

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Georg Ertl

**In vitro und in vivo Evaluation von Iodmetomidat-Carbonsäureamid-Derivaten
für die Diagnostik und Therapie von Nebennierenkarzinomen**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
David Paul Michelmann
aus Gelnhausen

Würzburg, Januar 2017

Referentin: Prof. Dr. Stefanie Hahner
Koreferent: Prof. Dr. Thomas Wurmb
Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Oktober 2017

Der Promovend ist Arzt.

In Erinnerung an Julian Bach

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 Die Nebennieren	1
1.1.1 Anatomie	1
1.1.2 Physiologie	2
1.1.3 Steroidsynthese	3
1.1.3.1 Aldosteronsynthese	4
1.1.3.2 Kortisolsynthese	4
1.1.3.3 Sexualhormonsynthese	5
1.1.3.4 Sekretion von Katecholaminen	5
1.2 Das Nebennierenkarzinom	5
1.2.1 Epidemiologie, Einteilung und Klinik	5
1.2.2 Diagnostische Grundlagen	7
1.2.3 Therapeutische Grundlagen und Prognose	8
1.3 Etomidat	9
1.3.1 Etomidat und seine Wirkung auf die Nebennierenrinde	9
1.3.2 Die Entwicklung von Iodmetomidat aus Etomidat	10
1.4 Iodmetomidat	10
1.4.1 Einsatz von Iodmetomidat in der Diagnostik des Nebennierenkarzinoms	10
1.4.2 Einsatz von Iodmetomidat in der Therapie des Nebennierenkarzinoms	11
1.5 Fragestellung dieser Arbeit	12
2. MATERIAL UND METHODEN	14
2.1 Material	14
2.1.1 Materialien	15
2.1.2 Schlauch zur intravenösen Applikation	17
2.1.3 Chemikalien	17
2.1.4 Puffer, Medien und Lösungen	18
2.1.5 Radiotracer	18
2.1.6 Kits	19

2.1.7	Zelllinie	19
2.1.8	Versuchstiere	19
2.2	Physikalisch-chemische Methoden	19
2.2.1	Herstellung der Radiotracer	19
2.2.2	Hochdruckflüssigkeitschromatographie	21
2.3	Zellbiologische Methoden	21
2.3.1	Kultivierung der Zellen	21
2.3.2	Zell-Uptake-Versuch	21
2.3.3	Zell-Uptake-Versuch mit Blockierung durch Etomidat	22
2.3.4	Mitochondrien-Isolation	22
2.4	Tierexperimentelle Methoden	23
2.4.1	Biodistributionsversuch	23
2.5	Berechnungen	27
2.5.1	Berechnung des Zell-Uptakes	27
2.5.2	Berechnung der Aktivität in den Fraktionen der Mitochondrien-Isolation	27
2.5.3	Berechnung der relativen Organdosis	27
2.6	Statistische Analysen	28
3.	ERGEBNISSE	29
3.1	Zeitliche Akkumulation der Radiotracer in humanen NCI H295-Zellen	31
3.1.1	Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Zell-Uptake-Versuche	34
3.2	Bestimmung der spezifischen Anreicherung von [¹²⁵ I]IMTO und [¹²⁵ I]IMAZA in humanen NCI H295-Zellen	34
3.3	Anreicherung der Radiotracer in zellulären Subfraktionen	36
3.3.1	Ergebnisse der Mitochondrien-Isolation in Relation zur Referenz IMTO	37
3.4	Biodistribution der Radiotracer in männlichen CD1-Mäusen	37
3.4.1	Ergebnisse der Biodistribution absolut und in Relation zu IMTO	44
3.5	Heilversuch mit [¹³¹ I]IMAZA	45

4. DISKUSSION	47
4.1 Carbonsäureamide als metabolisch stabilere IMTO-Derivate	47
4.2 Aufnahme der Carbonsäureamide in humane NCI H295-Zellen	48
4.3 Spezifität der Aufnahme von [¹²⁵ I]IMAZA in humane NCI H295-Zellen	50
4.4 Aufnahme von [¹²⁵ I]IMAZA in humane NCI H295-Zellen	51
4.5 Biodistribution der IMTO-Derivate in männlichen CD1-Mäusen	53
4.6 Einsatzmöglichkeiten von [^{123/131} I]IMAZA in der Diagnostik und Therapie von Nebennierenkarzinomen	60
5. ZUSAMMENFASSUNG	62
6. ANHANG	64
Toxizitätsstudie	
Ames-Test	
Biometrische Planung im Tierversuchsantrag	
7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	66
8. TABELLENVERZEICHNIS	67
9. LITERATURVERZEICHNIS	68
DANKSAGUNG	
LEBENS LAUF	

Abkürzungsverzeichnis

ACC	Adrenocortical Carcinoma
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ATCC	American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA
Bq	Becquerel
cm	Zentimeter
CO₂	Kohlenstoffdioxid
cpm	counts per minute
CRH	Corticotropin-Releasing Hormone
CT	Computertomographie
CYP11A1	Cholesterin-Monooxygenase
CYP11B1	11 β -Hydroxylase
CYP11B2	Aldosteron-Synthase
CYP17	17-Alpha-Hydroxylase
CYP21A2	21-Hydroxylase
°C	Grad Celsius
DHEA	Dihydroepiandrosteron
DHEA-S	Dihydroepiandrosteron-Sulfat
EDP	Chemotherapie-Schema (Etoposid, Doxorubicin, Cisplatin)
ee	Enantiomerenreinheit
ENSAT	European Network for the Study of Adrenal Tumors
ETO	Etomidat
FCS	Fetal Calf Serum
FDG	18-Fluor-2-Deoxy-D-Glukose
g	Gramm
G	Giga
GABA	γ -Aminobuttersäure
Gy	Gray
HDL	High Density Lipoprotein
HE	Hämatoxylin-Eosin
HL	Hinterlappen der Hypophyse
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HWZ	Halbwertszeit

IC₅₀	Konzentration einer Substanz, die für eine 50 %-ige Enzyminhibition notwendig ist
IEMA	(R)-1-[1-(4-Iodphenyl)ethyl]-1H-imidazol-5-carbonsäure-ethylmethyramid, Ethylmethyramid
IMAZA	(R)-1-[1-(4-Iodphenyl)ethyl]-1H-imidazol-5-carbonsäure-azetidinyramid, Azetidinyramid
IMTO	(R)-1-[1-(4-Iodphenyl)ethyl]-1H-imidazol-5-carbonsäure-methylester, Iodmetomidat
kg	Kilogramm
l	Liter
LD₅₀	Letale Dosis 50: Dosis, bei der 50 % der Applikationen tödlich enden
LDL	Low Density Lipoprotein
log	Logarithmus
M	Metastasen (TNM-Klassifikation), Mega
m	Milli, Meter
MRT	Magnetresonanztomographie
MTA	Medizinisch-technische(r) Angestellte(r)
MTO	[¹¹ C]Metomidat
μl	Mikroliter
μM	Mikromol
n	Anzahl der durchgeführten Versuche
N	Nodus, Lymphknotenstatus (TNM-Klassifikation)
NaCl	Natriumchlorid
NCI	National Cancer Institute
NIH	National Institutes of Health
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (=MRT)
NN	Nebenniere
p	Signifikanzwert
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Polyethylen
PET	Positronenemissionstomographie
POMC	Proopiomelanocortin
RECIST	Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
rpm	Rounds per Minute
RSI	Rapid Sequence Induction (Notfallnarkoseeinleitung)

SD	Standardabweichung
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
T	Tumor (TNM-Klassifikation)
THDOC	Tetrahydro-11-Deoxykortikosteron
UICC	Union Internationale contre le Cancer
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VL	Vorderlappen der Hypophyse
Vol%	Volumenprozent
WHO	World Health Organisation
%ID/g	prozentuale Injektionsdosis pro Gramm Organ

1. Einleitung

1.1 Die Nebennieren

1.1.1 Anatomie

Die flachen Nebennieren liegen im Nierenlager des Retroperitonealraums jeweils am Oberpol kappenartig den Nieren auf. Die rechte Nebenniere ist dabei dreieckig, die linke Nebenniere annähernd halbmondförmig geformt. Beide Nebennieren sind von einer bindegewebigen Kapsel umgeben und liegen etwa auf Höhe der 11. bzw. 12. Rippe, wobei die rechte Nebenniere meist etwas kaudalwärts liegt. Ihr Gewicht beträgt beim Erwachsenen 5 bis 15 g; bei Säuglingen sind sie in Relation zum Körpergewicht relativ schwerer (1) und lassen sich sonographisch im Vergleich zum Erwachsenen noch sehr gut darstellen (Abbildung 1).

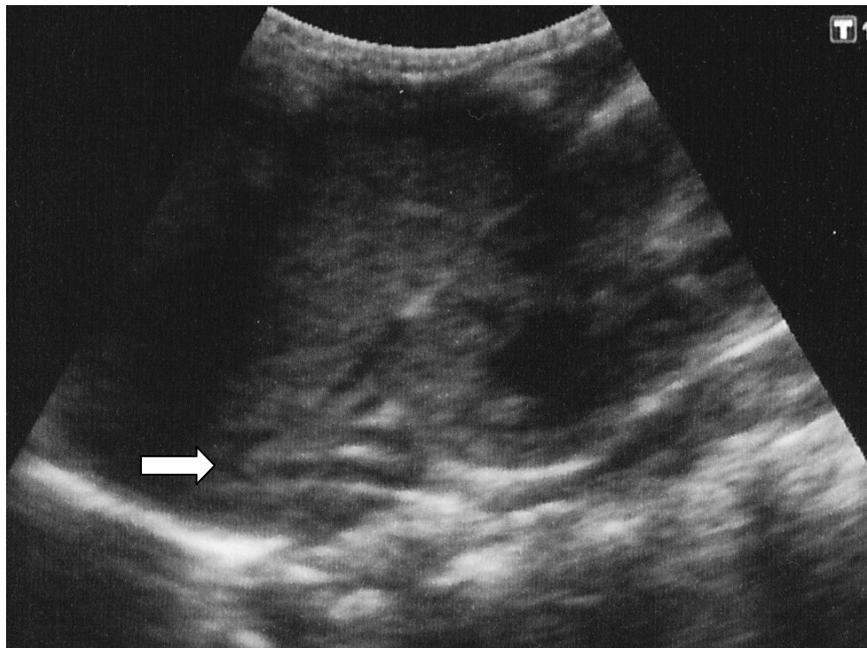


Abbildung 1 Sonographisches Bild einer rechten Nebenniere

Zu sehen ist die rechte, dreieckige Nebenniere (Pfeil) am Oberpol der Niere eines drei Tage alten männlichen Neugeborenen.

Quelle: eigene sonographische Aufnahme

Makroskopisch lassen sich Rinde und Mark voneinander unterscheiden. Die Nebennierenrinde produziert Steroidhormone und lässt sich funktionsabhängig sowie histologisch in drei Zonen unterteilen: Die außen gelegene Zona glomerulosa, in welcher Mineralkortikoide produziert werden, die sich daran anschließende Zona fasciculata, dem Bildungsort der Glukokortikoide und die innen gelegene Zona reticularis, in welcher schwach wirksame Androgene synthetisiert werden (2). Es folgt das Nebennierenmark im Inneren der Nebenniere; hier werden Katecholamine freigesetzt.

1.1.2 Physiologie

Die Produktion der Hormone der Nebenniere unterliegt dem Einfluss von Hypothalamus und Hypophyse sowie dem Wasser- und Elektrolythaushalt. Ferner sorgen afferente sympathische Neurone für eine bedarfsgerechte Freisetzung von Katecholaminen. Akute Anforderungen, Stress, Krankheiten sowie die zirkadiane Rhythmik haben einen Einfluss auf die Synthese und Sekretion adrener Hormone (3).

Das Peptidhormon ACTH, welches in den basophilen Zellen des Hypophysenvorderlappens aus der Vorstufe POMC entsteht, führt als Agonist am Melanocortinrezeptor-2 in der Nebennierenrinde zur Produktion von Glukokortikoiden (Kortisol), Mineralokortikoiden (Aldosteron) und Sexualhormonen (Androgene, Östrogene und deren Vorläufersteroid).

Die Sekretion von ACTH wiederum wird durch eine Freisetzung von CRH aus dem Nucleus paraventricularis des Hypothalamus reguliert (4, 5). Die Sekretion von CRH unterliegt hierbei einer zirkadianen Rhythmik (6) (Abbildung 2).

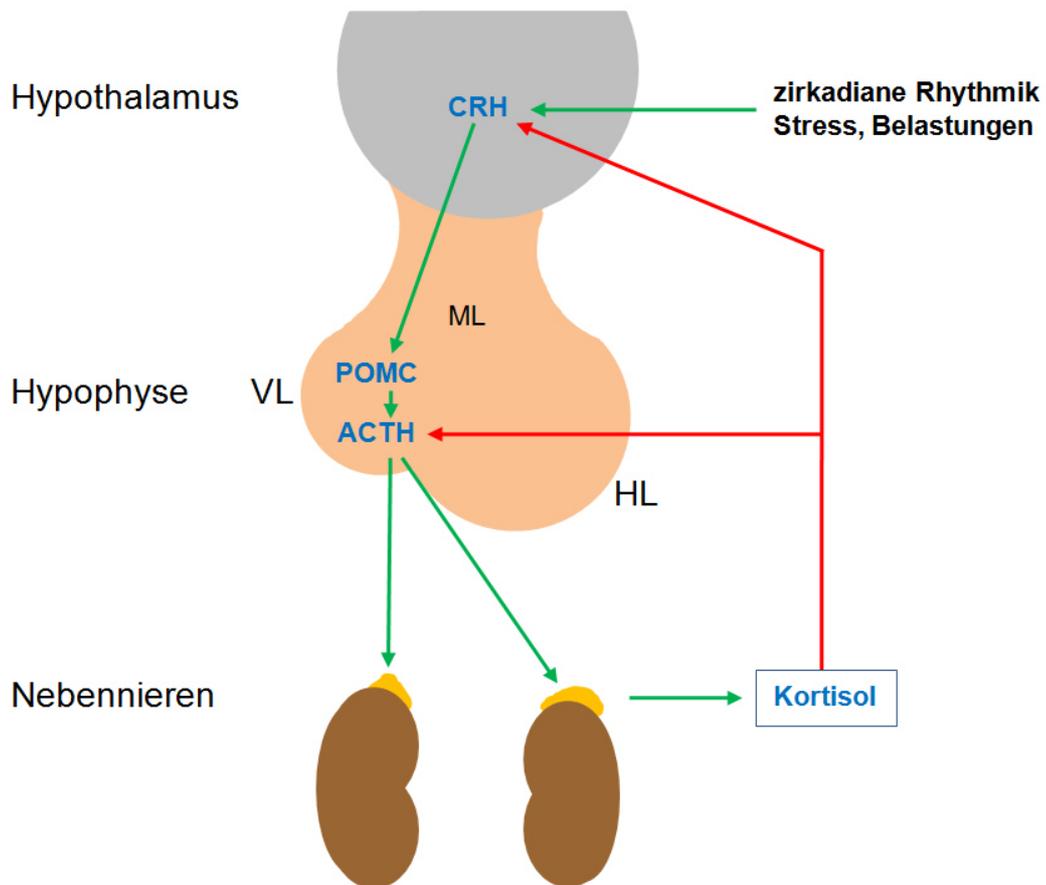


Abbildung 2 Physiologische Steuerung der adrenalen Kortisolsekretion

Dargestellt ist der schematische Regelkreis der Kortisolsekretion.

