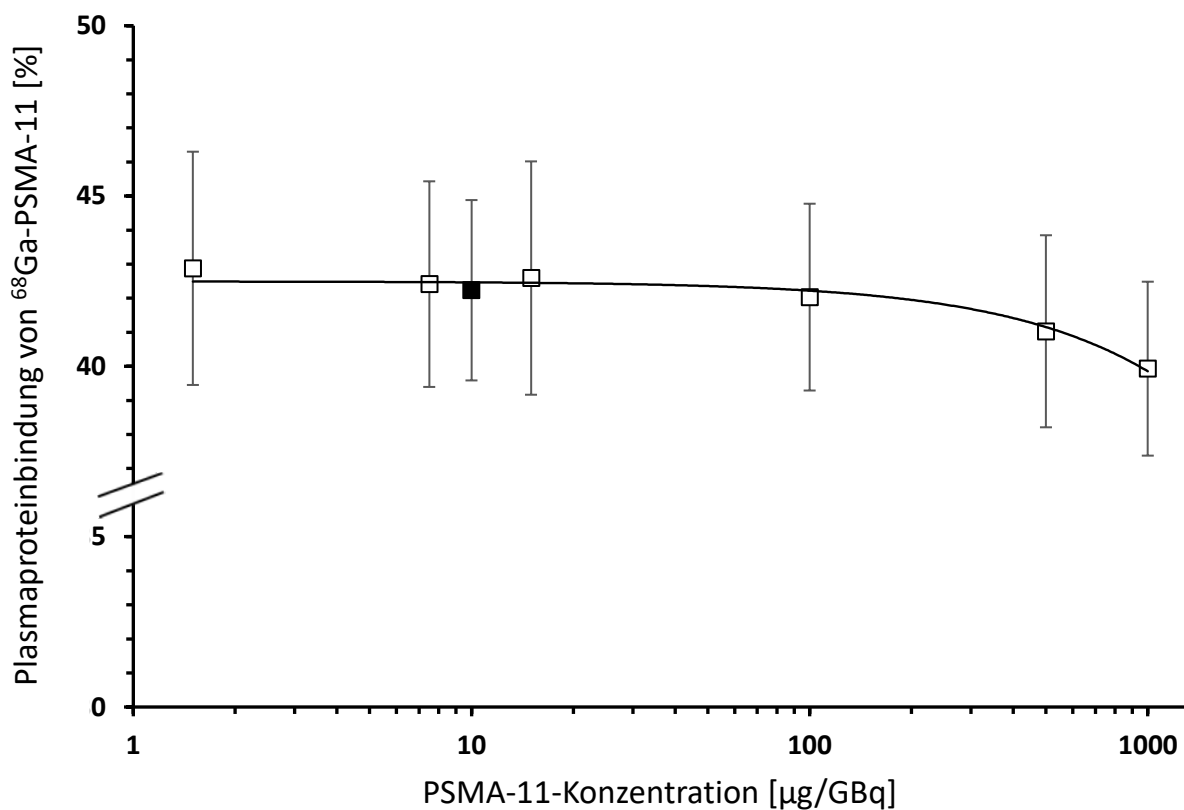


Abbildung 2 Plasmaproteinbindung des Tracers ^{68}Ga -PSMA-11 bei PSMA-11-Konzentrationen zwischen 1,5 $\mu\text{g}/\text{GBq}$ und 1 mg/GBq. Mit steigender Konzentration des Präkursors zeigte sich eine leichte Abnahme der Plasmaproteinbindung. Die Wachstumskurve zeigt einen exponentiellen Verlauf mit einem korrigierten $R^2=0,87$. Logarithmische Darstellung, Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung, $n=14$.

3.2.2 Uptake von ^{68}Ga -PSMA-11 durch LNCaP- und PC-3-Zellen

Die untersuchte Zellproteinbindung des Radiopharmakons mit einer PSMA-11-Konzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{GBq}$ war bei PC-3-Zellen mit $<0,1$ $\%/ \text{mg}$ Zellprotein kaum nachweisbar, wohingegen die Bindung an LNCaP-Zellen bei 3,4 $\%/ \text{mg}$ Zellprotein lag (Abbildung 3).

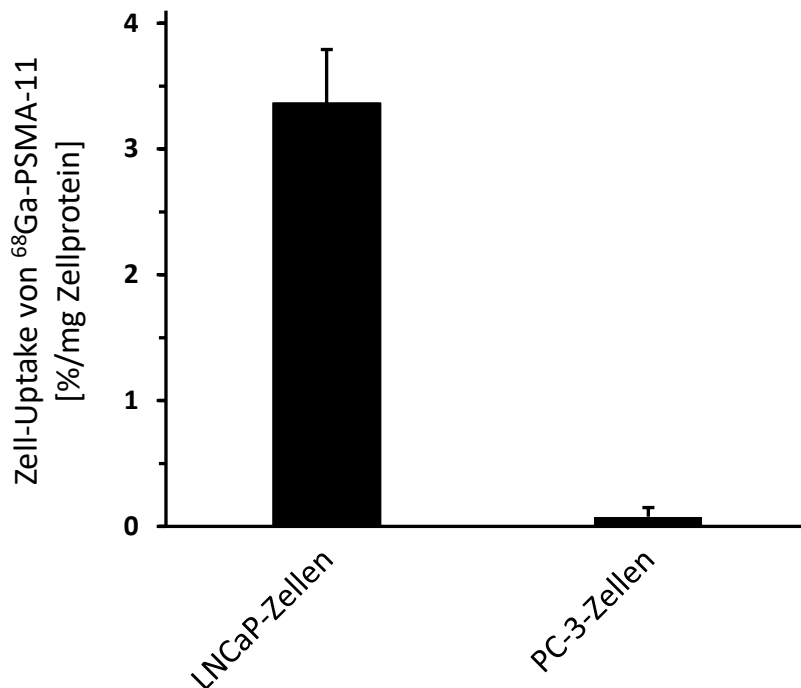


Abbildung 3 Uptake von ^{68}Ga -PSMA-11 pro mg Zellprotein in LNCaP- (n=9) und PC-3-Zellen (n=7).

Abbildung 4 zeigt den LNCaP-Zell-Uptake des Tracers ^{68}Ga -PSMA-11 für unterschiedliche PSMA-11 Konzentrationen. Mit steigender Konzentration an PSMA-11 kommt es zu einer deutlichen, exponentiellen Abnahme des LNCaP-Zell-Uptakes. Eine vergleichbare Bindung an LNCaP-Zellen wie bei der Standardkonzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{GBq}$ zeigte sich bei Konzentrationen zwischen 1,5 und 15 $\mu\text{g}/\text{GBq}$ (3,33 – 3,48 %). Der Zell-Uptake bei den PSMA-11-Konzentrationen 100 $\mu\text{g}/\text{GBq}$ und 500 $\mu\text{g}/\text{GBq}$ war signifikant bzw. hochsignifikant niedriger als bei der Standardkonzentration ($p = 0,0305$ bzw. $p = 8,4074\text{E-}11$). Bei einer Konzentration des Präkursors von 1 mg/GBq lag der Zell-Uptake nur noch bei 1,4 % und damit hochsignifikant niedriger als bei allen anderen untersuchten Konzentrationen ($p = 5,8886\text{E-}13$).

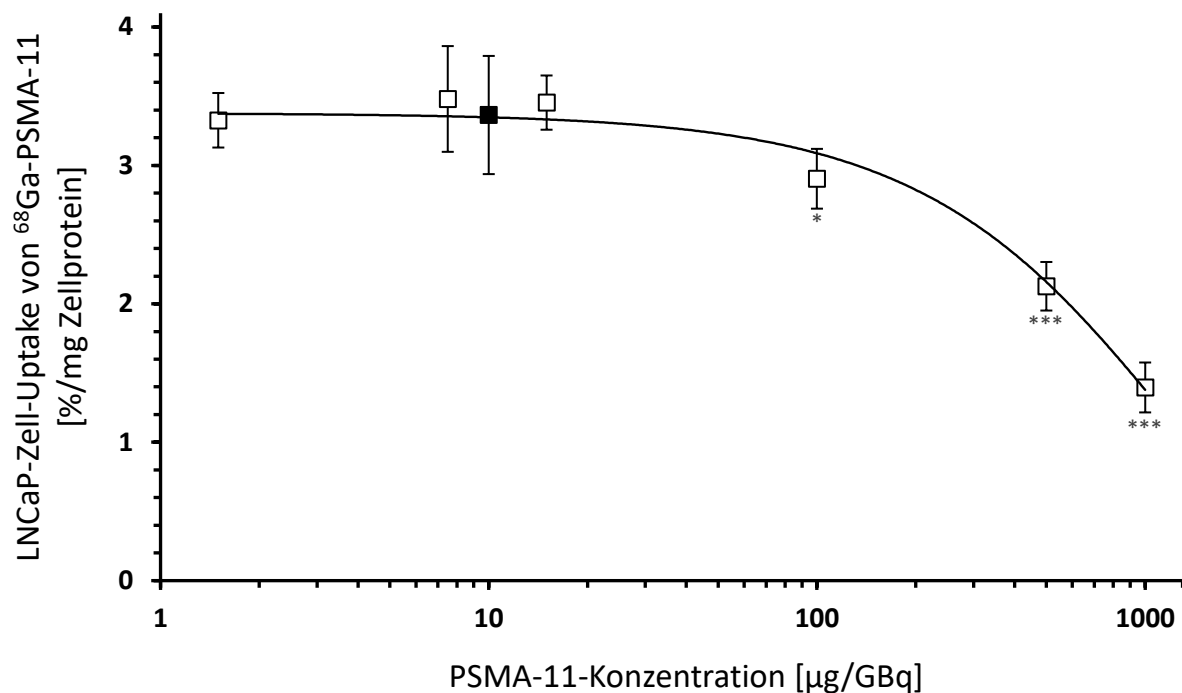


Abbildung 4 LNCaP-Zell-Uptake des Tracers ⁶⁸Ga-PSMA-11 bei PSMA-11-Konzentrationen zwischen 1,5 µg/GBq und 1 mg/GBq. Der Zell-Uptake nimmt mit steigenden Konzentrationen des kalten Präkursors deutlich ab. Die Kurvenanpassung ergibt eine exponentielle Kurve mit einem korrigierten R²=0,907. Logarithmische Darstellung, Mittelwerte ± Standardabweichung.

3.2.3 Vergleich der Plasmaproteinbindung und des Zell-Uptakes von ⁶⁸Ga-PSMA-11

Setzt man die jeweiligen Mittelwerte der unterschiedlichen PSMA-11-Konzentrationen von Plasmaproteinbindung und Zell-Uptake ins Verhältnis zu den Ergebnissen der Standardkonzentration von 10 µg/GBq, zeigt sich, dass der Zell-Uptake mit steigenden Konzentrationen deutlich stärker abnimmt als die Plasmaproteinbindung (Abbildung 5). Bei einer PSMA-11-Konzentration von 1 mg/GBq beträgt der Zell-Uptake noch 41,5 % des Uptakes, der bei der Standardkonzentration erreicht wird. Bei der Plasmaproteinbindung sinkt der Wert jedoch auf nur 94,5 % der ursprünglichen Bindung.

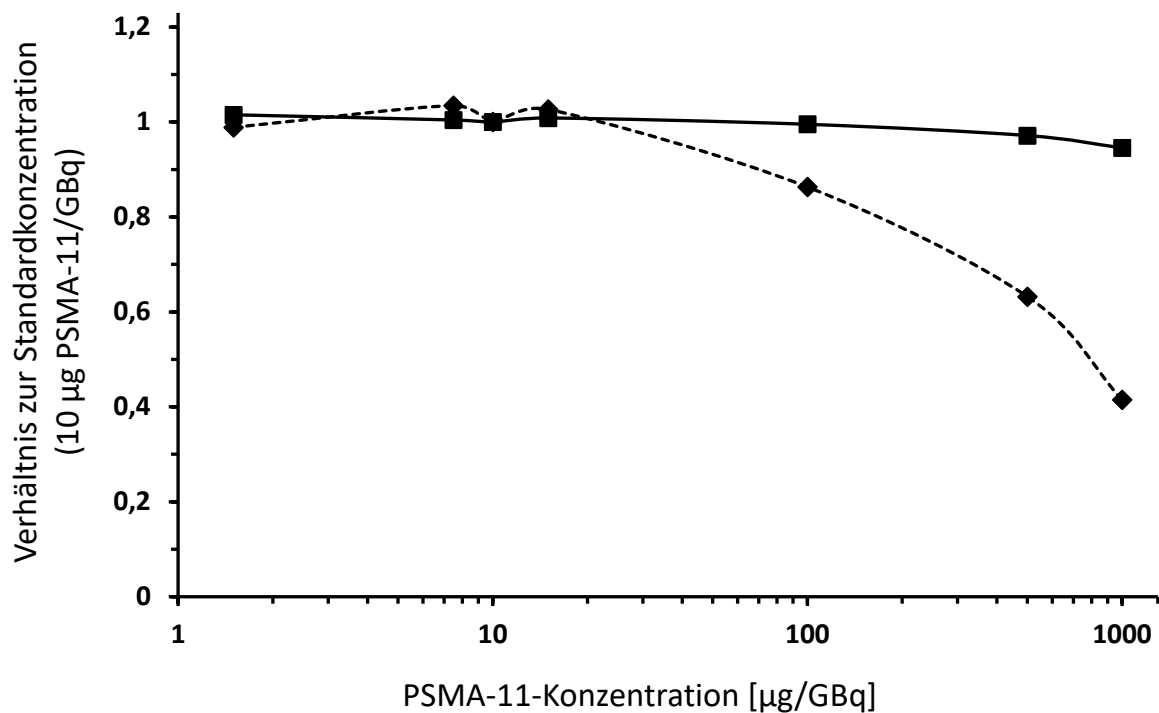


Abbildung 5 Mittelwerte der Plasmaproteinbindung (—■—) und des LNCaP-Zell-Uptakes (---◆---) von ^{68}Ga -PSMA-11 im Verhältnis zum jeweiligen Mittelwert der Standardkonzentration (10 μg PSMA-11/GBq). Bei steigenden PSMA-11-Konzentrationen nimmt der Zell-Uptake deutlich stärker als die Plasmaproteinbindung ab. Logarithmische Darstellung.

Ein Indikator zur Beurteilung der verschiedenen Präkursor-Konzentrationen für die PET-Untersuchung kann das Tumor-Hintergrund-Verhältnis sein. Die Ergebnisse des LNCaP-Zell-Uptakes können als Tumor und die der Plasmaproteinbindung als Hintergrund verwendet werden. Der Zell-Uptake beschreibt die Aufnahme des Radiopharmakons in die Tumorzelle, wohingegen das an Plasmaproteine gebundene Radiopharmakon im Blut verweilt und daher im Hintergrund aktiv ist. Abbildung 6 zeigt das Verhältnis von Zell-Uptake zu Plasmaproteinbindung für die verschiedenen PSMA-11-Konzentrationen.

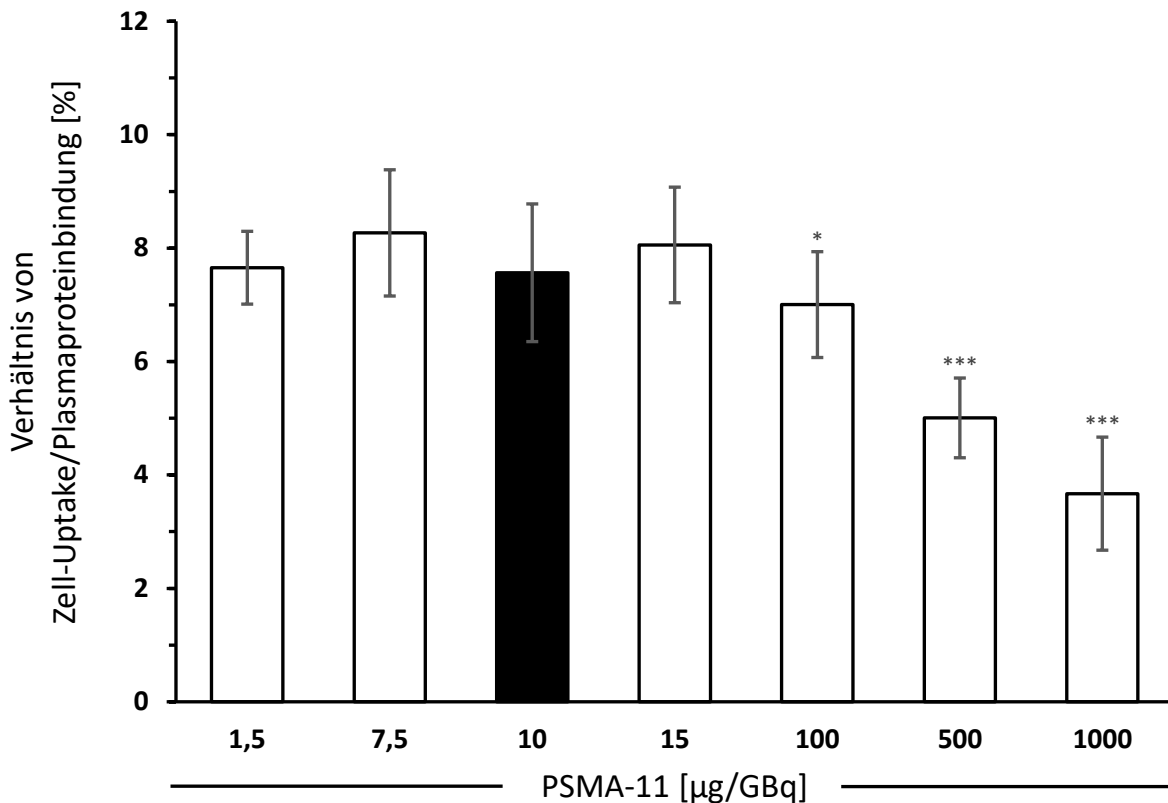


Abbildung 6 Verhältnis von Zell-Uptake zu Plasmaproteinbindung des Tracers ^{68}Ga -PSMA-11 für verschiedene Präkursor-Konzentrationen. Das Verhältnis nimmt mit steigender PSMA-11-Konzentration deutlich ab. Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung.

Zwischen 7,5 und 15 μg PSMA-11/GBq lagen die höchsten Werte des Verhältnisses zwischen Zell-Uptake und Plasmaproteinbindung. Bei der geringeren PSMA-11-Konzentration von 1,5 μg /GBq nahm das Verhältnis leicht, bei den höheren Konzentrationen signifikant ab. Bei 1 mg PSMA-11/GBq lag das Verhältnis um mehr als die Hälfte unter dem der Standardkonzentration.

3.3 Plasmaproteinbindung und Zell-Uptake von ^{177}Lu -PSMA-617

3.3.1 Plasmaproteinbindung von ^{177}Lu -PSMA-617

Die Plasmaproteinbindung von ^{177}Lu -PSMA-617 wurde bei Präkursor-Konzentrationen zwischen 5 μg /GBq und 50 μg /GBq untersucht. Die Ergebnisse werden in Abbildung 7 dargestellt. Die ermittelte Plasmaproteinbindung lag bei allen untersuchten PSMA-617-Konzentrationen im gleichen Bereich und zeigte keine Tendenz. Mit Mittelwerten zwischen 78,2 % und 79,0 % gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen ($p > 0,05$).

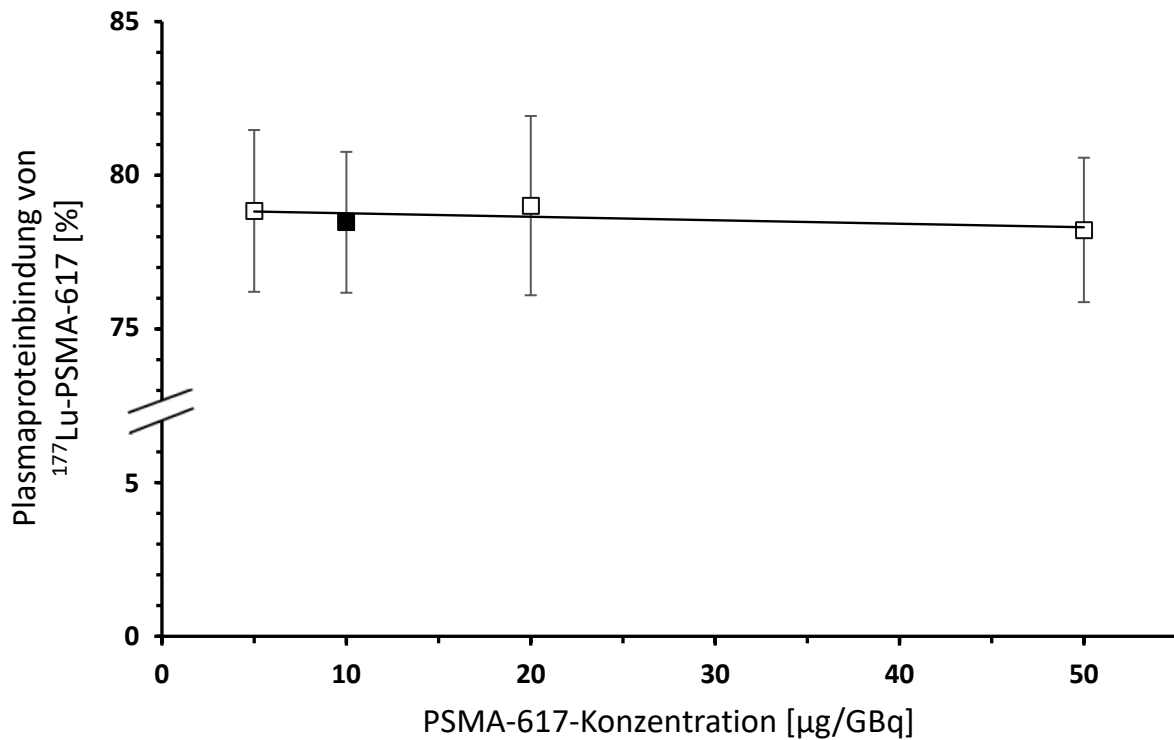


Abbildung 7 Plasmaproteinbindung des Tracers ¹⁷⁷Lu-PSMA-617 bei Präkursor-Konzentrationen zwischen 5 µg/GBq und 50 µg/GBq. Bei den verschiedenen PSMA-617-Konzentrationen liegt die Plasmaproteinbindung im gleichen Bereich. Mittelwerte ± Standardabweichung, n=10.