VL: Hypophysenvorderlappen, ML: Hypophysenmittellappen

HL: Hypophysenhinterlappen

grüner Pfeil: Stimulation, roter Pfeil: Inhibition

Quelle: eigene Grafik

Die Zellen des Nebennierenmarks entstammen der Neuralleiste und gehören zum sympathischen Nervensystem. Sie werden von präganglionären sympathischen Neuronen innerviert, was zur Sekretion von Adrenalin und Noradrenalin führt (2).

1.1.3 Steroidsynthese

Cholesterin ist das Substrat, aus welchem alle Steroidhormone entstehen. Die Nebennierenrinde kann entweder im Blut zirkulierendes Cholesterin aufnehmen oder es de novo synthetisieren. Bei dem aus dem Blut aufgenommenen Cholesterin handelt es sich in erster Linie um LDL und HDL (7, 8).

Unterschiedliche Cytochrom P450-Enzyme sind bei der Steroidsynthese beteiligt; als Substrate dienen dabei die Kohlenstoffatome der vier Ringstrukturen des Cholesterins (9). Aus dem Cholesterin entstehen anschließend über verschiedene im Folgenden beschriebene Wege Mineralokortikoide, Kortisol und Sexualhormone (siehe Abbildung 3).

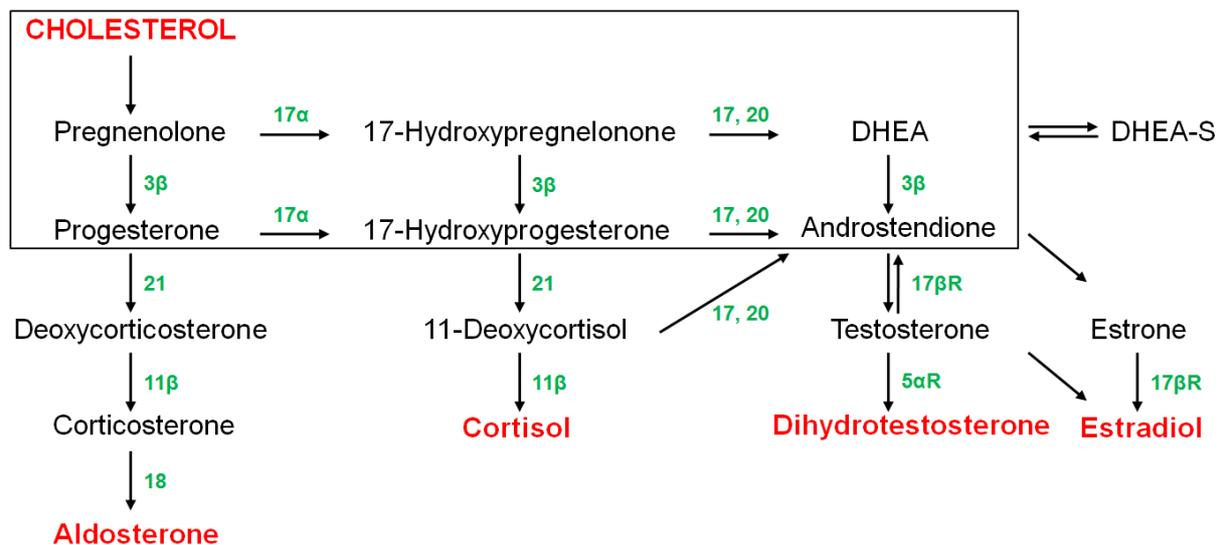


Abbildung 3 Steroidbiosynthese

Schema der Steroidbiosynthese, modifiziert nach (9)

3β: 3β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase, 21: 21-Hydroxylase, 11β: 11β-Hydroxylase

18: Aldosteronsynthase, 17α: 17α-Hydroxylase, 17, 20: Lyase

17βR: Testosteron-17β-Dehydrogenase, 5αR: 5α-Reduktase

1.1.3.1 Aldosteronsynthese

Nachdem aus Cholesterin über Pregnenolon Progesteron entstanden ist, katalysiert die 21-Hydroxylase (CYP21A2, P450c21) mithilfe der 11β-Hydroxylase (CYP11B1, P450c11) über Deoxycorticosteron als Zwischenprodukt das Corticosteron, aus welchem schließlich mithilfe der Aldosteron-Synthase (CYP11B2, P450c11as) Aldosteron entsteht (10, 11).

1.1.3.2 Kortisolsynthese

Zunächst erfolgt durch die Cholesterin-Monooxygenase (CYP11A1) die Synthese von Pregnenolon in den Mitochondrien. Pregnenolon wird anschließend außerhalb

der Mitochondrien nach enzymatischer Verarbeitung durch die 17-Alpha-Hydroxylase (CYP17, P450c17) sowie die 3-Beta-Hydroxysteroiddehydrogenase zu 17-Hydroxyprogesteron umgewandelt. Mithilfe der 21-Hydroxylase (CYP21A2, P450c21) sowie der 11 β -Hydroxylase (CYP11B1, P450c11) entsteht schließlich Kortisol (10, 11).

1.1.3.3 Sexualhormonsynthese

Neben der Synthese von Aldosteron und Kortisol entstehen in der Zona reticularis außerdem über verschiedene Zwischenprodukte die Sexualhormone Dihydrotestosteron und Estradiol (12).

1.1.3.4 Sekretion von Katecholaminen

Die Zellen des Nebennierenmarks setzen nach Stimulation durch präganglionäre sympathische Neurone die Stresshormone Adrenalin und Noradrenalin frei (2).

1.2 Das Nebennierenkarzinom

Neben endokrin aktiven und inaktiven Nebennierenadenomen, Zysten, Metastasen und dem Phäochromozytom gehört das Nebennierenkarzinom zu den möglichen Differenzialdiagnosen von Nebennierenraumforderungen. Sie können insbesondere bei fehlender hormoneller Aktivität auch zufällig als sogenannte Inzidentalome im Rahmen der diagnostischen Bildgebung aufgrund einer anderen Erkrankung beziehungsweise ihres Hormonexzesses entdeckt werden.

1.2.1 Epidemiologie, Einteilung und Klinik

Raumforderungen der Nebenniere werden funktionell in hormonproduzierende oder silente beziehungsweise nach ihrer Dignität in benigne oder maligne Raumforderungen eingeteilt.

Der Großteil der adrenalen Raumforderungen ist benigne und hormoninaktiv und wird oftmals zufällig im Rahmen einer abdominalen Bildgebung entdeckt. Hierzu zählen in 15 % der Fälle benigne hormonproduzierende Adenome, die unter

anderem das Cushing-Syndrom, den primären Hyperaldosteronismus oder eine Virilisierung auslösen können. 85 % der Inzidentalome hingegen produzieren keine Hormone (13).

Adrenokortikale Karzinome (ACC) sind sehr selten und können alle Schichten der Nebennierenrinde betreffen (14). Sie treten mit einer Inzidenz von etwa 1 bis 2 pro 1 Millionen Einwohner und Jahr auf. Frauen sind 1,5 - 2,5 mal so häufig betroffen wie Männer (15). Die Einteilung erfolgt je nach Größe und Metastasierungsstatus des Tumors üblicherweise nach der ENSAT-Klassifikation in Stadien von I bis IV (16) (Tabelle 2). Die Einteilung nach UICC/WHO (Union Internationale contre le Cancer/World Health Organisation) ergab eine schlechtere prognostische Differenzierung und wird daher selten verwendet (16a) (Tabelle 1).

PRIMÄR-TUMOR (T)	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Hinweis auf Primärtumor
T1	Tumor ≤ 5 cm, keine extraadrenale Tumorinvasion
T2	Tumor > 5 cm, keine extraadrenale Tumorinvasion
T3	Tumor jeder Größe, lokal infiltrierend, keine Invasion benachbarter Organe
T4	Tumor jeder Größe, Invasion benachbarter Organe
REGIONÄRE LYMPHKNOTEN (N)	
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Kein Befall regionärer Lymphknoten
N1	Befall regionärer Lymphknoten
FERNMETASTASEN (M)	
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 1 **TNM-Klassifikation des Nebennierenkarzinoms**
 Modifiziert nach (17)

Stadium I	T1, N0, M0, Tumor
Stadium II	T2, N0, M0, Tumor
Stadium III	T1-2, N1, M0 T3-4, N0/1, M0
Stadium IV	Jedes M1

Tabelle 2 ENSAT-Klassifikation des Nebennierenkarzinoms

Modifiziert nach (16)

Klinisch können sich Nebennierenkarzinome in etwa drei Viertel der Fälle durch einen Hormonexzess mit Symptomen wie beispielsweise einem Cushing-Syndrom oder einer Virilisierung präsentieren. Etwa die Hälfte der adrenokortikalen Karzinome wird erst aufgrund von Symptomen der lokalen oder disseminierten Tumorausbreitung sowie unspezifischen Symptomen wie beispielsweise Abdominalschmerzen, Gewichtsverlust und Müdigkeit klinisch auffällig. Die Pathogenese der Nebennierenkarzinome ist bisher nicht vollständig geklärt. Es gibt jedoch bei einem Teil der Patienten Hinweise auf ursächliche genetische Veränderungen wie die Keimbahnmutation im Tumorsuppressor-Gen TP53 (18). Die Prognose mit einer krankheitsfreien 5-Jahres-Überlebensrate von etwa 30 % ist schlecht (19).

1.2.2 Diagnostische Grundlagen

Zu den Grundlagen der Diagnostik gehören neben Anamnese, körperlicher Untersuchung und Sonographie aufgrund der Möglichkeit einer Hormonproduktion des Tumors die Evaluation des Hormonhaushaltes. Hierzu sollten das morgendliche Serum-Kortisol nach 1 mg Dexamethason am Vorabend, DHEA-S, Androstendion, Testosteron, 17-OH-Progesteron, Aldosteron, Renin sowie das Serum-Estradiol bei Männern und postmenopausalen Frauen bestimmt werden (20, 21).

Daneben können radiologische Methoden wie die Dignitätsbeurteilung in der nativen Computertomographie (CT) mittels Bestimmung der Hounsfield-Einheiten (< 10 deuten auf einen fetthaltigen benignen Prozess, beispielsweise ein Nebennierenadenom, hin) bei der Unterscheidung adrenaler Befunde helfen. Petersen et al. zeigten, dass adrenokortikale Karzinome in der nativen

Computertomographie mindestens Werte von 21 Hounsfield-Einheiten hatten. Die Bestimmung des Kontrastmittel-Wash-Outs (Karzinome: langsamer Kontrastmittel-Wash-Out, Adenome: rascher Kontrastmittel-Wash-Out) oder die T1-beziehungsweise T2-gewichtete Magnetresonanztomographie (MRT) können außerdem dabei helfen, morphologisch Adenome von adrenokortikalen Karzinomen zu unterscheiden (22).

Daneben kann die FDG- oder MTO-Positronenemissionstomographie aufgrund ihrer hohen Sensitivität bei der Detektion maligner Läsionen hilfreich sein (23-25).

1.2.3 Therapeutische Grundlagen und Prognose

Aktuell stellt die komplette chirurgische Resektion die einzige potentiell kurative Therapie dar (26), sie wird durch die NIH (National Institutes of Health) aufgrund zunehmender Malignitätswahrscheinlichkeit bei zunehmender Tumorgroße ab einer Größe der adrenalen Läsion von 6 cm empfohlen. Diese sollte in einem spezialisierten Referenzzentrum durch erfahrene Experten erfolgen, um eine inkomplette Resektion mit daraus folgender deutlich schlechterer Prognose zu verhindern (27). Da Nebennierenkarzinome häufig lymphogen metastasieren, sollte aufgrund einer signifikanten Risikoreduktion für ein Tumorrezidiv nach Resektion eine Lymphadenektomie erfolgen (28). In der 2016 veröffentlichten Leitlinie der europäischen Gesellschaft für Endokrinologie wird in Abhängigkeit von Tumorgroße, Resektionsstatus und histologischem Befund eine Tumorbettbestrahlung erwogen, da das Nebennierenkarzinom entgegen anders lautender Berichte nicht als strahlenresistent zu betrachten ist (29).

Obwohl eine Resektion im Stadium I bis III technisch möglich ist, ist sie in den meisten Fällen nicht kurativ, da bereits im Stadium I okkulte Mikrometastasen vorhanden sein können (30-33). Für die Empfehlung zu einer operativen Therapie im fortgeschrittenen Stadium liegen widersprüchliche Daten vor (34, 35). Sinnvoll kann ein operatives Vorgehen im Stadium IV bei Hormonexzess sein oder wenn Aussicht auf eine vollständige Entfernung der bildgebend darstellbaren Tumorerkrankungen besteht (36). Die neoadjuvante Chemotherapie ist bislang kein Standard. Eine Chemotherapie mit dem adrenokortikolytischen Medikament Mitotane hat bei Patienten mit adrenokortikalem Karzinom einen positiven Effekt. So findet es sowohl adjuvant als auch beim primär inoperablen Nebennierenkarzinom sowie im Falle

eines Rezidivs alleine oder in Kombination mit anderen Chemotherapeutika (zum Beispiel EDP: Etoposid, Doxorubicin und Cisplatin oder Streptozotocin) Anwendung (36). Die Chemotherapie mit Mitotane führt zu einer Verlängerung sowohl des rezidivfreien Überlebens als auch der Gesamtüberlebenszeit nach kompletter Resektion (37). Bislang wurden vor allem retrospektive Studien zur Anwendung von Mitotane durchgeführt, hierbei gab es keine wegweisenden Hinweise darauf, ob Mitotane allein oder seine Kombination mit anderen Chemotherapeutika Vorteile hat (38). Die Etablierung einer Targeted Therapy (zum Beispiel mit Antikörpern gegen VEGF) oder die Anwendung anderer Chemotherapeutika (zum Beispiel Capecitabin) ist Gegenstand aktueller Forschung (39). Eine Strahlentherapie bot bislang lediglich im Rahmen palliativer Symptomkontrolle oder zur Schmerzbekämpfung bei Knochenmetastasen Vorteile (40). Neuere retrospektive Datenauswertungen weisen jedoch darauf hin, dass die Bestrahlung des Tumorbetts die Rate an Lokalrezidiven zumindest vermindern kann (Fassnacht et al. 2016, 40a).