3.3.2 LNCaP-Zell-Uptake von ¹⁷⁷Lu-PSMA-617

Der Zell-Uptake von ¹⁷⁷Lu-PSMA-617 wurde an LNCaP-Zellen untersucht, da bereits gezeigt werden konnte, dass nur diese im Gegensatz zu den PC-3-Zellen PSMA-positiv sind und somit PSMA-Liganden binden (vgl. 3.2.2). Eine Erhöhung der PSMA-617-Konzentration führt zu einer Verminderung des Zell-Uptakes des Radiopharmakons (Abbildung 8). Die Zellproteinbindung bei einer Konzentration von 5 µg PSMA-617/GBq liegt bei 3,47 % und sinkt mit zunehmender Präkursor-Konzentration. Bei PSMA-617-Konzentrationen von 10 µg/GBq und 20 µg/GBq ist der Uptake mit 3,23 % beziehungsweise 3,28 % etwas, jedoch nicht signifikant reduziert. Bei 50 µg PSMA-617/GBq zeigte sich nur im Vergleich zur niedrigsten PSMA-617-Konzentration (5 µg/GBq) eine signifikante Reduktion des Uptakes (2,74 % vs. 3,47 %; p = 0,0474).

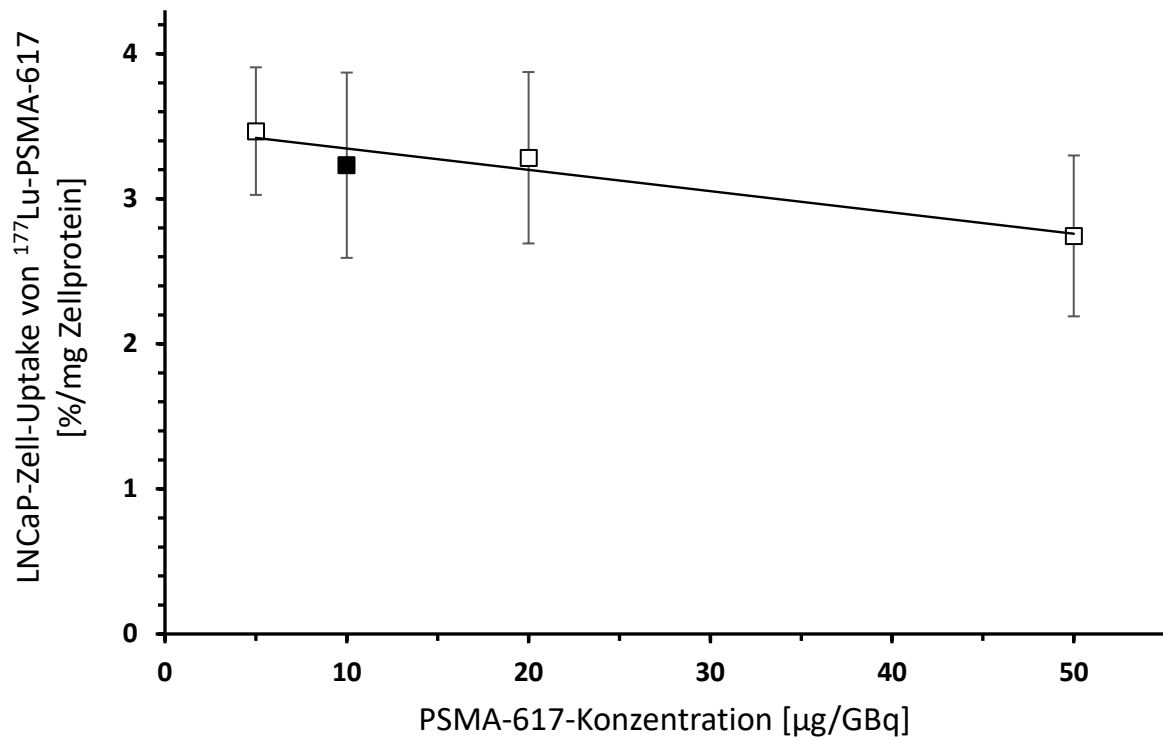


Abbildung 8 LNCaP-Zell-Uptake des Radiopharmakons ^{177}Lu -PSMA-617 bei Präkursor-Konzentrationen zwischen 5 $\mu\text{g}/\text{GBq}$ und 50 $\mu\text{g}/\text{GBq}$. Mit steigender PSMA-617-Konzentration nimmt der Zell-Uptake ab. Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung, $n=9$.

4. Diskussion

4.1 Diagramme und Kurvenverläufe

Aufgrund der Untersuchungen mit verschiedenen Präkursor-Konzentrationen der Tracer hat sich gezeigt, dass die Reduzierung der Präkursor-Menge mit Komplikationen verbunden ist. So gestaltete sich die Synthese der Radiopharmaka umso schwieriger, desto weniger Präkursoren eingesetzt wurden. Als Hauptproblem der ^{177}Lu -PSMA-617-Synthese stellte sich das Erreichen einer hohen radiochemischen Reinheit heraus, welches bei der Reduzierung von 10 µg auf 5 µg PSMA-617/GBq bereits deutlich erschwert war. Ein noch weiteres Absenken der Präkursor-Menge war aufgrund einer zu geringen radiochemischen Reinheit des Radiopharmakons nicht möglich. Bei der Synthese von ^{68}Ga -PSMA-11 nahm die Aktivitätsmenge mit sinkender PSMA-11-Konzentration deutlich ab.

Es wurde angenommen, dass die Plasmaproteinbindung von ^{68}Ga -PSMA-11 mit steigender Präkursor-Konzentration abnimmt. Dies ist der Überlegung geschuldet, dass die Bindungsstellen der Plasmaproteine begrenzt sind und mit Zugabe des kalten Präkursors der Anteil an heißem, mit ^{68}Ga markiertem PSMA-11 sinkt. Bei einem geringeren Anteil an „heißem“ PSMA-11 im Radiotracer-Präkursor-Gemisch könnten dementsprechend weniger heiße Tracer an die Plasmaproteine gebunden werden. Dies würde dazu führen, dass sich die filtergebundene Aktivität und somit die Plasmaproteinbindung des Radiotracers verringert. Dies zeigt sich zwar im Kurvenverlauf (vgl. Abbildung 2), jedoch ist die Abnahme einerseits erst bei sehr hohen Präkursor-Konzentrationen eingetreten und zudem nicht signifikant und andererseits in deutlich geringerer Ausprägung als erwartet. Dies könnte unter anderem darin begründet sein, dass die Experimente zur Bestimmung der Plasmaproteinbindung aufwendig sind und das Ultrafiltrationsverfahren störanfällig ist. Hier ist die große Standardabweichung der Werte zu erwähnen. Die Untersuchungen mit ^{68}Ga gestalteten sich aufgrund der sehr kurzen Halbwertszeit des Radionuklids generell schwierig und bereits geringe zeitliche Differenzen können zu sichtbaren Fehlern der Ergebnisse führen. Auch dass es in der Literatur keine Angaben zur Plasmaproteinbindung von ^{68}Ga -PSMA-11 in humanem Plasma gibt, erschwerte die Durchführung der Versuche sowie die Vergleichbarkeit der Studien. Es liegen Werte der Serumproteinbindung von ^{68}Ga -PSMA-11 vor, jedoch wurden diese an Maus und Ratte erhoben und zeigen mit 16,13 bzw. 16,96 % eine deutliche niedrigere Proteinbindung im Vergleich zu den in dieser Arbeit erhobenen Ergebnissen (Fuscaldi et al. 2021). Einzig vergleichbare Daten liegen für ^{68}Ga -PSMA-

I&T vor, welches an humanem Serumalbumin eine Proteinbindung von 52,0 % zeigt und damit eine etwas höhere Bindung als ^{68}Ga -PSMA-11 (Schmidt 2017). PSMA-I&T zählt ebenso wie PSMA-11 zu dem small-molecule-PSMA-Liganden.

Dass PC-3-Zellen im Gegensatz zu LNCaP-Zellen keine PSMA-Liganden binden (Abbildung 3), war aufgrund anderer Forschungsarbeiten absehbar und konnte mit den durchgeführten Untersuchungen bestätigt werden.

Analog zur Plasmaproteinbindung wurde bei den LNCaP-Zellen ein geringerer Uptake bei steigender PSMA-11-Konzentration erwartet. Es besteht ein Überangebot an PSMA-Inhibitoren, die an die Prostatakarzinomzelle andocken und internalisiert werden können. Mit Zunahme der Präkursor-Konzentration steigt der Anteil an kaltem, nicht radioaktiv markiertem PSMA-11. Folglich nimmt der Anteil an heißen, mit ^{68}Ga markierten Präkursoren, die an das PSMA-Transmembranprotein binden, ab. Dies konnte eindrucksvoll nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 4). Mit Anstieg der Präkursor-Konzentration sank der Uptake signifikant. Anhand der SPSS-Kurvenanpassung zeigte der exponentielle Kurvenverlauf das höchste korrigierte R^2 mit 0,907. Das lineare Modell lag mit einem Wert von 0,836 bereits deutlich dahinter. Es gibt in der Literatur keine vergleichbaren Daten zum LNCaP-Zell-Uptake von ^{68}Ga -PSMA-11, da sowohl mit anderer Methodik als auch ohne verschiedene Präkursor-Konzentrationen gearbeitet wurde.

Die Mittelwerte von Plasmaproteinbindung und LNCaP-Zell-Uptake sowie das Verhältnis von zellulärem Uptake zu Plasmaproteinbindung (Abbildung 5 und 6) verdeutlichen, dass der Zell-Uptake bei steigender PSMA-11-Konzentration deutlich stärker abnimmt als die Bindung an Plasmaproteine.

Insgesamt zeigten sich die Untersuchungen der Plasmaproteinbindung deutlich störanfälliger als die des Zell-Uptakes. Es lässt sich festhalten, dass in Anbetracht der kurzen Halbwertszeit von ^{68}Ga ein gewissenhaftes Arbeiten mit präziser Dokumentation von Synthese- und Untersuchungszeitpunkten erforderlich ist.

Auch für ^{177}Lu -PSMA-617 wurde bei steigender Präkursor-Konzentration mit einem Absinken der Plasmaproteinbindung gerechnet. Die Ergebnisse waren aufgrund der bereits durchgeführten Versuche mit ^{68}Ga -PSMA-11 letztlich jedoch erwartbar. Die Mittelwerte lagen bei verschiedenen PSMA-617-Konzentrationen im gleichen Bereich ohne sichtbare Tendenz (vgl. Abbildung 7). Die Werte haben erneut eine relativ große Standardabweichung. Mit einer Plasmaproteinbindung zwischen 78,2 % und 79,0 % sind die erhobenen Ergebnisse mit denen von Kuo et al. vergleichbar,

die mittels Ultrafiltration von Humanserum eine filtergebundene Aktivität des Tracers von 82,7 % bestimmt haben (Kuo et al. 2018). Bei Deberle et al. lag die durch Ultrafiltration bestimmte Bindung von ^{177}Lu -PSMA-617 an humanen Plasmaproteinen hingegen bei nur 59 % (Deberle et al. 2020). Als Bindung an Humanalbumin gibt Schmidt in seiner Arbeit 74,7 % für ^{177}Lu -PSMA-617 bzw. 78,6 % für ^{177}Lu -PSMA-I&T an (Schmidt 2017).

Unter Betrachtung der eigenen Ergebnisse sowie der Literatur scheint das Ultrafiltrationsverfahren ein Schwachpunkt bei der Bestimmung der Plasmaproteinbindung von ^{68}Ga -PSMA-11 und ^{177}Lu -PSMA-617 zu sein. Es eignet sich gut, um einen Überblick über die Plasmaproteinbindung verschiedener Radiopharmaka zu erhalten, zum Beispiel zur Einordnung ob ein Tracer eine eher hohe oder niedrige Proteinbindung aufweist oder ob sich diese durch Anhängen albuminbindender Derivate erhöhen lässt. Für eine genaue Bestimmung ist das Verfahren jedoch nicht optimal geeignet, da exakte Angaben der Plasmaproteinbindung nur unzureichend möglich erscheinen.

Der Prostatakarzinomzell-Uptake von ^{177}Lu -PSMA-617 sank mit steigender Konzentration (vgl. Abbildung 8), die Abnahme scheint jedoch weniger ausgeprägt als bei den Untersuchungen mit ^{68}Ga -PSMA-11. Dies ist darin begründet, dass im Vergleich nur ein kleinerer Bereich der Präkursor-Konzentration untersucht wurde. Die Trendlinie zeigt eine lineare Abnahme, wobei auch ein exponentieller Verlauf denkbar ist ($R^2=0,921$ vs. $R^2=0,917$). Es gibt verschiedene Daten in der Literatur, die eine gute Aufnahme von ^{177}Lu -PSMA-617 in die Prostatakarzinomzelle belegen, jedoch sind die Ergebnisse aufgrund anderer Methodik, beispielsweise der Verwendung von PC-3-PIP-Tumorzellen, einer PSMA-positiven Sublinie der PC-3-Zellen, anstelle von LNCaP-Zellen, untereinander nicht vergleichbar (Umbricht et al. 2018, Deberle et al. 2020).

4.2 Bedeutung der Plasmaproteinbindung für den Einsatz von PSMA-Liganden

Die Bedeutung der Plasmaproteinbindung ist insbesondere für den Einsatz der Radioligandentherapie beim metastasierten Prostatakarzinom untersucht. Hier zeigen verschiedene Studien, dass sich durch Steigerung der Plasmaproteinbindung des Radiopharmakons auch die Aufnahme in den Tumor und damit die therapeutische Wirksamkeit erhöhen lässt (Deberle et al. 2020, Benešová et al. 2018, Choy et al. 2017). Verbindungen mit erhöhter Plasmaprotein- beziehungsweise Albuminbindung scheinen die Blutverweildauer zu verlängern, die Tumoraufnahme des Radiopharmakons durch vermehrte Durchgänge durch das Tumorbett zu erhöhen und die Nierenaufnahme durch Verringerung der renalen Filtration zu

reduzieren (Kelly et al. 2017). Das albuminbindende Derivat ^{177}Lu -HTK01169 mit einer verlängerten Blutverweildauer zeigte im Vergleich zu ^{177}Lu -PSMA-617 ein 3,7-fach höheres Tumor-Uptake und eine 8,3-fach höhere Gesamtstrahlendosis an LNCaP-Tumor-Xenografts. Die Studie an LNCaP-Tumor-tragenden Mäusen zeigte, dass nur ein Viertel der verabreichten Aktivität von ^{177}Lu -PSMA-617 für ^{177}Lu -HTK01169 erforderlich ist, um eine ähnliche Behandlungswirksamkeit zu erzielen (Kuo et al. 2018). Umbricht et al. beschreiben ebenfalls, dass eine erhöhte Albuminbindung mit einer verminderten Blut-Clearance aufgrund der gesteigerten Retention einhergeht, geben jedoch zu bedenken, dass eine zu hohe Retention der Radioaktivität für die therapeutische Anwendung wegen des erhöhten Risikos einer Knochenmarkstoxizität problematisch wäre (Umbricht et al. 2018).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Plasmaproteinbindung von ^{177}Lu -PSMA-617 in dem untersuchten Bereich nicht von der Konzentration des kalten Präkursors beeinflusst wird. Bei PSMA-617-Konzentration zwischen 5 und 50 $\mu\text{g}/\text{GBq}$ zeigte die Plasmaproteinbindung keine Tendenz, sodass sich festhalten lässt, dass die Veränderung der Präkursor-Konzentration keine effektive Möglichkeit ist, die Plasmaproteinbindung und somit auch die therapeutische Wirksamkeit der Radioligandentherapie zu steigern.

Für die Qualität der Diagnostik mit ^{68}Ga -PSMA-11 ist die alleinige Betrachtung der Plasmaproteinbindung nicht ausreichend. Vielmehr kommt es auf das Tumor-zu-Hintergrund-Verhältnis des Radiopharmakons an. Die Plasmaproteinbindung ist hierfür jedoch ein wichtiger Indikator, da es bei hoher Plasmaproteinbindung nachweislich zu einer höheren Blutpool-Aktivität des PSMA-Liganden kommt (Kelly et al. 2018). Gerade in der Frühphase bedeutet dies eine hohe Hintergrundaktivität bei geringerer Tumoraufnahme des Tracers. Mit der Zeit steigt der Zell-Uptake und damit das Tumor-Hintergrund-Verhältnis zwar an, aufgrund der kurzen Halbwertszeit von knapp einer Stunde ist dieser Anstieg jedoch limitiert. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass hoch plasmaproteinbindende Verbindungen gerade zu Beginn eher nachteilhaft und den Verbindungen mit geringer Plasmaproteinbindung unterlegen sind (Schmidt 2017). Es konnte gezeigt werden, dass das Tumor-Hintergrund-Verhältnis von ^{68}Ga -PSMA-Liganden nach drei Stunden höher ist als nach einer Stunde, die Bildqualität der PET jedoch bereits nach einer Stunde sehr aussagekräftig ist mit exzellentem Kontrast und hohen Detektionsraten (Afshar-Oromieh et al. 2013). Aufgrund der kurzen Halbwertszeit des ^{68}Ga muss die Bildgebung zeitnah nach Applikation des Tracers durchgeführt werden, weshalb der

Effekt der steigenden Tumoraufnahme des ^{68}Ga -PSMA-11 mit der Zeit nicht wirklich zur Geltung kommen kann.

Die durchgeführten Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, dass die Plasmaproteinbindung von ^{68}Ga -PSMA-11, wenn überhaupt, erst bei sehr hohen PSMA-11-Konzentrationen beeinflusst wird, dies jedoch auch nur in einem geringen Maß. So lässt sich die Plasmaproteinbindung wohl bei PSMA-11-Konzentrationen ab 100 $\mu\text{g}/\text{GBq}$ leicht senken, die Auswirkungen auf den Zell-Uptake und vor allem deren Verhältnis zueinander sind jedoch deutlich nachteilhafter (vgl. 4.4).

4.3 Einfluss des Prostatakarzinomzell-Uptakes von PSMA-Liganden auf die Diagnostik und Therapie des Prostatakarzinoms

Bei experimentellen Forschungsfragen werden zur Untersuchung der in-vitro Eigenschaften eines Prostatakarzinoms Zellkulturexperimente durchgeführt. Zu den Zelllinien des Prostatakarzinoms zählen unter anderem LNCaP und PC-3. Die LNCaP-Zelllinie hat ihren Ursprung in einer Lymphknotenmetastase eines Mannes mit Adenokarzinom der Prostata. In der Literatur werden die Zellen als androgensensitiv und PSMA-positiv beschrieben (Castanares et al. 2016). PC-3-Zellen wurden aus einer Knochenmetastase isoliert und zeigen Charakteristika eines kleinzelligen neuroendokrinen Prostatakarzinoms. Diese Zellen sprechen nicht auf Androgene an und exprimieren kein PSMA (Tai et al. 2011).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PSMA-Liganden von LNCaP-Zellen gebunden werden und diese daher für die Untersuchung der Forschungsfrage geeignet sind. Die PC-3-Prostatakarzinomzellen zeigten, in Übereinstimmung mit anderen Forschungsarbeiten, keine Bindung der PSMA-Liganden und konnten daher als Negativkontrolle verwendet werden (Baur et al. 2014, Wang et al. 2018).

Eine hohe Aufnahme des Tracers in die Karzinomzelle ist sowohl für die Diagnostik als auch für die Therapie des Prostatakarzinoms erstrebenswert. Bei der Diagnostik mittels PET ist die Aufnahme von ^{68}Ga -PSMA-11 in die Tumorzellen im Verhältnis zur Hintergrundaktivität bedeutend. Ein höheres Verhältnis führt zu einer gesteigerten Sensitivität der Untersuchung (Ceci und Fanti 2019). Es kann davon ausgegangen werden, dass sich durch eine vermehrte Aufnahme des Gamma-Strahlers in die Karzinomzelle das Tumor-zu-Hintergrund-Verhältnis erhöht und sich damit der

Kontrast und die Qualität der PET-Bildgebung steigern lässt. Dies gilt es jedoch durch weitere Untersuchungen zu validieren.

Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung der PSMA-Liganden an LNCaP-Zellen von der Präkursor-Konzentration abhängig ist. So wurde ^{68}Ga -PSMA-11 besser an Prostatakarzinomzellen gebunden, wenn der Anteil des kalten PSMA-Präkursors im Radiopharmakon niedrig war. Bei hohen Konzentrationen des Präkursors ($\geq 100 \mu\text{g PSMA-11/GBq}$) kam es zu einer signifikant sichtbaren Minderung des Zell-Uptakes, welcher mit steigender Konzentration immer weiter abnahm. Bei den klinisch relevanten Konzentrationen des kalten Präkursors war der Effekt jedoch nicht besonders stark ausgeprägt, weshalb es fraglich sein dürfte, ob eine veränderte Konzentration der PSMA-Liganden in diesem Bereich eine sichtbare Auswirkung auf die PET-Qualität haben kann. Nichtsdestotrotz lässt sich anhand der vorliegenden Ergebnisse feststellen, dass die Präkursor-Konzentration für eine optimale Aufnahme des Radiopharmakons in die Karzinomzelle in einem niedrigen Bereich gehalten werden sollte.

Im Rahmen der Therapie des metastasierten kastrationsresistenten Prostatakarzinoms wird ^{177}Lu -PSMA-617 als Beta-Strahler in die Karzinomzellen internalisiert. Dadurch wird eine zielgerichtete Bestrahlung der malignen Zellen erreicht. Eine hohe Aufnahme in diese Tumorzellen könnte daher die therapeutische Wirksamkeit steigern, da einerseits eine höhere lokale Bestrahlung erreicht wird, und andererseits weniger gesundes Gewebe der Beta-Emission ausgesetzt ist. Choy et al. konnten zeigen, dass eine erhöhte Aufnahme von ^{177}Lu -PSMA-Inhibitoren in die Tumorzelle zu einer überlegenen therapeutischen Wirksamkeit in PSMA-positiven humanen Xenotransplantat-Tumormodellen führt (Choy et al. 2017).

In dieser Arbeit wurde dargelegt, dass die Bindung von ^{177}Lu -PSMA-617 an LNCaP-Zellen von der Präkursor-Konzentration abhängig ist. So wurde das Radiopharmakon etwas besser an Prostatakarzinomzellen gebunden, wenn der Anteil des kalten PSMA-Präkursors niedrig war. Die Veränderung war bei den untersuchten Präkursor-Konzentrationen zwar nur schwach ausgeprägt, es ist jedoch davon auszugehen, dass es bei deutlich höheren Konzentrationen zu einem ähnlichen Abfall des Zell-Uptakes wie bei den Versuchen mit ^{68}Ga -PSMA-11 kommt.