Trotz der bislang verfügbaren Therapieoptionen und einer in den letzten 20 Jahren dank der Einführung von Mitotane gestiegenen Überlebenszeit ist die Gesamtprognose mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 45 bis 60 % im frühen Stadium sowie von 10 bis 25 % im fortgeschrittenen Stadium weiterhin schlecht (41-44).

1.3 Etomidat

1.3.1 Etomidat und seine Wirkungen auf die Nebennierenrinde

Das Imidazol-Derivat Etomidat ist ein intravenös zu verabreichendes Hypnotikum, welches hauptsächlich zur Intubation bei Notfallpatienten im Rahmen der sogenannten Rapid Sequence Induction (RSI) Anwendung findet. Etomidat bindet dabei direkt am GABA-Rezeptor, blockiert so die Erregung und ermöglicht die Einleitung einer Narkose. Es wird in einer Dosierung von 0,3 mg/kg Körpergewicht verabreicht. Die Wirkung tritt nach etwa 15 bis 45 Sekunden ein und hält zwischen drei und 12 Minuten an (45).

Zu seinen Nebenwirkungen gehört unter Anderem eine bereits durch einmalige Gabe ausgelöste sekundäre Nebennierenrindeninsuffizienz, welche durch eine reversible Suppression der Nebennierenrinde bewirkt wird (46, 47). Diese wird durch eine von

Etomidat ausgelöste reversible Blockierung der 11- β -Hydroxylase ausgelöst, welche für die Konvertierung von 11-Deoxykortisol zu Kortisol zuständig ist. Dieser Effekt hält dabei nicht länger als 12 bis 24 Stunden an und der Kortisolspiegel fällt durch eine gegenregulatorisch gesteigerte ACTH-Freisetzung nicht unter den physiologischen Spiegel (48). Bei langfristiger Anwendung lassen sich jedoch erniedrigte Plasmakortisolspiegel nachweisen. Dies gilt ebenso für das dem Etomidat verwandte Anästhetikum Metomidat (49), welches als inhärente Verunreinigung von Etomidat im Europäischen Arzneibuch gelistet ist und in der Veterinärmedizin Verwendung fand (50).

1.3.2 Die Entwicklung von Iodmetomidat aus Etomidat

Da Etomidat und dessen Abkömmling Metomidat potente Inhibitoren der adrenokortikalen 11- β -Hydroxylase darstellen (51), wurde mit Iodmetomidat (IMTO, chemisch: $[^{123/131}\text{I}](\text{R})\text{-1-[1-(4-Iodphenyl)ethyl]-1H-imidazol-5-carbonsäuremethyl-ester}$, IMTO) ein Derivat des Metomidats entwickelt, an welchem zusätzlich Iod gebunden ist, das wiederum radioaktiv markiert wurde. IMTO bindet dabei mit hoher Affinität an die Nebennierenmembran von Ratten (52) und eignet sich daher für die Diagnostik und Therapie adrenaler Läsionen.

1.4 Iodmetomidat

1.4.1 Einsatz von Iodmetomidat in der Diagnostik des Nebennierenkarzinoms

Zur spezifischen nichtinvasiven Diagnostik adrenokortikalen Gewebes finden seit über 40 Jahren radioaktiv markierte Norcholesterol-Derivate Anwendung (53). Blair et al. zeigten bereits 1971, dass Radiocholesterol-Analoga in Serum-LDL aufgenommen werden und sich, hauptsächlich über den LDL-Rezeptor aufgenommen, in adrenokortikalen Zellen anreichern. Hohe Lipoprotein-Serumspiegel und bestimmte Medikamente, beispielweise orale Kontrazeptiva, interferieren mit der Aufnahme. Radiocholesterol fand Anwendung zur Lokalisationsbestimmung und Differenzierung adrenaler Läsionen. In der Zelle wird Radiocholesterol verestert, es unterliegt dem enterohepatischen Kreislauf, was zu erhöhter Hintergrundaktivität im Darm führte, sodass nach Alternativen gesucht

wurde. Es folgte die Entdeckung von Metomidat, dem Methyl-Ester des Etomidates, welches als GABA_A-Rezeptor-Agonist fungiert (49, 50). Hieraus folgte die Entwicklung von Iodmetomidat (IMTO), welches *in vitro* mit hoher Affinität an die Nebennierenmembran bindet (54).

Zur Evaluation der Spezifität der Bindung an adrenale Enzyme wurde die Inhibition von CYP11B1 (11β-Hydroxylase) und CYP11B2 (Aldosteron-Synthase) an Y1-CYP11B1- sowie Y1-CYP11B2-Zellen getestet.

Anhand tierexperimenteller Ergebnisse konnten Hinweise auf ein exzellentes Potential von radioaktiv markiertem IMTO in der bildgebenden Diagnostik gezeigt werden.

Auch die bislang durchgeführten Untersuchungen im SPECT/CT zeigten aufgrund einer geringen Hintergrundaktivität und der Anreicherung des Tracers in adrenokortikalem Gewebe ebenfalls die potentiellen Möglichkeiten eines Einsatzes von [¹²³I]Iodmetomidat ([¹²³I]IMTO) in der Diagnostik adrener Läsionen. [¹²³I]IMTO konnte bislang bei mehreren Patienten zur Diagnostik eingesetzt werden. Hierbei konnten bei allen Patienten 60 Minuten nach Injektion sowohl beide Nebennieren als auch das Nebennierenkarzinomgewebe inklusive der zuvor in der Computertomographie nachgewiesenen Metastasen detektiert werden. Nach vier bis sechs Stunden war die Abgrenzung des adrenalen Gewebes am besten, nach 24 Stunden ließ sich ausschließlich Anreicherung im Nebennierengewebe nachweisen (55, 56). Insgesamt wurde IMTO bis heute bei mehr als 180 Patienten mit adrener Läsionen eingesetzt.

1.4.2 Einsatz von IMTO in der Therapie des Nebennierenkarzinoms

Ein bekannter therapeutischer Ansatz beispielsweise im Rahmen einer autoimmunen Schilddrüsenüberfunktion oder bestimmter Schilddrüsenkarzinome ist die Radioiodtherapie. Hierbei wird den betroffenen Patienten radioaktiv markiertes Iod-131 verabreicht, welches sich ausschließlich im Schilddrüsengewebe anreichert und aufgrund der β-Strahlung zu einer gezielten Zerstörung des gesamten Schilddrüsengewebes führt. Konsekutiv wird eine bestehende pathologische Schilddrüsenüberfunktion beendet. Die Anwendung ist insgesamt nebenwirkungsarm und wird seit etwa 1940 durchgeführt (57). Eine vielversprechende Behandlungsoption ist der Einsatz radioaktiv markierten Iodmetomidats, welches

spezifisch an adrenale Enzyme bindet (Abschnitt 1.4.1) und durch seine freigesetzte β -Strahlung vorhandenes Nebennierengewebe einschließlich eventueller Metastasen zerstören kann. Dies könnte schlussendlich eine Verbesserung der Prognose behandelter Patienten erwirken.

Bislang konnte IMTO in mehreren Therapiezyklen an Patienten im metastasierten Stadium im Rahmen von Heilversuchen temporär erfolgreich in der Therapie des Nebennierenkarzinoms eingesetzt werden. Nach erfolgter Gabe von 1,6 bis 20 GBq [^{131}I]Iodmetomidat ([^{131}I]IMTO) in ein bis drei Zyklen zeigte sich in einem Fall ein Rückgang der Tumorgöße um 51 % (partial response), in fünf Fällen weder eine Zunahme noch eine Abnahme der Tumorgöße (stable disease) sowie in vier Fällen eine Zunahme der Tumorgöße (progressive disease) (58).

1.5 Fragestellung dieser Arbeit

Betrachtet man die bisherigen Möglichkeiten, die in der Diagnostik und Therapie des Nebennierenkarzinoms zum Einsatz kommen, so lässt sich erkennen, dass sowohl diagnostisch als auch therapeutisch Verbesserungspotential besteht und die Prognose für Betroffene trotz aller bisherigen Bemühungen weiterhin sehr ungünstig ist. Mit Einführung der Substanz [$^{123/131}\text{I}$]IMTO konnte eine weitere, vielversprechende Option in der Diagnostik und Therapie adrener Karzinome geschaffen werden.

Unveröffentlichte Studien haben gezeigt, dass eine rasche metabolische Inaktivierung von [^{123}I]IMTO jedoch die effektiven Zielorgandosen reduziert. Aufgrund zusätzlich möglicher radiotoxischer Nebenwirkungen ergeben sich sowohl diagnostische als auch aufgrund verbesserungsfähiger Zielorgandosen therapeutische Grenzen. Hypothetisch könnte die Entwicklung neuer, metabolisch stabilerer IMTO-Derivate mit höherer Avidität an die Zielenzyme CYP11B1 und CYP11B2 sowohl eine genauere Diagnostik als auch eine Verbesserung der Therapie und somit der Prognose des Nebennierenkarzinoms ermöglichen.

Es ergeben sich daher für diese Arbeit folgende Fragen:

- Stellen Iodmetomidat-Carbonsäureamide metabolisch stabilere Iodmetomidat-Derivate dar?
- Wie lässt sich das biochemische Verhalten der Substanzgruppe *in vitro* hinsichtlich intrazellulärer Aufnahme, subzellulärer Distribution und Bindung an Zielstrukturen charakterisieren?
- Wie stellen sich die *in vivo* Distribution und die Verweildauer im Zielgewebe im Vergleich zu Iodmetomidat dar?
- Kann anhand der präklinischen Daten bereits eine Aussage hinsichtlich einer möglichen Verbesserung von Diagnostik und Therapie adrenokortikaler Tumore durch die neuen Substanzklassen getroffen werden?

2. Material und Methoden

Soweit nicht anders vermerkt, wurden die angewendeten Methoden in Zusammenarbeit mit Lukas Nannen, Doktorand der Medizinischen Klinik I - Abteilung Endokrinologie mitentwickelt und in Kooperation angewendet.

Die Methodik des Zell-Uptake-Versuches (2.3.2) wurde in Kooperation mit Sabine Gabor, Doktorandin der Medizinischen Klinik I - Abteilung Endokrinologie und Lukas Nannen in Anlehnung an die bereits von der Klinik für Nuklearmedizin der Universitätsklinik Würzburg verwendeten Methodik weiterentwickelt. Die Ergebnisse des IMTO-Uptakes wurden gemeinsam erzielt und als Referenz-Grundlage zum Vergleich der neu gewonnenen Ergebnisse verwendet.

2.1 Material

Alle beschriebenen Materialien, Chemikalien, Kits und Medien wurden von folgenden Firmen bezogen:

A. Hartenstein - Acros Organics - ATCC - B.Braun - Becton, Charles River
Dickinson & Co. Ltd. - Berthold - Cellstar -Dispomed Witt OHG - Dräger
Eppendorf - GE Healthcare - Greiner - Heraeus - Hettich Zentrifugen
Janssen-Cilag - Huger - Medline Industries- QIAGEN - SARSTEDT
SIGMA-ALDRICH - Tesa - The Baker Company - Thermo Fisher Scientific

Die verwendeten Medien wurden im Labor der Medizinischen Klinik I (Universitätsklinikum Würzburg) angesetzt.

2.1.1 Materialien

Material für zellbiologische Methoden:

Zellkulturflaschen T175, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Pipettenspitzen 10 µl farblos, Fa. SARSTEDT, Nürnberg
Pipettenspitzen 100 µl gelb, Fa. SARSTEDT, Nürnberg
Pipettenspitzen 1000 µl blau ohne Filter, Fa. SARSTEDT, Nürnberg
Pipetten Eppendorf Research - 10, 200 und 1000 µl, Fa. Eppendorf AG, Hamburg
Serologische Pipetten CELLSTAR® 5 ml, Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Serologische Pipetten CELLSTAR® 10 ml, Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Serologische Pipetten CELLSTAR® 25 ml, Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Serologische Pipetten CELLSTAR® 50 ml, Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Pipettierhilfe Pipetboy, Fa. Integra Biosciences, Fernwald
Handstückzähler
Zählkammer 0,0025 mm ² ; 0,100 mm Tiefe + Deckgläschen
Zentrifuge Hettich ROTANTA/RPC, Fa. Hettich Zentrifugen Tuttlingen
Zentrifuge MIKRO 200R, Fa. Hettich Zentrifugen Tuttlingen
Eppendorf Reaktionsgefäße 1,5 ml + 2,0 ml, Fa. Eppendorf AG, Hamburg
Szintillationsfläschchen PE 20 ml, Fa. A. Hartenstein, Würzburg, Best.-Nr. SZFL
Stoppuhr, Fa. Huger, No. SKT338N
Abzug SterilGARD® III Advance, Fa. The Baker Company, Sanford
Brutschrank, Fa. Thermo Fisher Scientific, Langenselbold

Tabelle 3 **Verwendetes Material für die zellbiologischen Versuche**

Material für Biodistributionsversuche:

Chirurgisches Besteck, bestehend aus:
Schere spitz
Schere stumpf
Pinzette anatomisch, chirurgisch und spitz
Einmalspritze TBC 1 ml, Fa. Dispomed Witt OHG, Gelnhausen, REF 22006
Einmalkanüle BD Microlance 3 - 20 G x 3/4" - Nr. 1 (0,9 mm x 40 mm) Fa. Becton, Dickinson & Co. Ltd., Ireland, REF 301300
Insulinspritze Omnican® 40 - 30 G x 1/2" (0,3 mm x 12 mm), Fa. B.Braun, Melsungen, REF 9161627
Rundbodenröhrchen 5 ml, Fa. BD Falcon, LOT 2051487
Abzug Heraeus Instruments HS 12, Fa. Heraeus, Hanau, Order No. 51012197
Dräger Vapor 19.1 für Isoflurane, Fa. Drägerwerk AG, Lübeck
Vernichtungsbeutel PP, Fa. A.Hartenstein, Würzburg, Best.-Nr. VB20
Einmalhandschuhe SensiCarelce® - Größen S, M, L, Fa. Medline Industries, Mundelein, Illinois, REF 486802
y-Counter
Kontaminationsmonitor Berthold LB 124 SCINT-300, Fa. Berthold, Bad Wildbad
Feinwaage

Tabelle 4 Verwendetes Material für die Biodistributionsversuche

Material zur Herstellung des Schlauches zur intravenösen Applikation:

Polyethylenschlauch I.D. 0,38 mm, Intramedic - Fa. BD, Sparks, Bestell-Nr. 427405, LOT 0243147
Einmalkanüle BD Microlance 3 - 27 G x 3/4" - Nr. 20 (0,4 mm x 19 mm) Fa. Becton, Dickinson & Co. Ltd., Ireland, REF 302200, LOT 120208
Tesa®-Vielzweckkleber, Fa. Tesa, Hamburg, 57080-00002

**Tabelle 5 Material zur Herstellung des Schlauches zur intravenösen
Radiotracerapplikation**

2.1.2 Schlauch zur intravenösen Applikation

Nach Vorgaben der Nuklearmedizin der Universitätsklinik Würzburg, welche diese Methode bereits zur intravenösen Applikation verwendete, erfolgte die Herstellung in Eigenarbeit (siehe Abbildung 4):

1. Es wurde ein circa 3 cm langes PE-Schlauchstück verwendet.
2. Unter Zuhilfenahme einer Pean-Klemme wurde die Metallspitze einer Kanüle Größe 20 durch mehrfaches Biegen im 90°-Winkel von ihrem Spritzenkonus getrennt.
3. Nun wurde die Metallspitze circa 2 mm in den Schlauch eingeführt, anschließend der Übergang von Spitze zu Schlauch mit Klebstoff benetzt und die Metallspitze weitere 2 mm in den Schlauch eingeführt. Diese Vorgehensweise verhindert ein Verkleben des Schlauchlumens. Vor der Applikation wurde der Schlauch mit der bei der Herstellung des jeweiligen Tracers verwendeten Pufferlösung zur Prüfung der Durchgängigkeit gespült.

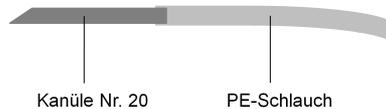


Abbildung 4 Skizze des verwendeten Schlauchs zur intravenösen Applikation

2.1.3 Chemikalien

Natriumchlorid 0,9%, Fa. B.Braun, Melsungen
Trypanblau, Fa. SIGMA-Aldrich, Taufkirchen, REF T8154
Ethanol absolut, Fa. SIGMA-Aldrich, Taufkirchen, REF 32205
Ethanol 5%, Fa. SIGMA-Aldrich, Taufkirche, REF 32205
Destilliertes Wasser, Fa. B.Braun, Melsungen

Tabelle 6 Verwendete Chemikalien

2.1.4 Puffer, Medien und Lösungen

RPMI-1640-Nährmedium, Fa. SIGMA-ALDRICH, Lot # RNBC0790
Human-Insulin, Fa. SIGMA-ALDRICH, Lot # SLBB6101
Humanes Transferrin, Fa. SIGMA-ALDRICH, Lot # SLBB3488V
Natriumselenit, Fa. Sigma-Aldrich, 214485 Sigma
Fetales Kälberserum, Fa. PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Etomidat-Lösung, Fa. Janssen-Cilag, Neuss, Germany, 2 mg/ml
Isofluran CP [®] -Narkosegas, Fa. CP-Pharma Burgdorf, Ch.-B.: B19B12A
Terralin [®] liquid-Desinfektionslösung, Fa. Schülke & Mayr, Norderstedt, LOT 1189401
COUNT-OFF Surface Cleaner, Fa. PerkinElmer, Boston, Reorder No. 6NE942T, LOT 121-060901
Neo-Kodan farblos, Fa. Schülke & Mayr, Norderstedt, Zul.-Nr. 6545.00.00/13064-D, PZN - 3652281
Phosphat Buffered Saline, Fa. Sigma, REF T8154
Tween 80, Fa. Acros Organics, Geel (Belgien), Art. 278632500

Tabelle 7 **Verwendete Puffer, Medien und Lösungen**

2.1.5 Radiotracer

<u>¹²⁵I</u> IMAZA, Lösungsmittel: PBS / 5% Ethanol / 1% Tween 80
<u>¹²⁵I</u> HEMA, Lösungsmittel: PBS / 5% Ethanol / 1% Tween 80
<u>¹²⁵I</u> IMTO, Lösungsmittel: PBS / 5% Ethanol / 1% Tween 80

Tabelle 8 **In den Versuchen verwendete Radiotracer**

2.1.6 Kits

<u>Mitochondria Isolation Kit, Fa. QIAGEN:</u>
Lysis-Puffer: Lot 142349773
Disruption-Puffer: Lot 142349580
Mitochondria Purification-Puffer: Lot 142345632
Mitochondria Storage-Puffer: Lot 142346449
Proteaseinhibitor: Lot 142350199

Tabelle 9 **Verwendete Kits**

2.1.7 Zelllinie

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden ausschließlich humane NCI H295-Zellen (Nebennierenkarzinomzellen) verwendet, welche von ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) bezogen wurden.

2.1.8 Versuchstiere

Für die durchgeführten Experimente verwendeten wir ausschließlich von Charles River bezogene, männliche CD1-Mäuse im Alter zwischen sechs und acht Wochen, welche zum Zeitpunkt der Biodistributionsversuche ein durchschnittliches Gewicht von $33,9 \pm 3,9$ g hatten.

2.2 Physikalisch-chemische Methoden

2.2.1 Herstellung der Radiotracer

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Carbonsäureamide wurden von Dr. Andreas Schirbel (Klinik für Nuklearmedizin, Universitätsklinikum Würzburg) in der auf der nächsten Seite abgebildeten Mehrstufensynthese synthetisiert. Hierzu wurde ausgehend von kommerziell erhältlichem R-(+)-1-Phenylethylamin **1** zunächst eine Schutzgruppe eingefügt, danach der Phenylring in der 4-Position iodiert und die Schutzgruppe wieder abgespalten. Anschließend erfolgte der Aufbau des

Imidazolrings über mehrere Stufen. Obwohl es sich um eine mehrstufige Reaktionssequenz handelt, ist die Gesamtsynthese innerhalb von zwei Wochen durchführbar, da eine aufwändige Isolierung fast aller Zwischenstufen nicht erforderlich ist. Mit dieser Methode konnten äußerst kostengünstig deutlich mehr als 50 Gramm der Referenzverbindung Iodmetomidat **2** mit sehr hoher Enantiomerenreinheit ($ee > 99\%$) synthetisiert werden (Abbildung 5). Anschließend wurde der Methylester von Iodmetomidat **2** verseift und die freigesetzte Carbonsäure zu den in dieser Arbeit untersuchten Carbonsäureamiden umgesetzt. Diese wurden mittels $^1\text{H-NMR}$ und teilweise mittels Massenspektrometrie eindeutig charakterisiert. Von diesen „kalten“ Substanzen wurden zunächst die IC_{50} -Werte bestimmt. Die vielversprechendsten Carbonsäureamide wurden zunächst durch eine Palladium-katalysierte Reaktion in die entsprechenden Trimethylstannylverbindungen überführt, welche als Precursor für die nachfolgenden Radioiodierungen dienen (Abbildung 6). Die nahezu masselosen Tracer wurden mittels Radio-HPLC aufgereinigt und mit Hilfe ihrer „kalten“ Referenzverbindungen identifiziert.

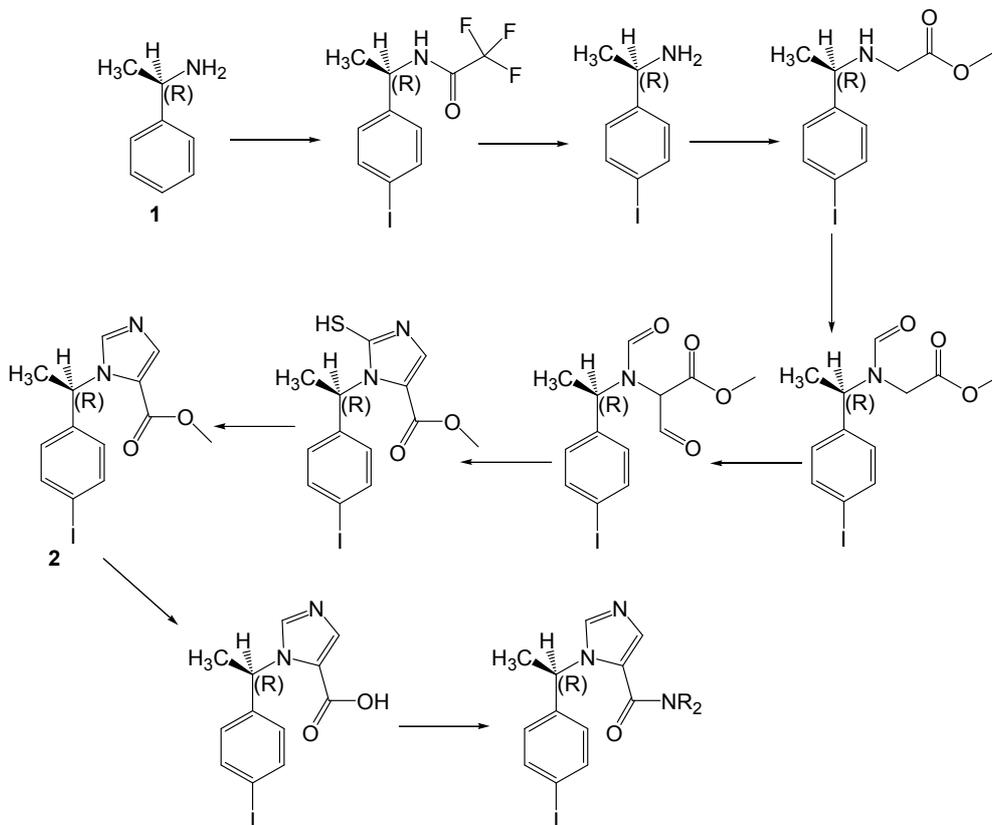


Abbildung 5 Schematische Darstellung der Mehrstufigensynthese der Radioaktivtracer
Dargestellt sind die Schritte der Synthese der Carbonsäureamide.
1: R-(+)-1-Phenylethylamin, 2: Iodmetomidat

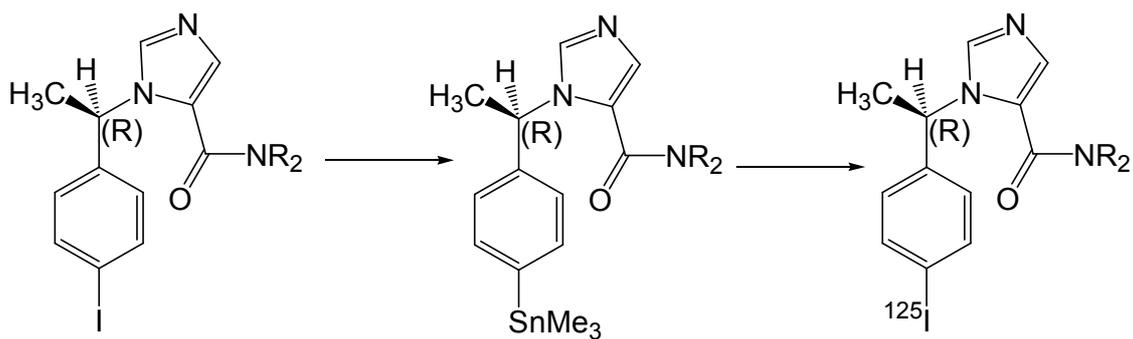


Abbildung 6 Schematische Darstellung der Radioiodierung

2.2.2 Hochdruckflüssigchromatographie

Die Messung der Stabilität der Radioaktivtracer erfolgte nach Inkubation mit humanen Lebermikrosomen mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) in Zusammenarbeit mit Martina Zink, MTA der Medizinischen Klinik I - Abteilung Endokrinologie der Universitätsklinik Würzburg.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung der Zellen

Die verwendeten NCI H295-Zellen wurden bei 37°C und 95% Luftfeuchtigkeit mit 5 % Kohlendioxid (CO₂) inkubiert. Als Nährmedium diente RPMI 1640-Medium, wobei 500 ml RPMI 1640-Medium 50 ml fetales Kälberserum (FCS), 250 µl Insulin (10 mg/ml), 650 µl Natriumselenit (4 µg/ml) sowie 5 ml Transferrin (10 mg/ml) zugesetzt wurden. Eine Verdopplung der vorhandenen Zellen wurde unter den angegebenen Bedingungen nach etwa 72 bis 96 Stunden erreicht.

2.3.2 Zell-Uptake-Versuch

Für den Versuch wurden je Ansatz (n) 5 Millionen NCI H295 Zellen in 5 ml FCS-freiem Medium verwendet. Die Zellsuspension wurde in einem 25 ml-Glasgefäß bei 37°C mit 0,1 MBq des Radioaktivtracers für 1, 15, 30 und 45 Minuten inkubiert. Direkt nach Zugabe des Tracers wurden die Zellen resuspendiert und sofort 250 µl der

Zellsuspension entnommen (Dauer der Prozedur: ca. 1 Minute), in ein 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und bei 4°C mit 4000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert (Zeitpunkt "1"). Der Überstand wurde abgenommen und zusammen mit den Überständen des zweimaligen Waschens des Zellpellets mit je 250 µl eiskalter Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) aufbewahrt. Die Proben der folgenden Zeitpunkte wurden nach Entnahme aus dem Inkubationsgefäß zunächst für 5 Minuten auf Eis gelagert und anschließend bei 4°C mit 4000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Die Waschschrte für die weiteren Zeitpunkte erfolgten analog dem Vorgehen am Zeitpunkt "1". Es erfolgte die Abnahme der 100 %-Werte für die Zellsuspension sowie einer mit dem Tracer versetzten Kontrolllösung ohne Zellen (jeweils 250 µl). Anschließend wurde der Uptake ebenso für die Kontrolllösung ohne Zellen durchgeführt. Alle im beschriebenen Versuch gewonnenen Proben wurden im γ -Counter gemessen und die Ergebnisse nach den in Abschnitt 2.5.3 beschriebenen Formeln zur Berechnung verwendet.