4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Die PSMA-Liganden-gestützte Positronen-Emissions-Tomographie hat berechtigterweise einen bedeutenden Stellenwert in der Diagnostik des Prostatakarzinoms. Durch deren Einführung kam es zu einer grundlegenden Verbesserung bei der Detektion von lymphogenen und ossären Metastasen im Vergleich zur konventionellen Bildgebung (Schlemmer et al. 2021). Es konnte gezeigt werden, dass der Kontrast der PET-Bilder vom Verhältnis der Tumor- zu Hintergrundaktivität des Radiopharmakons abhängig ist. Ein hohes Verhältnis geht mit einem besseren Kontrast einher, wodurch sich die Sensitivität der Untersuchung steigern lässt (Ceci und Fanti 2019). Die Bestimmung von Plasmaproteinbindung und Prostatakarzinomzell-Uptake spielt hierbei eine zentrale Rolle. Ein hoher Zell-Uptake bei niedriger Plasmaproteinbindung könnte den Kontrast von PET-Bildern verbessern, da mehr Tumor-Uptake in Relation zur Hintergrundaktivität stattfindet.

Unter Betrachtung der oben genannten Ergebnisse lässt sich schlussfolgern, dass die Plasmaproteinbindung von ^{68}Ga -PSMA-11 kaum von der Präkursor-Konzentration beeinflusst wird. Der zelluläre Uptake ist hingegen deutlich stärker von dieser Konzentration abhängig. Niedrige PSMA-11-Konzentrationen zwischen 7,5 und 15 $\mu\text{g}/\text{GBq}$ zeigten das höchste Verhältnis von Zell-Uptake zu Plasmaproteinbindung und damit die theoretisch günstigsten in-vitro-Eigenschaften und könnten daher für den besten Bildkontrast bei der PET-Diagnostik des Prostatakarzinoms sorgen. Dies gilt es durch in-vivo Untersuchungen zu bestätigen.

Anhand dieser Arbeit lässt sich ableiten, dass die Präkursor-Konzentration für den diagnostischen Einsatz von ^{68}Ga -PSMA-11 möglichst in dem niedrigen Bereich gehalten werden sollte, der aktuell verwendet wird. Bei deutlicher Erhöhung ($\geq 100 \mu\text{g PSMA-11}/\text{GBq}$) zeigte sich eine signifikante Abnahme des zellulären Uptakes, sodass mit einer verminderten Qualität der PET-Bildgebung gerechnet werden muss.

Aller Voraussicht nach wird sich die PSMA-basierte PET/CT weiter etablieren. Hier gilt es jedoch zu bedenken, dass die Untersuchung hierfür nicht zwangsweise Gallium-basiert sein muss. Zwar zeigt die ^{68}Ga -PSMA-PET eine gute Bildqualität mit hohen Detektionsraten, dennoch gibt es auch Einschränkungen. Nachteilig zu bewerten ist unter anderem die kurze Halbwertszeit des Radionuklids. Außerdem wird das Radiopharmakon schnell über die Harnwege ausgeschieden, was zu einer starken Anreicherung in der Blase führt. Eine weitere Herausforderung ist die begrenzte Verfügbarkeit von ^{68}Ga über lokale Radionuklidgeneratoren. Jeder Generator stellt eine beträchtliche Vorabinvestition dar und erfordert separate Synthesen zu verschiedenen

Tageszeiten in einer lokalen Radiopharmazie (Giesel et al. 2017). Eine Alternative zur Gallium-basierten PET sind Fluor-basierte PSMA-Liganden. Hier ist insbesondere ^{18}F -PSMA-1007 ein vielversprechender Kandidat (Giesel et al. 2017, Sprute et al. 2021). Durch die Kopplung der PSMA-Liganden an ^{18}F anstatt ^{68}Ga ist eine einfachere Herstellung möglich und zudem können Fluor-basierte Radiopharmaka auch an PET/CT-Zentren ohne eigene Radiopharmazie eingesetzt werden (Schlemmer et al. 2021).

Die Radioligandentherapie mit ^{177}Lu -markierten PSMA-Liganden ist hochwirksam für die Behandlung von Patienten mit kastrationsresistentem progredienten Prostatakarzinom. Hierdurch kann eine signifikante Verbesserung der klinischen Symptome sowie eine gute Palliation bei geringer Toxizität erreicht werden (Kulkarni et al. 2016). Verschiedene Studien belegen, dass insbesondere die Plasmaproteinbindung einen entscheidenden Einfluss auf die Wirksamkeit der Radioligandentherapie haben kann. So lässt sich die therapeutische Wirksamkeit durch Anhebung der Plasmaproteinbindung steigern (Benešová et al. 2018, Choy et al. 2017).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Plasmaproteinbindung von ^{177}Lu -PSMA-617 bei PSMA-617-Konzentrationen zwischen 5 und 50 $\mu\text{g}/\text{GBq}$ nicht von der Konzentration des Präkursors beeinflusst wird. Das Radiopharmakon zeigte bei niedriger Präkursor-Konzentration eine etwas bessere Bindung an LNCaP-Zellen. Daher scheint für den Einsatz bei der Radioligandentherapie eher eine niedrige Präkursor-Konzentration empfehlenswert zu sein. Diese These kann jedoch nur durch weitere Untersuchungen, zum Beispiel an Tumor-Xenografts, validiert werden.

Die Veränderung der Präkursor-Konzentration kann keinen entscheidenden Beitrag leisten, um die Plasmaproteinbindung zu erhöhen und damit die therapeutische Wirksamkeit der Radioligandentherapie mit ^{177}Lu -PSMA-617 zu steigern. In Zukunft wird der Fokus daher eher auf der Entwicklung neuer, hoch proteinbindender PSMA-Liganden liegen. Durch das Anhängen albuminbindender Motive kann die Plasmaproteinbindung gezielter und ausgeprägter erhöht werden als durch die alleinige Anpassung der aktuellen Therapie mit ^{177}Lu -PSMA-617.

Es wird diesbezüglich bereits an wirksameren Alternativen geforscht. Hierzu zählt zum Beispiel die Entwicklung hoch plasmaproteinbindender PSMA-Inhibitoren oder das Anhängen von Ibuprofen an das Radiopharmakon. So lässt sich mit ^{177}Lu -Ibu-DAB-PSMA eine verlängerte Blutkreislaufzeit und eine erhöhte Tumorakkumulation im Vergleich zu ^{177}Lu -PSMA-617 erzeugen (Deberle et al. 2020). Ebenso kann durch Steigerung der Lipophilie des Präkursors die Tumoraufnahme erhöht

werden (Wirtz et al. 2018). Für diese neu entwickelten PSMA-Inhibitoren mit hoher Plasmaproteinbindung und verbesserter Tumoraufnahme werden First-in-Human-Studien benötigt. Diese müssen zeigen, ob ein erhöhter therapeutischer Nutzen besteht, der die Entwicklung und den Einsatz von PSMA-Liganden mit hoher Plasmaproteinbindung weiter vorantreibt (Wirtz et al. 2018).

Bei der Behandlung von Prostatakarzinompatienten sind weitere nuklearmedizinische Entwicklungen, sowohl im diagnostischen als auch im therapeutischen Bereich, zu erwarten.

5. Zusammenfassung

Das Prostatakarzinom ist die am häufigsten diagnostizierte Krebserkrankung bei Männern. Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und die Radioligandentherapie haben hierbei einen zunehmenden Stellenwert. Bei der Synthese der dafür verwendeten Radiopharmaka werden Radionuklide an Präkursoren gekoppelt. Für die Diagnostik wird ^{68}Ga mit PSMA-11 und für die Therapie ^{177}Lu mit PSMA-617 synthetisiert. Ein hohes Verhältnis von Tumor- zu Hintergrundaktivität des Radiopharmakons geht mit einem besseren Kontrast von PET-Bildern einher. Zudem konnten neuere Studien zeigen, dass eine erhöhte Plasmaproteinbindung des Radiopharmakons zu einer höheren Wirksamkeit der Radioligandentherapie führt. Ziel dieser Arbeit war es, die Abhängigkeit der Plasmaproteinbindung und des Prostatakarzinomzell-Uptakes der Radiopharmaka von der Präkursor-Konzentration zu untersuchen. Des Weiteren sollte aus der Zusammenschau von Plasmaproteinbindung und zellulärem Uptake eine Aussage über die für Diagnostik und Therapie günstigsten Konzentrationen der Präkursoren getroffen werden.

Für die in-vitro Experimente wurde ^{68}Ga -PSMA-11 mit Präkursor-Konzentrationen zwischen 1,5 $\mu\text{g}/\text{GBq}$ und 1 mg/GBq hergestellt. ^{177}Lu -PSMA-617 wurde mit Präkursor-Konzentrationen zwischen 5 und 50 $\mu\text{g}/\text{GBq}$ synthetisiert. Die Plasmaproteinbindung der jeweiligen Radiopharmaka wurde mittels Ultrafiltration an Humanplasma bestimmt. Die zelluläre Aufnahme der Radiopharmaka wurde an kultivierten, PSMA-positiven LNCaP-Zellen sowie zusätzlich an PSMA-negativen PC-3-Zellen untersucht. Zur Analyse der günstigsten Konzentrationen wurden die Ergebnisse von Plasmaproteinbindung und Zell-Uptake miteinander verglichen und ins Verhältnis gesetzt.

Die in-vitro Plasmaproteinbindung von ^{68}Ga -PSMA-11 lag bei PSMA-11-Konzentrationen zwischen 7,5 und 100 $\mu\text{g}/\text{GBq}$ im annähernd gleichen Bereich (42,0 – 42,6 %). Erst bei sehr hohen Präkursor-Konzentrationen ($\geq 500 \mu\text{g}/\text{GBq}$) zeigte sich eine geringe, jedoch nicht signifikante Abnahme. Der Zell-Uptake sank hingegen mit steigender Konzentration signifikant. Das Verhältnis von Zell-Uptake zu Plasmaproteinbindung war bei PSMA-11-Konzentrationen von 7,5 – 15 $\mu\text{g}/\text{GBq}$ am höchsten. Bei höheren Konzentrationen ($\geq 100 \mu\text{g}/\text{GBq}$) nahm das Verhältnis deutlich ab. Die Plasmaproteinbindung von ^{177}Lu -PSMA-617 lag bei den untersuchten Präkursor-Konzentrationen im gleichen Bereich ohne signifikante Änderungen (78 – 79 %). Beim Zell-Uptake kam es zu einer leichten Abnahme bei höherer PSMA-617-Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{GBq}$. Eine Reduzierung der Präkursor-Menge unter 5 μg PSMA-617/GBq war aufgrund einer zu geringen radiochemischen Reinheit des Radiopharmakons nicht möglich.

Es lässt sich festhalten, dass der Zell-Uptake von ^{68}Ga -PSMA-11 und ^{177}Lu -PSMA-617 deutlich stärker von der Konzentration der kalten Präkursoren beeinflusst wird als die Plasmaproteinbindung. Niedrige PSMA-11-Konzentrationen zwischen 7,5 und 15 $\mu\text{g}/\text{GBq}$ zeigten das höchste Verhältnis von Zell-Uptake zu Plasmaproteinbindung und damit die theoretisch günstigsten in-vitro-Eigenschaften für die PET-Diagnostik des Prostatakarzinoms. Die Plasmaproteinbindung von ^{177}Lu -PSMA-617 wird, zumindest bei PSMA-617-Konzentrationen zwischen 5 und 50 $\mu\text{g}/\text{GBq}$, nicht von der Konzentration des Präkursors beeinflusst. Die Veränderung der Präkursor-Konzentration ist anhand der Untersuchungen keine effektive Möglichkeit, um die Plasmaproteinbindung zu erhöhen und damit die therapeutische Wirksamkeit der Radioligandentherapie mit ^{177}Lu -PSMA-617 zu steigern.