2.3.3 Zell-Uptake-Versuch mit Blockierung durch Etomidat

Die Durchführung erfolgte analog zum normalen Uptake-Versuch. Zeitgleich zur Zugabe des Radioaktivtracers wurden 0 µM, 1 µM, 10 µM sowie 100 µM nicht radioaktiv markiertes Etomidat zur Zellsuspension pipettiert. Nach Inkubation für 30 Minuten bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % Kohlendioxid (CO₂) erfolgte die Entnahme der Zellsuspensionsprobe analog zum normalen Zell-Uptake-Versuch (2.3.2).

2.3.4 Mitochondrien-Isolation

Die Isolation der Mitochondrien erfolgte analog den Vorgaben des Herstellers (QIAGEN) nach dem Qproteome Mitochondria Isolation Handbook 12/2007. Wir verwendeten 10 Millionen Zellen pro Ansatz (n), diese wurden nach Abzentrifugieren des Nährmediums (500 x g, 4 Minuten, 37°C) mit 7 ml FCS-freiem Medium versetzt. Pro Ansatz wurde 0,1 MBq des entsprechenden Tracers hinzupipettiert und die Zellen für 15, 30 beziehungsweise 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurden folgende Versuchsschritte durchgeführt:

1. Abzentrifugieren (500 x g, 10 Minuten, 4°C) und Verwerfen des Überstandes
2. Waschen der Zellen mit 5 ml NaCl 0,9 %-Lösung

Nach Erhalt des gewaschenen Zellpellets erfolgten die Schritte analog dem Versuchsprotokoll des Herstellers. Folgende Änderungen des Protokolls wurden von uns vorgenommen:

1. Verwendung von 10 Millionen Zellen pro Ansatz (Schritt 1)
2. Das Resuspendieren mit eiskaltem Disruptions-Puffer erfolgte mit einer Insulinspritze durch zehnmaliges Aspirieren und schnellem Ausspritzen in das Versuchsgefäß (Schritt 6).
3. Die Gewinnung der Mitochondrien-Fraktion erfolgte nach der vom Hersteller beschriebenen Methode zur Gewinnung einer sehr reinen Fraktion (Schritt 10b); die Schritte 10a und 11a wurden dementsprechend nicht durchgeführt.
4. Die Durchführung des weiteren Protokolls erfolgte analog der Beschreibung bis Schritt 15b. Hierbei bildete sich bei der verwendeten Anzahl an Zellen bereits ein deutliches Pellet, sodass auf eine Wiederholung von Schritt 15b verzichtet werden konnte.
5. Auf das Resuspendieren des Mitochondrien-Pellets konnte im Fall der reinen Isolation nach Inkubation mit Radioaktivtracer verzichtet werden, da dies keinen Einfluss auf die absolute Radioaktivität (cpm) im Versuchsgefäß hatte.

Anschließend erfolgte die Messung der Proben im γ -Counter.

2.4 Tierexperimentelle Methoden

Die durchgeführten tierexperimentellen Versuche wurden stets unter Anleitung und Aufsicht durch die Tierversuchsleiterin durchgeführt.

Tierversuchsgenehmigung der Regierung von Unterfranken: Az. 55.2-2331.01-93/10

2.4.1 Biodistributionsversuch

Für die Injektion in die Maus verwendeten wir pro Maus 100 μ l des zu untersuchenden Radioaktivtracers. Nach Vorbereitung der Applikationsspritze

erfolgte zunächst die Messung der absoluten Counts (cpm) dieser 100 µl im y-Counter; jener Wert galt später als Grundlage zur Berechnung (Referenzwert) der tatsächlich in die Maus gelangten Menge des Tracers. Zu den 100 µl wurde zusätzlich jeweils 60 µl Pufferlösung pipettiert, um die tatsächliche Injektionsmenge zu erhöhen, da sich bei den verwendeten Mengen der Totraum in Spritze und Kanüle sonst zu sehr bemerkbar machen und insgesamt wenig Tracer in die Maus gelangen würde. Der Tracer wurde nach folgenden Schritten appliziert:

1. Vorsichtiges Pipettieren der fertigen Injektionslösung in die Totraumspritze unter langsamem Zurückziehen des Spritzenstempels. Die Pipettenspitze sowie das Gefäß mit der Injektionslösung wurden asserviert, um später im y-Counter die zurückgebliebene Radiotracermenge messen zu können und so die tatsächlich injizierte Aktivitätsmenge (cpm) berechnen zu können.
2. Aufsetzen einer Kanüle Nr. 20, vorsichtiges Entlüften unter langsamem Drücken des Spritzenstempels, sodass keine Injektionslösung verlorenging, gegebenenfalls austretende Flüssigkeit mit einem Einmaltupfer auffangen, um die verlorengegangene Menge später vom Referenzwert abziehen zu können.
3. Die Maus wurde in eine mit Isofluran durchflutete Plastikkiste gesetzt und narkotisiert. Zu Beginn hat sich hierbei ein Inhalationsgemisch von circa 2 Vol.% Isofluran und 1,5 l Sauerstoff/Minute sowie 1,5 l Luft/Minute als günstig erwiesen, um ein relativ zügiges Einschlafen der Maus zu gewährleisten, die durch Isofluran bei zu hohen Inhalationsdosen einsetzende Atemdepression aber zu vermeiden. Nach Einschlafen der Maus (Dauer ca. 2 Minuten) wurde diese mit dem Kopf in eine Inhalationsmaske gelegt und auf die Seite gedreht. Die Inhalationsdosis von Isofluran wird nun auf 1,25 - 1,75 Vol.% reduziert, da so bereits eine ausreichende Narkosetiefe erreicht und eine Überdosierung vermieden werden konnte.
4. Die Maus wurde während des Injektionsvorgangs auf einer Wärmeplatte (Temperatur 37°C) gelagert, um einem Wärmeverlust beziehungsweise einer Zentralisation des Kreislaufs mit dadurch erschwerten Punktionsbedingungen der Schwanzvene entgegenzuwirken.
5. Nun erfolgte die Darstellung einer der beiden lateralen Schwanzvenen. Eine Desinfektion des Schwanzes mit ungefärbtem Kodan erwies sich hierbei als

- günstig, um die Schwanzvene hervortreten zu lassen und einer Infektion vorzubeugen.
6. Der Schlauch zur intravenösen Applikation wurde mit dem entsprechenden Puffer zur Sicherung der Durchgängigkeit vor Verwendung entlüftet. Die Injektionsvorrichtung wurde mit einer Pinzette gegriffen und die Haut über der zu punktierenden Vene im möglichst flachen Winkel oberflächlich unter der Haut punktiert, um ein Durchstechen der Vene zu verhindern. Die Kanüle wurde vorsichtig vorgeschoben, bis Blut in den Schlauch zurücklief (positive Rücklaufprobe). Gegebenenfalls konnte eine Palpation des proximalen Schwanzendes zu einem erhöhten venösen Rückfluss von Blut in den Schlauch zur Verifizierung der intravenösen Lage erfolgen. Zusätzlich erfolgte ein vorsichtiges Spülen des in der Vene liegenden Schlauches mit reiner Pufferlösung, wobei auf umliegendes Gewebe geachtet wurde, um die intravenöse Lage der Injektionsvorrichtung zu verifizieren. Bei Abblasen des Gewebes oder Auftreten von Paravasaten erfolgte eine neue Punktion, da sonst der Verlust von Tracer in das Gewebe zu groß und eine regelrechte intravenöse Applikation nicht möglich war.
 7. Bei korrekter Lage wurde ein Einmaltupfer unter die Punktionsstelle des Schwanzes gelegt, um eventuell aus dem Schwanz austretenden Radiotracer auffangen und diesen gegebenenfalls vom Referenzwert abziehen zu können.
 8. Nach Injektion des Radiotracers wurde der Zeitpunkt dokumentiert und Injektionsvorrichtung, Spritze, Kanüle und Tupfer sowie Kanülenkappe zur späteren Rückmessung im γ -Counter asserviert.
 9. Es folgte die Inkubation des Radiotracers in der Maus für 15, 30, 120 und 240 Minuten. Nach Ablauf der entsprechenden Zeit erfolgte das Töten der Maus mit einer Überdosis Isofluran.
 10. Vor der Präparation wurde das Gewicht der Maus bestimmt.
 11. Die Maus wurde in Rückenlage an den Extremitäten auf einer Styropor-Platte fixiert und Abdomen, Thorax und Hals mit Desinfektionsmittel benetzt, um Haare der Maus an der Haut zu binden und so Irritationen bei der Präparation zu vermeiden und diese zu erleichtern.
 12. Die befeuchtete Haut wurde über dem Abdomen angehoben und durch Querinzision mittels Schere eröffnet und vom darunter liegenden

Muskelgewebe entfernt. Nach Anheben der Abdominalmuskulatur erfolgte eine Querlaparotomie und Längsthorakotomie weit nach kranial mit Freilegung der Schilddrüse. Zur Gewinnung von Blut wurden anschließend zunächst die Herzkammern punktiert und durch Aspiration mit einer Insulinspritze Blut gewonnen. Eine Gewinnung aus Gefäßen erwies sich hierbei als ungünstig, da so nur geringe Mengen gewonnen werden konnten. Es folgte die vorsichtige Darstellung der Harnblase, ohne diese zu verletzen oder zu palpieren. Durch Blasenpunktion mittels Insulinspritze oder gegebenenfalls nach bereits erfolgter Blasenentleerung direkt am Urethraostium des Penis erfolgte die Uringewinnung. Nach Entleerung wurde direkt die Entnahme der Harnblase vorgenommen, da diese nach Entleerung regelhaft kollabierte und weniger leicht darstellbar war. Auf eine vollständige Entleerung wurde hierbei geachtet, um einer Messung von Restharn statt des eigentlichen Blasengewebes vorzubeugen.

13. Anschließend erfolgte die Präparation und Entnahme folgender Organbeziehungsweise Gewebeprobe:
Herz, Lunge, Schilddrüse, Leber, Milz, Magen, Darm, Schwanz, Muskel, Knochen, Gehirn und Hoden.
14. Bei der Präparation der Nieren musste besonders auf die am oberen Pol der Nieren liegenden, bei der Maus etwa 1 x 1 mm großen Nebennieren geachtet werden, da diese bei etwas älteren Tieren im bereits deutlich ausgeprägten perirenal Fettgewebe lokalisiert und deutlich schwerer darstellbar waren. Zunächst erfolgte die vollständige Entfernung der Nieren mitsamt perirenalem Fettgewebe aus der Maus, um anschließend die noch im Oberpol des perirenal Fettdepots befindlichen Nebennieren zu gewinnen. Die Nebennieren wurden aufgrund ihres sehr geringen Gewichtes vollständig, aber vorsichtig von ihrem sie umgebenden Fettgewebe befreit und asserviert.
15. Das absolute Gewicht aller gewonnenen Proben wurde gemessen. Lediglich die Nebennieren wurden zunächst für mindestens zwei Wochen bei -20°C tiefgefroren und anschließend gewogen, um Schwankungen aufgrund des unterschiedlichen Wassergehaltes der einzelnen Nebennieren zu minimieren.

16. Die Messung der Aktivität (cpm) aller gewonnenen Proben einschließlich der Nebennieren sowie der asservierten zur Injektion verwendeten Materialien im γ -Counter wurde direkt nach Probengewinnung durchgeführt.

2.5 Berechnungen

2.5.1 Berechnung des Zell-Uptakes

Die Berechnung des Uptakes ohne und mit Blockierung durch Etomidat erfolgte mittels folgendem Quotienten:

$$\frac{\text{Absolute Aktivität (cpm)}}{100 \text{ \%-Wert (cpm)}}$$

2.5.2 Berechnung der Aktivität in den Fraktionen der Mitochondrien-Isolation

Die Berechnung der Aktivität in den einzelnen Zellkompartimenten erfolgte mittels folgendem Quotienten:

$$\frac{\text{Absolute Aktivität der einzelnen Fraktion (cpm)}}{\text{Summe der Aktivität aller Fraktionen (cpm)}}$$

2.5.3 Berechnung der relativen Organdosis

Zur Berechnung der relativen Organdosis bei dem Biodistributionsversuch wurde folgender Quotient verwendet:

$$\frac{\text{Absoluter Wert Organ (cpm)} \times 100}{(\text{Referenzwert} - \text{Abzug}) \times \text{Probengewicht}}$$

Abzug: verwendetes Material, welches mit Radiotracer in Berührung kam und das den Referenzwert insgesamt mindert (Spritze, Kanüle, Schlauch zur intravenösen Applikation, Pipettenspitze, Tupfer, Ausgangsgefäß mit Tracer)

2.6 Statistische Analysen

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Mittels Varianzanalyse (Kruskal-Wallis-Test) wurden die jeweils gewonnenen Ergebnisse der HPLC-Stabilitätstests, der Zell-Uptake-Versuche, der Mitochondrien-Isolationsversuche sowie der Biodistributionsversuche miteinander verglichen. Hierbei wurden voneinander unabhängige Versuche mit jeweils mindestens Triplikaten ($n=3$) durchgeführt.

Bezüglich der Biodistributionsversuche an CD1-Mäusen wurde unter Zugrundelegung der bereits vorhandenen Daten für eine Power von 80% unter der Annahme des Fehlers 1. Art von 0,05 eine Fallzahl von 5 Tieren berechnet. Die Misserfolgsrate bezüglich einer sicheren i. v.-Tracerapplikation liegt erfahrungsgemäß bei ca. 10%. Daher wurde für eine ausreichend gute Abschätzung von Traceruptake und Pharmakokinetik, die letztendlich auch der Dosisberechnung für den Einsatz in klinischen Studien zugrunde gelegt wird, der Einsatz von 6 Tieren pro Substanz als notwendig erachtet.

3. Ergebnisse

Im Vorfeld der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche war die Messung der Stabilität der Radiotracer nach Inkubation mit humanen Lebermikrosomen mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) gemessen worden. Insgesamt wurden im Rahmen der Dissertation von Martin Ries unter Mitwirkung der MTAs Heike Göbel und Martina Zink sowie Dipl.-Ing. Bernd Hallmann von 80 unterschiedlichen Verbindungen die IC_{50} -Werte sowie die metabolische Stabilität bestimmt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Schwerpunkt auf die Carbonsäureamidderivate gelegt, da sie aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften (siehe Abschnitt 4.1) eine hohe metabolische Stabilität in Aussicht stellten.

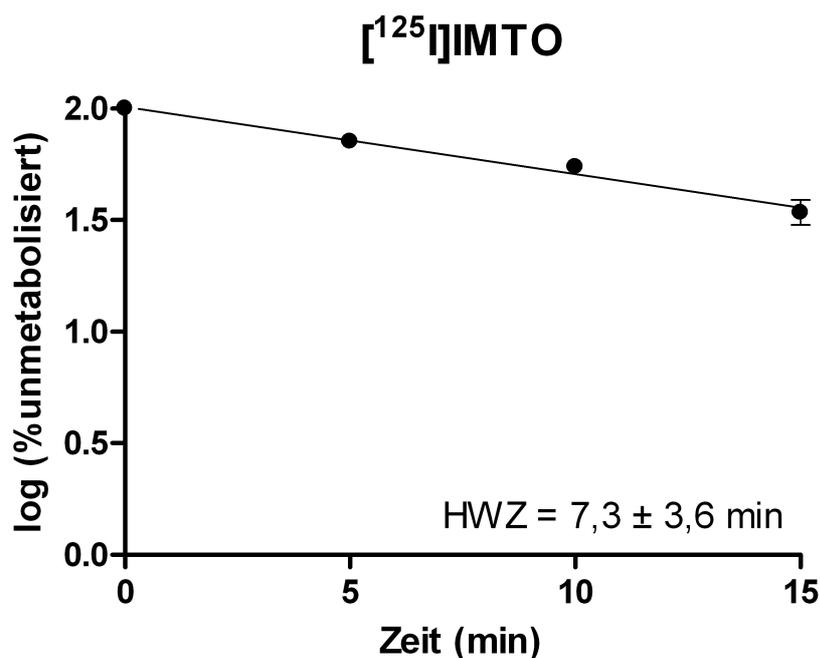


Abbildung 7 Messung der metabolischen Stabilität von $[^{125}I]IMTO$ (n=3, Triplikate)

Zu sehen ist die mittels HPLC im zeitlichen Verlauf gemessene unmetabolisierte Stoffmenge des Tracers $[^{125}I]IMTO$ (logarithmische Darstellung).

Die Referenzsubstanz $[^{125}I]$ Iodmetomidat ($[^{125}I]IMTO$) wies direkt nach Inkubation einen relativen unmetabolisierten Wert von $2,00 \pm 0,00$ auf, nach 5-minütiger

Inkubation ergab sich ein Wert von $1,85 \pm 0,05$, nach 10 Minuten ein Wert von $1,74 \pm 0,09$ und nach 15-minütiger Inkubation ein Wert von $1,53 \pm 0,15$. Die Halbwertszeit der Referenzsubstanz [125 I]IMTO lag bei $7,3 \pm 3,6$ Minuten (Abbildung 7).

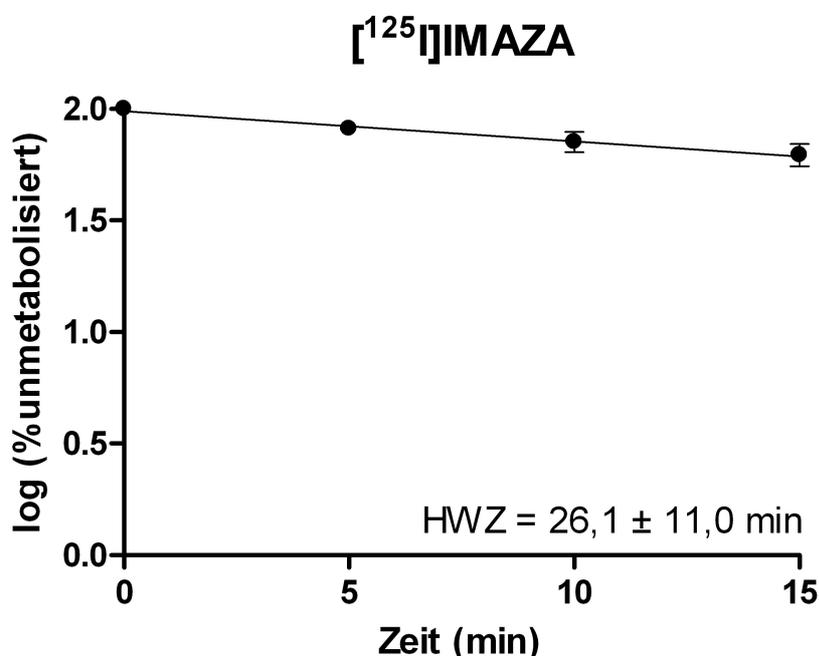


Abbildung 8 Messung der metabolischen Stabilität von [125 I]IMAZA (n=3, Triplikate)

Zu sehen ist die mittels HPLC im zeitlichen Verlauf gemessene unmetabolisierte Stoffmenge des Tracers [125 I]IMAZA (logarithmische Darstellung).

[125 I]IMTO-Azetidinylamid ([125 I]IMAZA) zeigte direkt nach Inkubation einen relativen unmetabolisierten Wert von $2,00 \pm 0,00$, nach 5-minütiger Inkubation ergab sich ein Wert von $1,91 \pm 0,11$, nach 10 Minuten ein Wert von $1,85 \pm 0,15$ und nach 15-minütiger Inkubation ein Wert von $1,79 \pm 0,16$. Die Halbwertszeit der Substanz [125 I]IMAZA lag bei $26,1 \pm 11,0$ Minuten (Abbildung 8). Eine Stabilitätstestung mittels HPLC wurde für [125 I]IMTO-Ethylmethylanid ([125 I]IEMA) nicht durchgeführt, da der Uptake in humane NCI H295-Zellen zu gering war (siehe Abschnitt 3.1). Rechnerisch ergaben sich die in Tabelle 10 dargestellten Halbwertszeiten. Letztendlich zeigten die Stabilitätsversuche, dass das IMTO-Derivat [125 I]IMAZA eine im Vergleich zu [125 I]IMTO 3,5-fache Stabilität aufwies. Daher wurde es im Rahmen dieser Arbeit zusammen mit der ebenso erfolgversprechenden Substanz [125 I]IEMA genauer untersucht.

Verbindung	<i>in vitro</i> T _{1/2} [log] min
IMTO	7,3 ± 3,6
IMAZA	26,1 ± 11,0

Tabelle 10 *In vitro* Halbwertszeiten von IMTO und IMAZA

Dargestellt sind die nach Inkubation mit humanen Lebermikrosomen nachgewiesenen Halbwertszeiten; Angaben jeweils als Mittelwert ± SD (n=3, Triplikate).

3.1 Zeitliche Akkumulation der Radiotracer in humanen NCI H295-Zellen

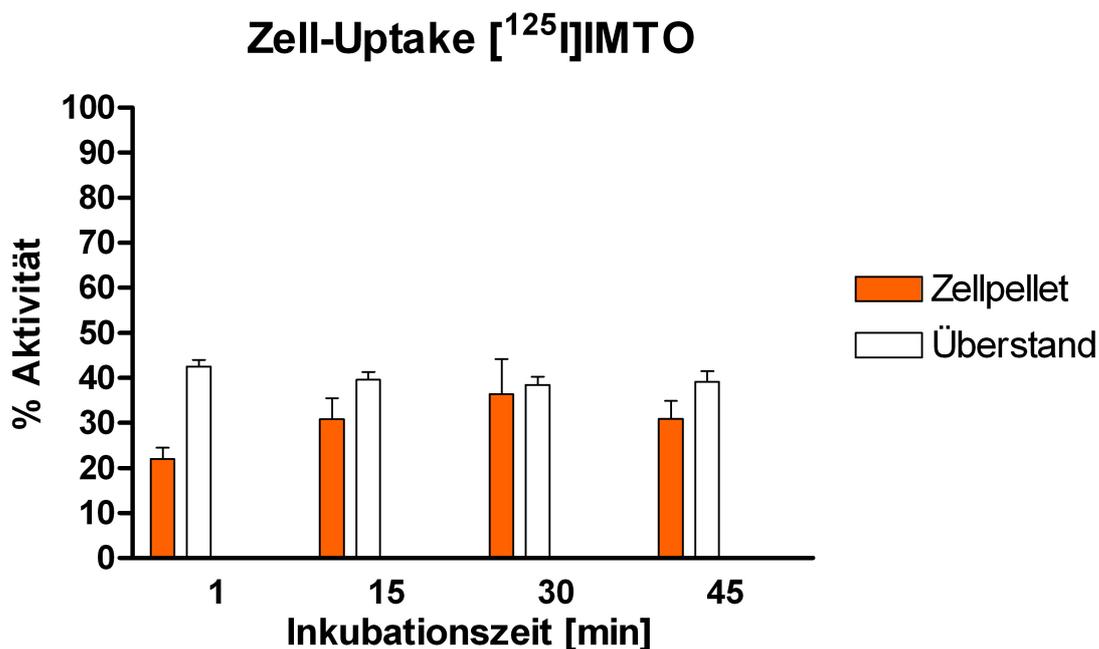


Abbildung 9 Zell-Uptake [¹²⁵I]IMTO (n=4, Triplikate)

NCI H295-Zellen wurden für 1, 15, 30 und 45 Minuten mit [¹²⁵I]IMTO inkubiert. Dargestellt ist die zeitliche Akkumulation des Radiotracers in die Zellen; Angaben als Mittelwert ± Standardabweichung.

Zell-Uptake [125 I]IMAZA

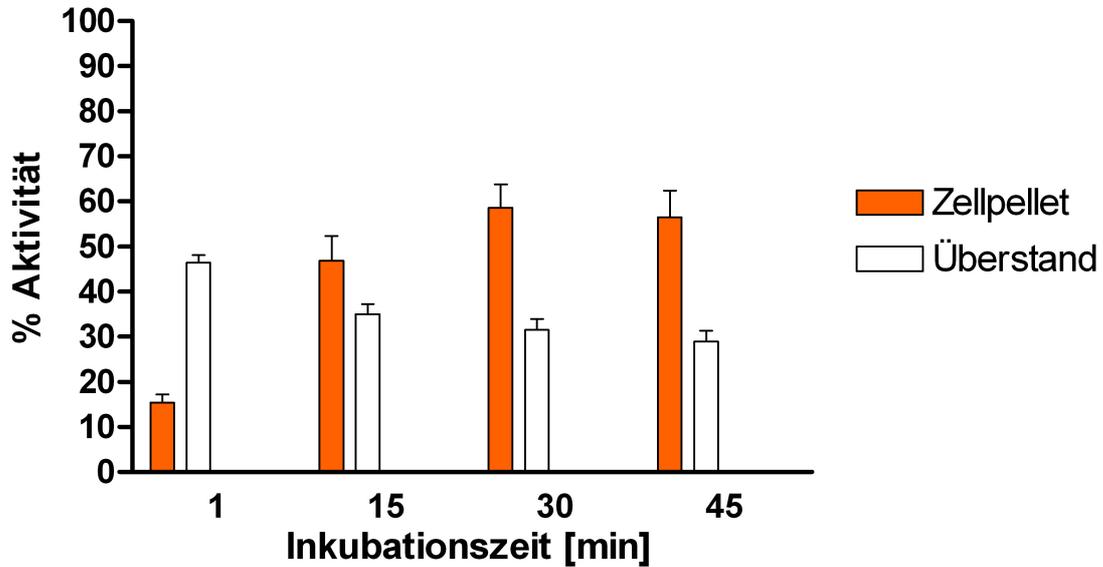


Abbildung 10 Zell-Uptake [125 I]IMAZA (n=6, Triplikate)

NCI H295-Zellen wurden für 1, 15, 30 und 45 Minuten mit [125 I]IMAZA inkubiert. Dargestellt ist die zeitliche Akkumulation des Radiotracers in die Zellen; Angaben als Mittelwert \pm Standardabweichung.

Zell-Uptake [125 I]IEMA

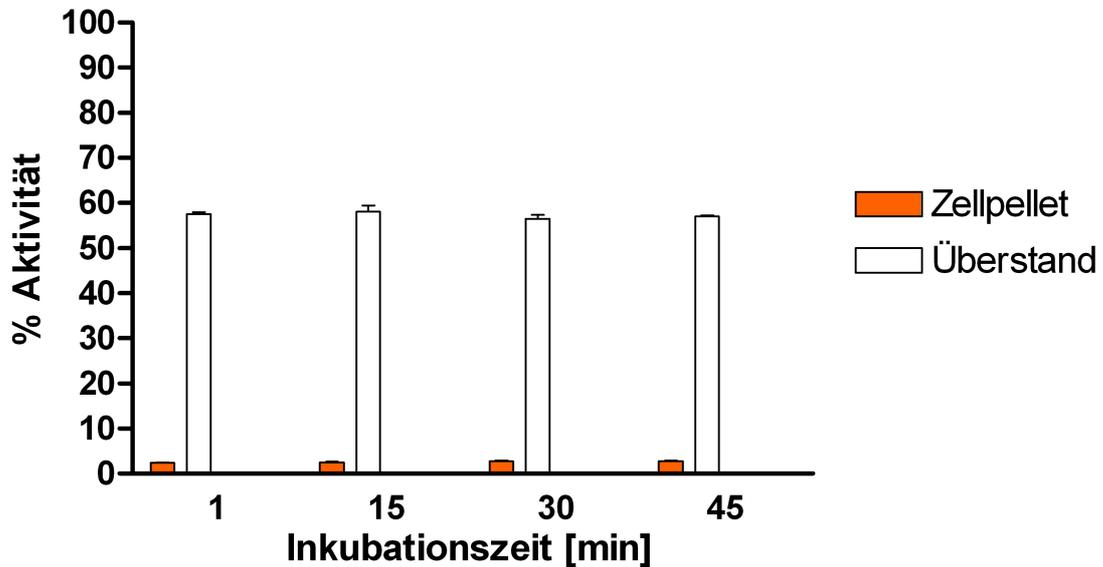


Abbildung 11 Zell-Uptake [125 I]IEMA (n=6, Triplikate)

NCI H295-Zellen wurden für 1, 15, 30 und 45 Minuten mit [125 I]IEMA inkubiert. Dargestellt ist die zeitliche Akkumulation des Radiotracers in die Zellen; Angaben als Mittelwert \pm Standardabweichung.

Zunächst wurde die Aufnahme der Radiotracer in humane NCI H295-Zellen bestimmt.

Hierbei zeigte sich für [125 I]IMTO eine Akkumulation der Aktivität im Zellpellet im Zeitverlauf. Direkt nach Entnahme der Probe (Zeitpunkt 1, zur Methodik siehe Abschnitt 2.3.2) befanden sich $22,0 \pm 5,1$ % der zugegebenen Aktivität im Zellpellet sowie $42,6 \pm 2,9$ % im Überstand. Es folgte eine Zunahme der Aktivität im Zellpellet auf $30,9 \pm 9,4$ % nach 15 Minuten. Nach 30 Minuten war das Maximum mit $36,3 \pm 15,8$ % erreicht, wobei sich $38,5 \pm 3,7$ % der Aktivität im Überstand nachweisen ließ. Nach 45 Minuten zeigte sich eine leichte Abnahme auf $31,0 \pm 8,0$ %. Analog hierzu zeigte sich eine leichte Zunahme der Aktivität im Überstand nach 45 Minuten auf $39,2 \pm 4,7$ % (Abbildung 9).