6. Literaturverzeichnis

Afshar-Oromieh, A., Alberts, I., Sachpekidis, C., Rominger, A. (2019): Prostataspezifische Membrantantigen(PSMA)-basierte Diagnostik und Therapie des Prostatakarzinoms. *Urologe*, 58, 1429–1434

Afshar-Oromieh, A., Hetzheim, H., Kratochwil, C., Benešová, M., Eder, M., Neels, O. C., Eisenhut, M., Kübler, W., Holland-Letz, T., Giesel, F. L., Mier, W., Kopka, K., Haberkorn, U. (2015): The Theranostic PSMA Ligand PSMA-617 in the Diagnosis of Prostate Cancer by PET/CT: Biodistribution in Humans, Radiation Dosimetry, and First Evaluation of Tumor Lesions. *J Nucl Med*, 56(11), 1697–1705

Afshar-Oromieh, A., Malcher, A., Eder, M., Eisenhut, M., Linhart, H. G., Hadaschik, B. A., Holland-Letz, T., Giesel, F. L., Kratochwil, C., Haufe, S., Haberkorn, U., Zechmann, C. M. (2013): PET imaging with a [68Ga]gallium-labelled PSMA ligand for the diagnosis of prostate cancer: biodistribution in humans and first evaluation of tumour lesions. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 40(4), 486–495

Ahmadzadehfar, H., Rahbar, K., Kürpig, S., Bögemann, M., Claesener, M., Eppard, E., Gärtner, F., Rogenhofer, S., Schäfers, M., Essler, M. (2015): Early side effects and first results of radioligand therapy with (177)Lu-DKFZ-617 PSMA of castrate-resistant metastatic prostate cancer: a two-centre study. *EJNMMI Res*, 5(1), 114

Banerjee, P. P., Banerjee, S., Brown, T. R., Zirkin, B. R. (2018): Androgen action in prostate function and disease. *Am J Clin Exp Urol*, 6(2), 62–77

Barinka, C., Sácha, P., Sklenár, J., Man, P., Bezouska, K., Slusher, B. S., Konvalinka, J. (2004): Identification of the N-glycosylation sites on glutamate carboxypeptidase II necessary for proteolytic activity. *Protein Sci.*, 13(6), 1627–1635

Barrett, J. A., Coleman, R. E., Goldsmith, S. J., Vallabhajosula, S., Petry, N. A., Cho, S., Armor, T., Stubbs, J. B., Maresca, K. P., Stabin, M. G., Joyal, J. L., Eckelman, W. C., Babich, J. W. (2013): First-in-man evaluation of 2 high-affinity PSMA-avid small molecules for imaging prostate cancer. *J Nucl Med*, 54(3), 380–387

Baur, B., Solbach, C., Andreolli, E., Winter, G., Machulla, H. J., Reske, S. N. (2014): Synthesis, Radiolabelling and In Vitro Characterization of the Gallium-68-, Yttrium-90- and Lutetium-177-Labelled PSMA Ligand, CHX-A''-DTPA-DUPA-Pep. *Pharmaceuticals (Basel)*, 7(5), 517–529

Benešová, M., Schäfer, M., Bauder-Wüst, U., Afshar-Oromieh, A., Kratochwil, C., Mier, W., Haberkorn, U., Kopka, K., & Eder, M. (2015). Preclinical Evaluation of a Tailor-Made DOTA-

Conjugated PSMA Inhibitor with Optimized Linker Moiety for Imaging and Endoradiotherapy of Prostate Cancer. *J Nucl Med*, 56(6), 914–920

Benešová, M., Umbricht C. A., Schibli, R., Müller, C. (2018): Albumin-binding PSMA ligands: optimization of the tissue distribution profile. *Mol Pharm*, 15(3), 934-946

Bhanji, Y., Rowe, S. P., Pavlovich, C. P. (2022): New imaging modalities to consider for men with prostate cancer on active surveillance. *World J Urol*, 40(1), 51–59

Bill-Axelson, A., Holmberg, L., Garmo, H., Taari, K., Busch, C., Nordling, S., Häggman, M., Andersson, S., Andrén, O., Steineck, G., Adami, H., Johansson, J. (2018): Radical prostatectomy or watchful waiting in prostate cancer - 29-Year follow-up. *N Engl J Med*, 379(24), 2319-2329

Bluemel, C., Krebs, M., Polat, B., Linke, F., Eiber, M., Samnick, S., Lapa, C., Lassmann, M., Riedmiller, H., Czernin, J., Rubello, D., Bley, T., Kropf, S., Wester, H. J., Buck, A. K., Herrmann, K. (2016): 68Ga-PSMA-PET/CT in patients with biochemical prostate cancer recurrence and negative 18F-Choline-PET/CT. *Clin nucl med*, 41(7), 515-521

Bostwick, D. G., Pacelli, A., Blute, M., Roche, P., Murphy, G. P. (1998): Prostate specific membrane antigen expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma: a study of 184 cases. *Cancer*, 82(11), 2256–2261

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., Jemal, A. (2018): Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 68(6), 394-424

Bubendorf, L., Schöpfer, A., Wagner, U., Sauter, G., Moch, H., Willi, N., Gasser, T. C., Mihatsch, M. J. (2000): Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1,589 patients. *Hum Pathol*, 31(5), 578–583

Calopedos, R. J. S., Chalasani, V., Asher R., Emmett, L., Woo, H. H. (2017): Lutetium-177-labelled anti-prostate-specific membrane antigen antibody and ligands for the treatment of metastatic castrate-resistant prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 20(3), 352-360

Castanares, M. A., Copeland, B. T., Chowdhury, W. H., Liu, M. M., Rodriguez, R., Pomper, M. G., Lupold, S. E., Foss, C. A. (2016): Characterization of a novel metastatic prostate cancer cell line of LNCaP origin. *Prostate*, 76(2), 215–225

Ceci, F., Fanti, S. (2019): PSMA-PET/CT imaging in prostate cancer: why and when. *Clin Transl Imaging* 7, 377–379

- Chang, S. S. (2004): Overview of prostate-specific membrane antigen. *Rev Urol*, 6 Suppl 10, 13-18
- Chang, S. S., O'Keefe, D. S., Bacich, D. J., Reuter, V. E., Heston, W. D., Gaudin, P. B. (1999): Prostate-specific membrane antigen is produced in tumor-associated neovasculature. *Clin Cancer Res*, 5(10), 2674–2681
- Choy, C. J., Ling, X., Geruntho, J. J., Beyer, S. K., Latoche, J. D., Langton-Webster, B., Anderson, C. J., Berkman, C. E. (2017): ¹⁷⁷Lu-Labeled phosphoramidate-based PSMA inhibitors: the effect of an albumin binder on biodistribution and therapeutic efficacy in prostate tumor-bearing mice. *Theranostics*, 7(7), 1928-1939
- D'Amico, A. V., Whittington, R., Malkowicz, S. B., Schultz, D., Blank, K., Broderick, G. A., Tomaszewski, J. E., Renshaw, A. A., Kaplan, I., Beard, C. J., Wein, A. (1998): Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *JAMA*, 280(11), 969–974
- Deberle, L. M., Benešová, M., Umbricht, C. A., Borgna, F., Büchler, M., Zhernosekov, K., Schibli, R., Müller, C. (2020): Development of a new class of PSMA radioligands comprising ibuprofen as an albumin-binding entity. *Theranostics*, 10(4), 1678-1693
- Deutsche Gesellschaft für Nuklearmedizin (2015): DGN-Handlungsempfehlung (S1-Leitlinie): Nuklearmedizinische Bildgebung, Stand: 1/2015, AWMF-Registernummer: 031-030, <https://www.nuklearmedizin.de/leistungen/leitlinien/docs/031-030.pdf> (abgerufen am: 09.12.2021)
- Deutsche Gesellschaft für Nuklearmedizin (2019): DGN-Handlungsempfehlung (S1-Leitlinie): PSMA-Liganden-PET/CT in der Diagnostik des Prostatakarzinoms, Stand 10/2019, AWMF-Registernummer: 031-055, https://www.nuklearmedizin.de/leistungen/leitlinien/docs/031-055_10-2019.pdf (abgerufen am: 26.11.2022)
- Eder, M., Neels, O., Müller, M., Bauder-Wüst, U., Remde, Y., Schäfer, M., Hennrich, U., Eisenhut, M., Afshar-Oromieh, A., Haberkorn, U., Kopka, K. (2014): Novel Preclinical and Radiopharmaceutical Aspects of [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-HBED-CC: A New PET Tracer for Imaging of Prostate Cancer. *Pharmaceuticals (Basel)*, 7(7), 779–796
- Emmett, L., Willowson, K., Violet, J., Shin, J., Blanksby, A., Lee, J. (2017): Lutetium ¹⁷⁷ PSMA radionuclide therapy for men with prostate cancer: a review of the current literature and discussion of practical aspects of therapy. *J Med Radiat Sci*, 64(1), 52-60

Fendler, W. P., Reinhardt, S., Ilhan, H., Delker, A., Böning, G., Gildehaus, F. J., Stief, C., Bartenstein, P., Gratzke, C., Lehner, S., Rominger, A. (2017): Preliminary experience with dosimetry, response and patient reported outcome after ¹⁷⁷Lu-PSMA-617 therapy for metastatic castration-resistant prostate cancer. *Oncotarget*, 8(2), 3581-3590

Freissmuth, M. (2016): Aufnahme, Verteilung und Speicherung, Metabolismus und Ausscheidung von Pharmaka. In: Freissmuth, M., Offermanns, S., Böhm, S. (Hrsg.) *Pharmakologie und Toxikologie*, Aufl. 2, S. 10-30, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg

Fuscaldi, L. L., Sobral, D. V., Durante, A. C. R., Mendonça, F. F., Miranda, A. C. C., da Cunha, M. L., Malavolta, L., Mejia, J., de Barboza, M. F. (2021): Standardization of the [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 Radiolabeling Protocol in an Automatic Synthesis Module: Assessments for PET Imaging of Prostate Cancer. *Pharmaceuticals (Basel)*, 14(5), 385

Giesel, F. L., Hadaschik, B., Cardinale, J., Radtke, J., Vinsensia, M., Lehnert, W., Kesch, C., Tolstov, Y., Singer, S., Grabe, N., Duensing, S., Schäfer, M., Neels, O. C., Mier, W., Haberkorn, U., Kopka, K., Kratochwil, C. (2017): F-18 labelled PSMA-1007: biodistribution, radiation dosimetry and histopathological validation of tumor lesions in prostate cancer patients. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 44(4), 678–688

Haberkorn, U., Eder, M., Kopka, K., Babich, J. W., Eisenhut, M. (2016): New strategies in prostate cancer: prostate-specific membrane antigen (PSMA) ligands for diagnosis and therapy. *Clin Cancer Res*, 22(1), 9-15

Hamdy, F. C., Donovan, J. L., Lane, J. A., Mason, M., Metcalfe, C., Holding, P., Davis, M., Peters, T. J., Turner, E. L., Martin, R. M., Oxley, J., Robinson, M., Staffurth, J., Walsh, E., Bollina, P., Catto, J., Doble, A., Doherty, A., Gillatt, D., Kockelbergh, R., Kynaston, H., Paul, A., Powell, P., Prescott, S., Rosario, D. J., Rowe, E., Neal, D. E. (2016): 10-Year outcomes after monitoring, surgery, or radiotherapy for localized prostate cancer. *N Engl J Med*, 375(15), 1415–1424

Heck, M. M., Retz, M., Tauber, R., Knorr, K., Kratochwil, C., Eiber M. (2017): Radionuklidtherapie des Prostatakarzinoms mittels PSMA-Lutetium. *Urologe*, 56, 32-39

Heidenreich, A., Bastian, P. J., Bellmunt, J., Bolla, M., Joniau, S., van der Kwast, T., Mason, M., Matveev, V., Wiegel, T., Zattoni, F., Mottet, N. (2014): EAU guidelines on prostate cancer. part 1: screening, diagnosis, and local treatment with curative intent-update 2013. *Eur Urol*, 65(1), 124-137

Igerc, I., Kohlfürst, S., Gallowitsch, H. J. , Matschnig, S., Kresnik, E., Gomez-Segovia, I., Lind, P. (2008): The value of 18F-Choline PET/CT in patients with elevated PSA-level and negative prostate needle biopsy for localisation of prostate cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 35, 976-983

Jadvar, H. (2011): Prostate cancer: PET with 18F-FDG, 18F- or 11C-acetate, and 18F- or 11C-choline. *J Nucl Med*, 52(1), 81-89

Jadvar, H. (2016): Is there use for FDG-PET in prostate cancer?. *Semin Nucl Med*, 46(6), 502-506

Kelly, J. M., Amor-Coarasa, A., Nikolopoulou, A., Wüstemann, T., Barelli, P., Kim, D., Williams, C., Jr, Zheng, X., Bi, C., Hu, B., Warren, J. D., Hage, D. S., DiMagno, S. G., Babich, J. W. (2017): Dual-Target Binding Ligands with Modulated Pharmacokinetics for Endoradiotherapy of Prostate Cancer. *J Nucl Med*, 58(9), 1442-1449

Kelly, J. M., Amor-Coarasa, A., Ponnala, S., Nikolopoulou, A., Williams Jr, C., DiMagno, S. G., Babich, J. W. (2018): Albumin-binding PSMA ligands: implications for expanding the therapeutic window. *J Nucl Med*, 60(5), 656-663

Ketchandji, M., Kuo, Y. F., Shahinian, V. B., Goodwin, J. S. (2009): Cause of death in older men after the diagnosis of prostate cancer. *J Am Geriatr Soc*, 57(1), 24-30

Khreish, F., Ghazal, Z., Marlowe, R. J., Rosar, F., Sabet, A., Maus, S., Linxweiler, J., Bartholomä, M., Ezziddin, S. (2022): 177 Lu-PSMA-617 radioligand therapy of metastatic castration-resistant prostate cancer: Initial 254-patient results from a prospective registry (REALITY Study). *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 49(3), 1075–1085

Kitajima, K., Murphy, R. C., Nathan, M. A., Sugimura, K. (2014): Update on positron emission tomography for imaging of prostate cancer. *Int J Urol*, 21(1), 12-23

Kratochwil, C., Giesel, F. L., Stefanova, M., Benešová, M., Bronzel, M., Afshar-Oromieh, A., Mier, W., Eder, M., Kopka, K., Haberkorn, U. (2016): PSMA-targeted radionuclide therapy of metastatic castration-resistant prostate cancer with 177Lu-labeled PSMA-617. *J Nucl Med*, 57(8), 1170-1176

Kratochwil, N. A., Huber, W., Müller, F., Kansy, M., Gerber, P. R. (2002): Predicting plasma protein binding of drugs: a new approach. *Biochem Pharmacol*, 64(9), 1355-1374

Kulkarni, H. R., Singh, A., Schuchardt, C., Niepsch, K., Sayeg, M., Leshch, Y., Wester, H. J., Baum, R. P. (2016): PSMA-Based Radioligand Therapy for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: The Bad Berka Experience Since 2013. *J Nucl Med*, 57(Suppl 3), 97S–104S

Kuo, H. T., Merkens, H., Zhang, Z., Uribe, C. F., Lau, J., Zhang, C., Colpo, N., Lin, K. S., Bénard, F. (2018): Enhancing Treatment Efficacy of ¹⁷⁷Lu-PSMA-617 with the Conjugation of an Albumin-Binding Motif: Preclinical Dosimetry and Endoradiotherapy Studies. *Mol Pharm*, 15(11), 5183–5191

Kwon, H., Son, S.-H., Byun, Y. (2019): Prostate-specific membrane antigen (PSMA)-targeted radionuclide probes for imaging and therapy of prostate cancer. *Asian J Org Chem*, 8, 1588-1600

Kyriakopoulos, C. E., Chen, Y. H., Carducci, M. A., Liu, G., Jarrard, D. F., Hahn, N. M., Shevrin, D. H., Dreicer, R., Hussain, M., Eisenberger, M., Kohli, M., Plimack, E. R., Vogelzang, N. J., Picus, J., Cooney, M. M., Garcia, J. A., DiPaola, R. S., Sweeney, C. J. (2018): Chemohormonal therapy in metastatic hormone-sensitive prostate cancer: long-term survival analysis of the randomized phase III E3805 CHAARTED trial. *J clin oncol*, 36(11), 1080-1087

Lawal, I. O., Ankrah, A. O., Mokgoro, N. P., Vorster, M., Maes, A., Sathekge, M. M. (2017): Diagnostic sensitivity of Tc-99m HYNIC PSMA SPECT/CT in prostate carcinoma: A comparative analysis with Ga-68 PSMA PET/CT. *Prostate*, 77(11), 1205–1212

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Prostatakarzinom, Langversion 6.2, 2021, AWMF Registernummer: 043/022OL, <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/prostatakarzinom/> (abgerufen am: 26.03.2022)

Machulkin, A. E., Ivanenkov, Y. A., Aladinskaya, A. V., Veselov, M. S., Aladinskiy, V. A., Beloglazkina, E. K., Koteliansky, V. E., Shakhbazyan, A. G., Sandulenko, Y. B., Majouga, A. G. (2016): Small-molecule PSMA ligands. Current state, SAR and perspectives. *J Drug Target*, 24(8), 679–693

Mandiwana, V., Kalombo, L., Hayeshi, R., Zeevaart, J. R., Ebenhan, T. (2021): Preclinical Assessment Addressing Intravenous Administration of a [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-617 Microemulsion: Acute In Vivo Toxicity, Tolerability, PET Imaging, and Biodistribution. *Molecules*, 26(9), 2650

Martínez, M. J., Ziegler, S. I., Beyer, T. (2008): PET and PET/CT: basic principles and instrumentation. In: Dresel, S. (Hrsg.) *PET in Oncology*, S. 1-23. Recent Results in Cancer Research, 170, Springer, Berlin, Heidelberg

Morigi, J. J., Stricker, P. D., van Leeuwen, P. J., Tang, R., Ho, B., Nguyen, Q., Hruby, G., Fogarty, G., Jagavkar, R., Kneebone, A., Hickey, A., Fanti, S., Tarlinton L., Emmett, L. (2015): Prospective comparison of ¹⁸F-Fluoromethylcholine versus ⁶⁸Ga-PSMA PET/CT in prostate cancer patients

who have rising PSA after curative treatment and are being considered for targeted therapy. *J Nucl Med*, 56(8), 1185-1190

Müller, C., Struthers, H., Winiger, C., Zhernosekov, K., Schibli, R. (2012): DOTA conjugate with an albumin binding entity enables the first folic acid-targeted ¹⁷⁷Lu-radionuclide tumor therapy in mice. *J Nucl Med*, 54(1), 124-131

Parker, C., Nilsson, S., Heinrich, D., Helle, S. I., O'Sullivan, J. M., Fosså, S. D., Chodacki, A., Wiechno, P., Logue, J., Seke, M., Widmark, A., Johannessen, D. C., Hoskin, P., Bottomley, D., James, N. D., Solberg, A., Syndikus, I., Kliment, J., Wedel, S., Boehmer, S., Dall'Oglio, M., Franzén, L., Coleman, R., Vogelzang, N. J., O'Bryan-Tear, C. G., Staudacher, K., Garcia-Vargas, J., Shan M., Bruland, Ø. S., Sartor, O. (2013): Alpha emitter radium-223 and survival in metastatic prostate cancer. *N Engl J Med*, 369(3), 213-223

Pernar, C. H., Ebot, E. M., Wilson, K. M., Mucci, L. A. (2018): The epidemiology of prostate cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 8(12)

Pfister, D., Porres, D., Heidenreich, A., Heidegger, I., Knuechel, R., Steib, F., Behrendt, F. F., Verburg, F. A. (2016): Detection of recurrent prostate cancer lesions before salvage lymphadenectomy is more accurate with (68)Ga-PSMA-HBED-CC than with (18)F-Fluoroethylcholine PET/CT. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 43(8), 1410-1417

Pfob, C. H., Ziegler, S., Graner, F. P., Köhner, M., Schachoff, S., Blechert, B., Wester, H. J., Scheidhauer, K., Schwaiger, M., Maurer, T., Eiber, M. (2016): Biodistribution and radiation dosimetry of (68)Ga-PSMA HBED CC-a PSMA specific probe for PET imaging of prostate cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 43(11), 1962–1970

Rahbar, K., Ahmadzadehfar, H., Kratochwil, C., Haberkorn, U., Schäfers, M., Essler, M., Baum, R. P., Kulkarni, H. R., Schmidt, M., Drzezga, A., Bartenstein, P., Pfestroff, A., Luster, M., Lützen, U., Marx, M., Prasad, V., Brenner, W., Heinzl, A., Mottaghy, F. M., Ruf, J., Meyer, P. T., Heuschkel, M., Eveslage, M., Bögemann, M., Fendler, W.P., Krause, B. J. (2017): German multicenter study investigating ¹⁷⁷Lu-PSMA-617 radioligand therapy in advanced prostate cancer patients. *J Nucl Med*, 58(1), 85-90

Rahbar, K., Bode, A., Weckesser, M., Avramovic, N., Claesener, M., Stegger, L., Bögemann, M. (2016): Radioligand therapy with ¹⁷⁷Lu-PSMA-617 as a novel therapeutic option in patients with metastatic castration resistant prostate cancer. *Clin Nucl Med*, 41(7), 522-528

Rajasekaran, A. K., Anilkumar, G., Christiansen, J. J. (2005): Is prostate-specific membrane antigen a multifunctional protein?. *Am J Physiol Cell Physiol*, 288(5), C975-C981

Robert Koch-Institut (2021): Krebs in Deutschland für 2017/2018. Gemeinsame Publikation des Zentrums für Krebsregisterdaten und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 13. Ausgabe, Berlin, 2021

Ross, J. S., Sheehan, C. E., Fisher, H. A., Kaufman, R. P., Jr, Kaur, P., Gray, K., Webb, I., Gray, G. S., Mosher, R., Kallakury, B. V. (2003): Correlation of primary tumor prostate-specific membrane antigen expression with disease recurrence in prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 9(17), 6357–6362

Schlemmer, H. P., Krause, B. J., Schütz, V., Bonekamp, D., Schwarzenbröck, S., Hohenfellner, M. (2021): Imaging of Prostate Cancer. *Dtsch Arztebl Int*, 118 (42), 713-719

Schlomm, T., Sauter, G. (2016): Beurteilung des Prostatakarzinoms: Gleason-Score – Status 2016. *Dtsch Arztebl* 33-34/2016, SUPPLEMENT: Perspektiven der Urologie 1/2016, 14-17, <https://www.aerzteblatt.de/pdf.asp?id=181220> (abgerufen am: 02.04.2021)

Schmidt, A. (2017): Structural modifications of PSMA ligands to optimize their pharmacokinetics. Dissertation am Lehrstuhl für Pharmazeutische Radiochemie, Fakultät für Chemie, München

Schmidt, R. F., Lang, F. (2007): *Physiologie des Menschen*, 30. Auflage, Springer, Berlin

Schülke, N., Varlamova, O. A., Donovan, G. P., Ma, D., Gardner, J. P., Morrissey, D. M., Arrigale, R. R., Zhan, C., Chodera, A. J., Surowitz, K. G., Maddon, P. J., Heston, W. D., Olson, W. C. (2003): The homodimer of prostate-specific membrane antigen is a functional target for cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(22), 12590–12595

Schuster, D. M., Nanni, C., Fanti, S. (2016): PET tracers beyond FDG in prostate cancer. *Semin Nucl med*, 46(6), 507-521

Seifert, R. (2018). *Pharmakokinetik*. In: *Basiswissen Pharmakologie*. Springer-Lehrbuch. Springer, Berlin, Heidelberg.