Um die untersuchten Radiotracer bezüglich ihrer zeitlichen Akkumulation in humanen NCI H 295-Zellen miteinander vergleichen zu können, erfolgten analog dazu Versuche mit [125 I]IMAZA und [125 I]IEMA.

Hierbei zeigte sich für die Substanz [125 I]IMAZA zum Zeitpunkt direkt nach Resuspension der Zellen (Zeitpunkt 1) eine Aufnahme von $15,4 \pm 4,4$ % der zugegebenen Aktivität im Pellet. Im Zeitverlauf nahm die Aufnahme kontinuierlich zu, nach 30 Minuten war das Maximum mit $58,6 \pm 12,6$ % erreicht. Nach 45 Minuten zeigte sich auch hier eine geringe, statistisch nicht signifikante Abnahme auf $56,6 \pm 14,1$ %. Gleichzeitig zeigte sich hier eine kontinuierliche Abnahme der Aktivität im Überstand von $46,4 \pm 4,3$ % zu Beginn der Inkubation auf $31,5 \pm 5,9$ % nach 30 Minuten beziehungsweise $29,0 \pm 5,9$ % nach 45 Minuten (Abbildung 10). Für [125 I]IEMA zeigte sich insgesamt nur eine sehr geringe Aufnahme des Radiotracers in das Zellpellet mit einem Maximum von je $2,7 \pm 0,6$ % nach 30 Minuten sowie $2,7 \pm 0,7$ % nach 45 Minuten. Gleichzeitig zeigte sich eine im zeitlichen Verlauf annähernd konstant bleibende Aktivität im Überstand mit Werten von $57,5 \pm 1,0$ % zu Beginn und $57,1 \pm 0,6$ % nach 45 Minuten Inkubation (Abbildung 11).

3.1.1 Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Zell-Uptake-Versuche

Zell-Uptake-Versuch		Prozentuale Ergebnisse			
		1 Min.	15 Min.	30 Min.	45 Min.
$[^{125}\text{I}]\text{IMTO}$	Zellpellet	22,0 ± 5,1	30,9 ± 9,4	36,3 ± 15,8	31,0 ± 8,0
	Überstand	42,6 ± 2,9	39,6 ± 3,6	38,5 ± 3,7	39,2 ± 4,7
$[^{125}\text{I}]\text{IMAZA}$	Zellpellet	15,4 ± 4,4	46,9 ± 13,5	58,6 ± 12,6	56,6 ± 14,1
	Überstand	46,4 ± 4,3	35,0 ± 5,5	31,5 ± 5,9	29,0 ± 5,9
$[^{125}\text{I}]\text{IEMA}$	Zellpellet	2,3 ± 0,3	2,4 ± 0,5	2,7 ± 0,6	2,7 ± 0,7
	Überstand	57,5 ± 1,0	58,1 ± 3,5	56,5 ± 2,0	57,1 ± 0,6

Tabelle 11 Tabellarische Darstellung der Ergebnisse des Zell-Uptake-Versuchs
Zusammenfassende Darstellung aller relevanten Ergebnisse des Uptake-Versuchs;
Angabe der Werte als Mittelwert ± Standardabweichung (in %).

Zell-Uptake-Versuch		Relative Werte (Vergleich mit IMTO)			
		0 Min.	15 Min.	30 Min.	45 Min.
$[^{125}\text{I}]\text{IMTO}$	Zellpellet	1,00	1,00	1,00	1,00
	Überstand	1,00	1,00	1,00	1,00
$[^{125}\text{I}]\text{IMAZA}$	Zellpellet	0,70	1,52	1,61	1,83
	Überstand	1,09	0,88	0,82	0,74
$[^{125}\text{I}]\text{IEMA}$	Zellpellet	0,11	0,08	0,07	0,09
	Überstand	1,35	1,47	1,47	1,46

Tabelle 12 Tabellarische Darstellung der relativen Ergebnisse des Zell-Uptake-Versuches
Dargestellt sind die Ergebnisse des Zell-Uptake-Versuches der verschiedenen
Iodmetomidat-Derivate in Relation zu Iodmetomidat, welchem als Referenz der
Wert 1,00 zugeordnet wurde.

3.2 Bestimmung der spezifischen Anreicherung von $[^{125}\text{I}]\text{IMTO}$ und $[^{125}\text{I}]\text{IMAZA}$ in humanen NCI H295-Zellen

Um die Spezifität der Aufnahme der Radiotracer in die Zellen zu bestimmen, erfolgte die Inkubation der NCI H295-Zellen mit $[^{125}\text{I}]\text{IMTO}$ bzw. $[^{125}\text{I}]\text{IMAZA}$ unter gleichzeitiger Inkubation mit unmarkiertem Etomidat.

Für $[^{125}\text{I}]\text{IMTO}$ zeigte sich unter Hinzugabe von 1 μM Etomidat bereits eine Reduktion der Anreicherung auf 28 % im Vergleich zur Kontrolle (keine Zugabe von Etomidat). Bei Hinzugabe von 10 μM Etomidat konnte eine Anreicherung von 31 % und bei Hinzugabe von 100 μM Etomidat eine Anreicherung von 32 % gemessen werden,

was insgesamt einer Reduktion der spezifischen Anreicherung um etwa 69 % entspricht.

Für [¹²⁵I]IMAZA konnte unter Hinzugabe von 1 µM Etomidat bereits eine Reduktion der Anreicherung auf 5 % gezeigt werden. Bei Hinzugabe von 10 µM Etomidat kam es zu einer Reduktion auf 4 % beziehungsweise auf 3 % nach Hinzugabe von 100 µM Etomidat, entsprechend einer Reduktion um insgesamt 97 % (Abbildung 12).

Da [¹²⁵I]IEMA *in vitro* kaum einen Uptake in humane NCI H295-Zellen zeigte, wurde auf eine Testung der spezifischen Anreicherung verzichtet.

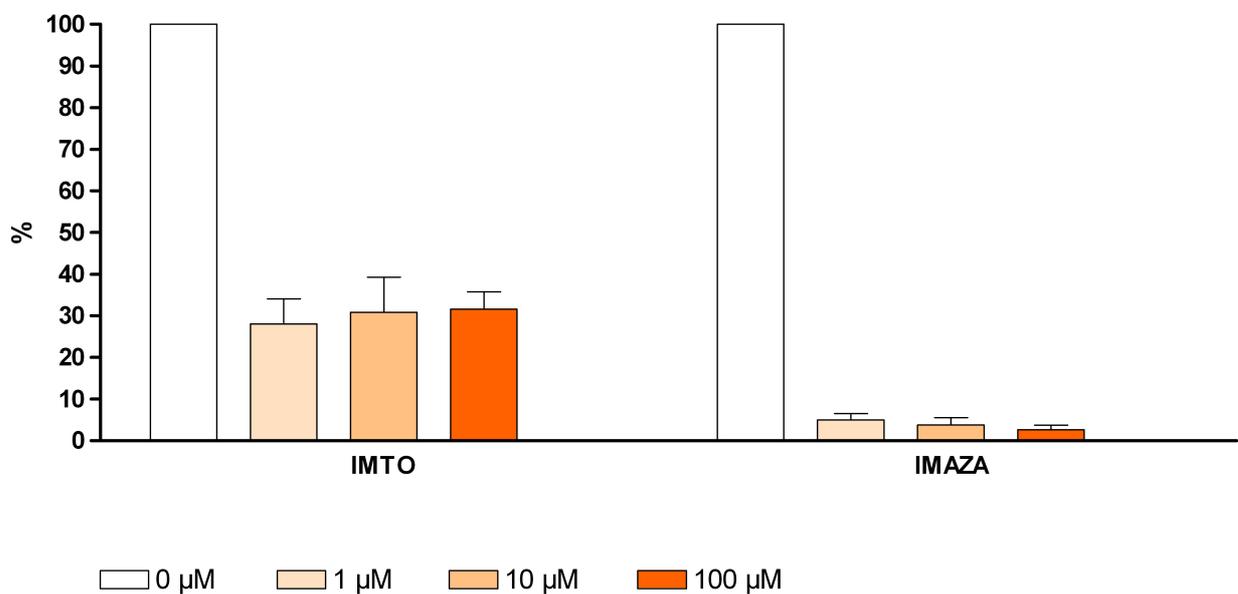


Abbildung 12 Inkubation der NCI H295-Zellen unter gleichzeitiger Blockierung mit Etomidat

Dargestellt ist jeweils die Inkubation humaner NCI H295-Zellen mit [¹²⁵I]IMTO und [¹²⁵I]IMAZA unter gleichzeitiger Inkubation mit unterschiedlichen Etomidatkonzentrationen für 30 Minuten; Angaben als prozentualer Anteil der Gesamtaktivität nach Gewinnung des Zellpellets (jeweils als Mittelwert ± SD).

3.3 Anreicherung der Radiotracer in zellulären Subfraktionen

Um herauszufinden, wo genau sich die Radiotracer in den humanen NCI H295-Zellen anreichern, wurde die Aktivität in den einzelnen Zellkompartimenten nach Inkubation mit dem entsprechenden Tracer bestimmt.

Für [¹²⁵I]IMTO ließen sich nach 30 Minuten Inkubation $47,0 \pm 5,9$ % der Radioaktivität in der Mitochondrien-Fraktion nachweisen.

Nach 30-minütiger Inkubation der NCI H295-Zellen mit [¹²⁵I]IMAZA konnten $35,6 \pm 3,3$ % der Gesamtaktivität in der Mitochondrien-Fraktion nachgewiesen werden (Abbildung 13).

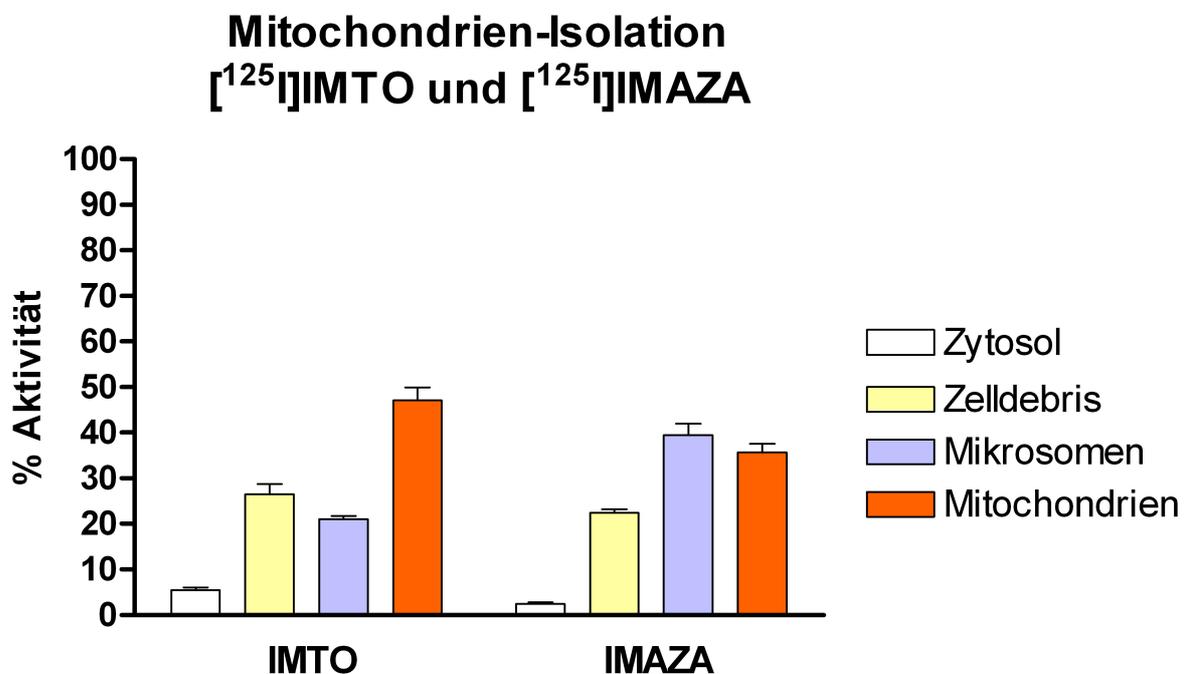


Abbildung 13 Mitochondrien-Isolation von [¹²⁵I]IMTO und [¹²⁵I]IMAZA

Dargestellt sind die einzelnen Zellkompartimente nach Inkubation mit 0,1 MBq [¹²⁵I]IMTO (n=4) sowie [¹²⁵I]IMAZA (n=3) für jeweils 30 Minuten; Angabe als Mittelwert \pm Standardabweichung.

3.3.1 Ergebnisse der Mitochondrien-Isolation in Relation zur Referenz IMTO

Mitochondrien-Isolation		Absolute Ergebnisse t = 30 Minuten	Relative Ergebnisse t = 30 Minuten (Vergleich mit IMTO)
$[^{125}\text{I}]\text{IMTO}$	Zytosol	5,5 ± 1,1	1,00
	Zelldebris	26,5 ± 4,5	1,00
	Mikrosomen	21,0 ± 1,4	1,00
	Mitochondrien	47,0 ± 5,9	1,00
$[^{125}\text{I}]\text{IMAZA}$	Zytosol	2,4 ± 0,7	0,44
	Zelldebris	22,5 ± 1,3	0,85
	Mikrosomen	39,5 ± 4,3	1,88
	Mitochondrien	35,6 ± 3,3	0,75

Tabelle 13 Übersicht über die Ergebnisse der Mitochondrien-Isolation in Relation zu IMTO
Angaben als Mittelwert ± Standardabweichung, IMTO als Referenz wurde der Wert 1,00 zugeordnet.

3.4 Biodistribution der Radiotracer in männlichen CD1-Mäusen

Zur Analyse der unterschiedlichen Anreicherung der Radiotracer *in vivo* wurden diese männlichen CD1-Mäusen intravenös appliziert und die prozentuale Verteilung der Injektionsdosis in den Organen der Mäuse nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten gemessen.