Silver, D. A., Pellicer, I., Fair, W. R., Heston, W. D., Cordon-Cardo, C. (1997): Prostate-specific membrane antigen expression in normal and malignant human tissues. *Clin Cancer Res*, 3(1), 81–85

Sokoloff, R. L., Norton, K. C., Gasior, C. L., Marker, K. M., Grauer, L. S. (2000): A dual-monoclonal sandwich assay for prostate-specific membrane antigen: levels in tissues, seminal fluid and urine. *Prostate*, 43(2), 150–157

- Sprute, K., Kramer, V., Koerber, S. A., Meneses, M., Fernandez, R., Soza-Ried, C., Eiber, M., Weber, W. A., Rauscher, I., Rahbar, K., Schaefers, M., Watabe, T., Uemura, M., Naka, S., Nonomura, N., Hatazawa, J., Schwab, C., Schütz, V., Hohenfellner, M., Holland-Letz, T., Debus, J., Kratochwil, C., Amaral, H., Choyke, P. L., Haberkorn, U., Sandoval, C., Giesel, F. L. (2021): Diagnostic Accuracy of 18F-PSMA-1007 PET/CT Imaging for Lymph Node Staging of Prostate Carcinoma in Primary and Biochemical Recurrence. *J Nucl Med*, 62(2), 208–213
- Tai, S., Sun, Y., Squires, J. M., Zhang, H., Oh, W. K., Liang, C. Z., Huang, J. (2011): PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma. *Prostate*, 71(15), 1668-1679
- Umbehrr, M. H., Müntener, M., Hany, T., Sulser, T., Bachmann, L. M. (2013): The role of 11C-choline and 18F-fluorocholine positron emission tomography (PET) and PET/CT in prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur Urol*, 64(1), 106-117
- Umbricht, C. A., Benešová, M., Schibli, R., Müller, C. (2018): Preclinical Development of Novel PSMA-Targeting Radioligands: Modulation of Albumin-Binding Properties To Improve Prostate Cancer Therapy. *Mol Pharm*, 15(6), 2297-2306
- Verburg, F. A., Pfister, D., Heidenreich, A., Vogt, A., Drude, N. I., Vöö, S., Mottaghy, F. M., Behrendt, F. F. (2016): Extent of disease in recurrent prostate cancer determined by [(68)Ga]PSMA-HBED-CC PET/CT in relation to PSA levels, PSA doubling time and Gleason score. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 43(3), 397-403
- von Eyben, F. E., Kairemo, K., Paller, C., Hoffmann, M. A., Paganelli, G., Virgolini, I., Roviello, G. (2021): 177Lu-PSMA Radioligand Therapy Is Favorable as Third-Line Treatment of Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. A Systematic Review and Network Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Biomedicines*, 9(8), 1042
- Wang, Y., Shao, G., Wu, J., Cui, C., Zang, S., Qiu, F., Jia, R., Wang, Z., Wang, F. (2018): Preparation of 68Ga-PSMA-11 with a Synthesis Module for Micro PET-CT Imaging of PSMA Expression during Prostate Cancer Progression. *Contrast Media Mol Imaging*, 2018, 8046541
- Wester, H. J., Schottelius, M. (2019): PSMA-Targeted Radiopharmaceuticals for Imaging and Therapy. *Semin Nucl Med*, 49(4), 302–312
- Wirtz, M., Schmidt, A., Schottelius, M., Robu, S., Günther, T., Schwaiger, M., Wester, H. J. (2018): Synthesis and in vitro and in vivo evaluation of urea-based PSMA inhibitors with increased lipophilicity. *EJNMMI Res*, 8(1), 84

Wittekind, C. (2017): TNM Klassifikation maligner Tumoren, 8. Auflage, Wiley-VCH Verlag, Weinheim

Xiang, J., Yan, H., Li, J., Wang, X., Chen, H., Zheng, X. (2019): Transperineal versus transrectal prostate biopsy in the diagnosis of prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *World J Surg Oncol*, 17(1), 31

Zhao, L. Y., Mao, X. P., Chao, K. Y., Guo, S. J., Qiu, S. P. (2012): Prostate-specific membrane antigen can promote in vivo osseous metastasis of prostate cancer cells in mice. *Braz J Med Biol Res*, 45(8), 737–745

7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1 Strukturformel der Small-molecule-Inhibitoren PSMA-11 und PSMA-617. Das Glutamat-Urea-Lysin-Motiv (blaue Fläche) und die jeweilige komplexbildende Einheit (rote Fläche) sind markiert (umgezeichnet nach Wester und Schottelius 2019).....	8
Abbildung 2 Plasmaproteinbindung des Tracers ^{68}Ga -PSMA-11 bei PSMA-11-Konzentrationen zwischen 1,5 $\mu\text{g}/\text{GBq}$ und 1 mg/GBq . Mit steigender Konzentration des Präkursors zeigte sich eine leichte Abnahme der Plasmaproteinbindung. Die Wachstumskurve zeigt einen exponentiellen Verlauf mit einem korrigierten $R^2=0,87$. Logarithmische Darstellung, Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung, $n=14$	27
Abbildung 3 Uptake von ^{68}Ga -PSMA-11 pro mg Zellprotein in LNCaP- ($n=9$) und PC-3-Zellen ($n=7$).	28
Abbildung 4 LNCaP-Zell-Uptake des Tracers ^{68}Ga -PSMA-11 bei PSMA-11-Konzentrationen zwischen 1,5 $\mu\text{g}/\text{GBq}$ und 1 mg/GBq . Der Zell-Uptake nimmt mit steigenden Konzentrationen des kalten Präkursors deutlich ab. Die Kurvenanpassung ergibt eine exponentielle Kurve mit einem korrigierten $R^2=0,907$. Logarithmische Darstellung, Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung.....	29
Abbildung 5 Mittelwerte der Plasmaproteinbindung (—■—) und des LNCaP-Zell-Uptakes (—◆—) von ^{68}Ga -PSMA-11 im Verhältnis zum jeweiligen Mittelwert der Standardkonzentration (10 μg PSMA-11/ GBq). Bei steigenden PSMA-11-Konzentrationen nimmt der Zell-Uptake deutlich stärker als die Plasmaproteinbindung ab. Logarithmische Darstellung.....	30
Abbildung 6 Verhältnis von Zell-Uptake zu Plasmaproteinbindung des Tracers ^{68}Ga -PSMA-11 für verschiedene Präkursor-Konzentrationen. Das Verhältnis nimmt mit steigender PSMA-11-Konzentration deutlich ab. Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung.	31
Abbildung 7 Plasmaproteinbindung des Tracers ^{177}Lu -PSMA-617 bei Präkursor-Konzentrationen zwischen 5 $\mu\text{g}/\text{GBq}$ und 50 $\mu\text{g}/\text{GBq}$. Bei den verschiedenen PSMA-617-Konzentrationen liegt die Plasmaproteinbindung im gleichen Bereich. Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung, $n=10$	32
Abbildung 8 LNCaP-Zell-Uptake des Radiopharmakons ^{177}Lu -PSMA-617 bei Präkursor-Konzentrationen zwischen 5 $\mu\text{g}/\text{GBq}$ und 50 $\mu\text{g}/\text{GBq}$. Mit steigender PSMA-617-Konzentration nimmt der Zell-Uptake ab. Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung, $n=9$	33

Tabelle 1: Vereinfachte Darstellung der TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms (nach Wittekind 2017).....	3
Tabelle 2: Übersicht ausgewählter Plasmaproteine und ihrer Molekülmassen (umgezeichnet nach Schmidt und Lang 2007)	13
Tabelle 3: Geräte.....	16
Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien	17
Tabelle 5: Chemikalien	18
Tabelle 6: Vergleich der Small-molecule-Inhibitoren PSMA-11 und PSMA-617 (nach: Eder et al. 2014, Afshar-Oromieh et al. 2015, Mandiwana et al. 2021).....	19
Tabelle 7: Radiochemische Reinheit und Aktivitätsmenge von 10 ml ^{68}Ga -PSMA-11 nach der Synthese mit 1 μg und 10 μg PSMA-11	26
Tabelle 8: Radiochemische Reinheit von ^{177}Lu -PSMA-11 nach der Synthese mit 5 μg und 10 μg PSMA-617 pro GBq	26

Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die durch ihre Unterstützung zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke zuallererst meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Zuhayra, an den ich mich jederzeit mit Fragen und Problemen wenden konnte. Die persönliche Betreuung und sein Engagement haben maßgeblich zur Fertigstellung meiner Dissertation beigetragen.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitenden der Radiochemie/Radiopharmazie der Klinik für Nuklearmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holsteins, Campus Kiel, die mir die Radiopharmaka zur Verfügung stellten.

Besonders möchte ich mich bei Frau Dr. Zhao für die Bereitstellung der Zelllinien, den wissenschaftlichen Austausch sowie die Anleitung im Labor bedanken.

Außerdem danke ich Herrn Helm, ohne dessen Hilfe die Durchführung der Experimente im Labor nicht möglich gewesen wäre.

Mein großer Dank gilt meinen Eltern - sowohl für die finanzielle Unterstützung, als auch die Geduld und den Zuspruch, diese Arbeit fertig zu stellen.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Frau Birte bedanken. Auch ihr hat meine Forschungsarbeit und das Verfassen der Dissertation viele Nerven gekostet, dennoch stand sie immer hinter mir.

Veröffentlichungen

Nithack, N., Zhao, Y., Helm, A., Marx, M., Lützen, U., Zuhayra, M. (2021): Die Veränderung der Präkursor-Konzentration ist keine effektive Möglichkeit zur Steigerung der Wirksamkeit der Radioligandentherapie mit Lu-177-PSMA-617. Nuklearmedizin. Nuclear medicine, 60(02), 178.

EANM 2021 – 34th Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine, 20. – 23. Oktober 2021.

Oral e-Poster Presentation: „The importance of precursor concentration for PET diagnostics with Ga-68-PSMA-11“

Autoren: N. Nithack, Y. Zhao, A. Helm, U. Lützen, M. Zuhayra

59. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Nuklearmedizin, 14. – 17. April 2021.

ePoster: „Die Bedeutung der Präkursor-Konzentration für PET-Diagnostik mit Ga-68-PSMA-11 und Radioligandentherapie mit Lu-177-PSMA-617“

Autoren: N. Nithack, Y. Zhao, A. Helm, M. Marx, U. Lützen, M. Zuhayra