$[^{125}\text{I}]\text{IMTO}$ zeigte mit $491,1 \pm 170,2$ %ID/g bereits 15 Minuten nach Injektion eine deutliche Aufnahme in das Nebennierengewebe mit deutlichem Abfall des Wertes im zeitlichen Verlauf auf $27,4 \pm 26,0$ %ID/g nach 240 Minuten Inkubation, entsprechend einem Abfall von 94,4 % in Bezug auf die zu Beginn nachweisbare relative Aktivitätsmenge in den Nebennieren (Abbildung 14).

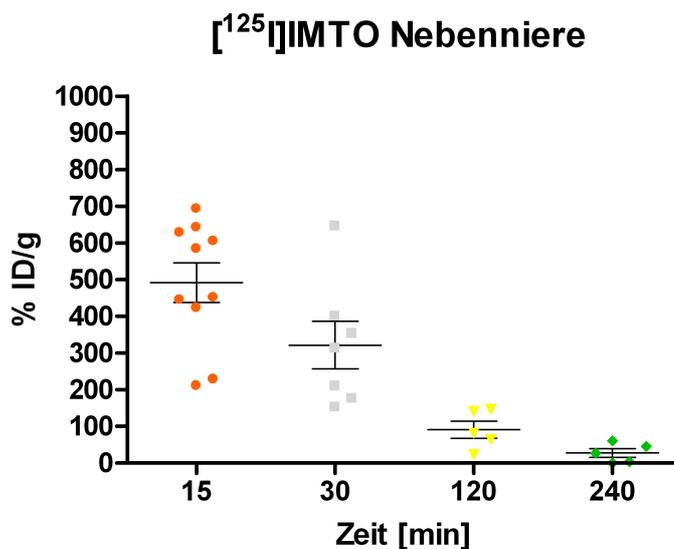


Abbildung 14 Uptake von [¹²⁵I]IMTO in murinen Nebennieren im Rahmen von Biodistributionsexperimenten

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der in den Nebennieren nachgewiesenen relativen Aktivitätsmengen in Bezug auf das Organgewicht und die jeweils applizierte Aktivitätsmenge (%ID/g); Angabe als Mittelwert ± Standardabweichung.

Gleichzeitig zeigte sich eine nach 30 Minuten deutlich zunehmende Aktivitätsmenge im Urin mit einem Maximum von $81,94 \pm 56,68$ %ID/g bei 120 Minuten. Die initial nach 15 Minuten nachweisbare Aktivität in Blut ($11,04 \pm 3,49$ %ID/g), Herz ($4,07 \pm 1,10$ %ID/g), Lunge ($6,15 \pm 1,26$ %ID/g), Leber ($10,93 \pm 1,68$ %ID/g), Darm ($2,89 \pm 0,44$ %ID/g), Niere ($7,39 \pm 2,00$ %ID/g) und Schilddrüse ($6,25 \pm 9,25$ %ID/g) nahm im zeitlichen Verlauf weiter ab. So konnten nach 240 Minuten folgende Werte gemessen werden: Blut ($2,85 \pm 4,09$ %ID/g), Herz ($0,69 \pm 0,49$ %ID/g), Lunge ($1,49 \pm 0,94$ %ID/g), Leber ($0,65 \pm 0,46$ %ID/g), Darm ($0,70 \pm 0,57$ %ID/g), Niere ($1,06 \pm 0,70$ %ID/g) und Schilddrüse ($0,76 \pm 0,43$ %ID/g). Es zeigten sich anfangs geringe Aktivitätsmengen in Milz ($1,99 \pm 0,33$ %ID/g), Magen ($1,65 \pm 0,67$ %ID/g) und Hoden ($3,38 \pm 1,04$ %ID/g) sowie sehr geringe Mengen in Muskel ($0,77 \pm 0,12$ %ID/g), Knochen ($1,02 \pm 0,21$ %ID/g) und Gehirn ($0,71 \pm 0,11$ %ID/g), welche im zeitlichen Verlauf geringer wurden und bei 240 Minuten folgende Werte erreichten: Milz ($0,30 \pm 0,18$ %ID/g), Magen ($0,49 \pm 0,34$ %ID/g) und Hoden ($0,38 \pm 0,24$ %ID/g) sowie sehr geringe Mengen in Muskel ($0,63 \pm 0,84$ %ID/g), Knochen ($0,29 \pm 0,22$ %ID/g) und Gehirn ($0,06 \pm 0,04$ %ID/g) (Abbildung 15, Tabelle 14).

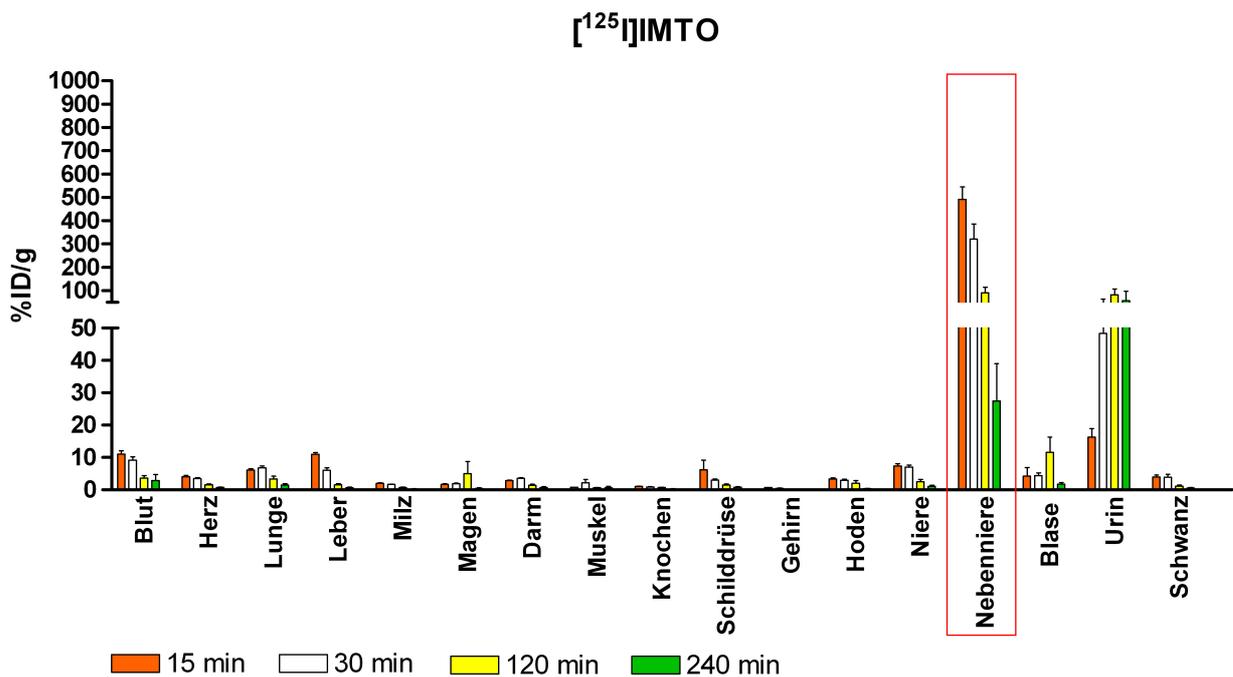


Abbildung 15 Biodistribution von $[^{125}\text{I}]\text{IMTO}$ in allen Organen

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der in den einzelnen Organen nachgewiesenen relativen Aktivitätsmengen in Bezug auf das Organgewicht und die jeweils applizierte Aktivitätsmenge (%ID/g); Angabe als Mittelwert \pm Standardabweichung.

$[^{125}\text{I}]\text{IMAZA}$ zeigte nach 15 Minuten mit $710,93 \pm 210,48$ %ID/g eine deutliche Aufnahme in das Nebennierengewebe. Im zeitlichen Verlauf zeigte sich mit einem Maximum von $720,36 \pm 169,71$ %ID/g nach 30 Minuten zunächst eine weitere Steigerung der Aufnahme.

Auch $[^{125}\text{I}]\text{IMAZA}$ zeigte im zeitlichen Verlauf eine Abnahme der im Nebennierengewebe nachgewiesenen Aktivitätsmenge mit $395,72 \pm 92,62$ %ID/g nach 120 Minuten (entsprechend einem Abfall von 45,07 % in Bezug auf die nach 30 Minuten maximal nachweisbare relative Aktivitätsmenge in den Nebennieren) sowie $275,36 \pm 124,04$ %ID/g nach 240 Minuten Inkubation (entsprechend einem Abfall von 61,77 % in Bezug auf die nach 30 Minuten maximal nachweisbare relative Aktivitätsmenge in den Nebennieren) (Abbildung 16). Gleichzeitig zeigte sich im zeitlichen Verlauf eine deutlich zunehmende Aktivitätsmenge im Urin mit einem Maximum von $494,17 \pm 460,96$ %ID/g nach 30 Minuten und anschließendem Abfall auf eine nach 240 Minuten nachweisbare relative Aktivität von $59,81 \pm 67,25$ %ID/g.

Organ	$[^{125}\text{I}]\text{IMTO}$			
	15 Min. n=10	30 Min. n=7	120 Min. n=5	240 Min. n=5
Blut	11,04 ± 3,49	9,20 ± 2,68	3,62 ± 1,73	2,85 ± 4,09
Herz	4,07 ± 1,10	3,49 ± 0,78	1,50 ± 0,67	0,69 ± 0,49
Lunge	6,15 ± 1,26	6,77 ± 1,55	3,39 ± 1,76	1,49 ± 0,94
Leber	10,93 ± 1,68	6,03 ± 2,06	1,52 ± 0,74	0,65 ± 0,46
Milz	1,99 ± 0,33	1,60 ± 0,34	0,73 ± 0,39	0,30 ± 0,18
Magen	1,65 ± 0,67	1,87 ± 0,52	4,98 ± 8,44	0,49 ± 0,34
Darm	2,89 ± 0,44	3,51 ± 0,75	1,38 ± 0,75	0,70 ± 0,57
Muskel	0,77 ± 0,12	2,09 ± 2,99	0,59 ± 0,27	0,63 ± 0,84
Knochen	1,02 ± 0,21	0,84 ± 0,42	0,67 ± 0,36	0,29 ± 0,22
Schilddrüse	6,25 ± 9,25	3,06 ± 0,72	1,46 ± 0,73	0,76 ± 0,43
Gehirn	0,71 ± 0,11	0,49 ± 0,09	0,23 ± 0,11	0,06 ± 0,04
Hoden	3,38 ± 1,04	2,96 ± 0,77	1,98 ± 1,96	0,38 ± 0,24
Niere	7,39 ± 2,00	7,01 ± 1,67	2,55 ± 1,44	1,06 ± 0,70
Nebenniere	491,11 ± 170,22	321,32 ± 170,63	90,63 ± 52,57	27,44 ± 25,97
Blase	4,19 ± 8,42	4,39 ± 2,13	11,56 ± 10,62	1,70 ± 1,17
Urin	16,33 ± 8,37	48,38 ± 40,37	81,94 ± 56,68	57,41 ± 91,89
Schwanz	3,93 ± 1,95	3,90 ± 2,43	1,10 ± 0,74	0,55 ± 0,42

Tabelle 14 Absolute Ergebnisse der Biodistribution von $[^{125}\text{I}]\text{IMTO}$
Angabe der Ergebnisse als Mittelwert ± Standardabweichung (in %ID/g)

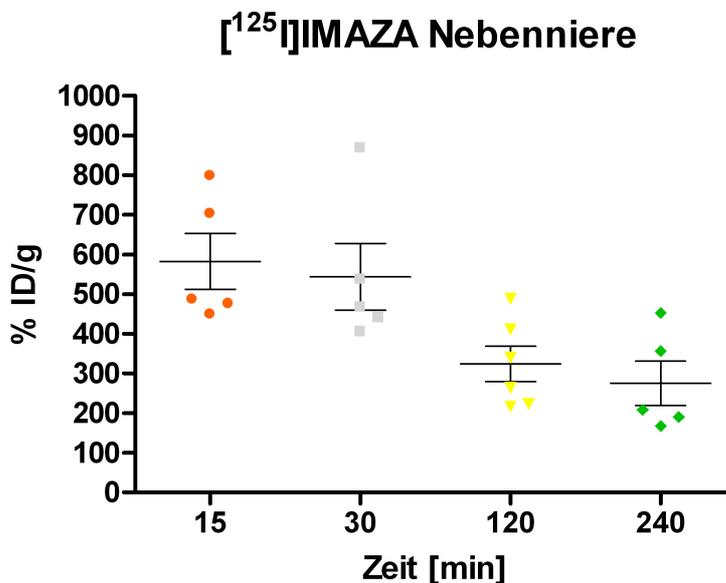


Abbildung 16 Uptake von $[^{125}\text{I}]\text{IMAZA}$ in murinen Nebennieren im Rahmen von Biodistributionsversuchen

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der in den Nebennieren nachgewiesenen relativen Aktivitätsmengen in Bezug auf Organgewicht und die jeweils applizierte Aktivitätsmenge (%ID/g); Angabe als Mittelwert ± Standardabweichung.

Die mit $23,53 \pm 3,37$ %ID/g initial nach 15 Minuten in der Leber nachweisbare Aktivitätsmenge fiel bereits nach 30 Minuten auf $13,41 \pm 6,61$ %ID/g ab und konnte nach 120 Minuten mit $0,37 \pm 0,14$ %ID/g kaum mehr nachgewiesen werden. In der Niere konnte nach 15 Minuten eine Aktivitätsmenge von $11,93 \pm 3,63$ %ID/g nachgewiesen werden, welche nach 30 Minuten auf $18,99 \pm 8,11$ %ID/g anstieg, um nach 120 Minuten wieder auf $2,34 \pm 3,71$ %ID/g zu sinken. Analog hierzu konnte nach 15 Minuten Inkubation in der Blase $1,83 \pm 1,94$ %ID/g, nach 30 Minuten $22,98 \pm 20,39$ %ID/g sowie ein Abfall nach 120 Minuten auf $11,30 \pm 10,84$ %ID/g nachgewiesen werden.

In den restlichen Organen konnte mit einem Maximum von $1,35 \pm 0,73$ %ID/g nach 15 Minuten Inkubation im Darm, einem Maximum von $1,21 \pm 0,38$ %ID/g im Magen beziehungsweise von $1,21 \pm 0,46$ %ID/g im Schwanz nach 30-minütiger Inkubation, einem Maximum von $0,66 \pm 0,22$ %ID/g nach 120 Minuten Inkubation ebenfalls im Magen sowie einem Maximum von $1,06 \pm 0,94$ %ID/g nach 240 Minuten Inkubation im Darm insgesamt kaum Aktivität nachgewiesen werden (Abbildung 17, Tabelle 15).

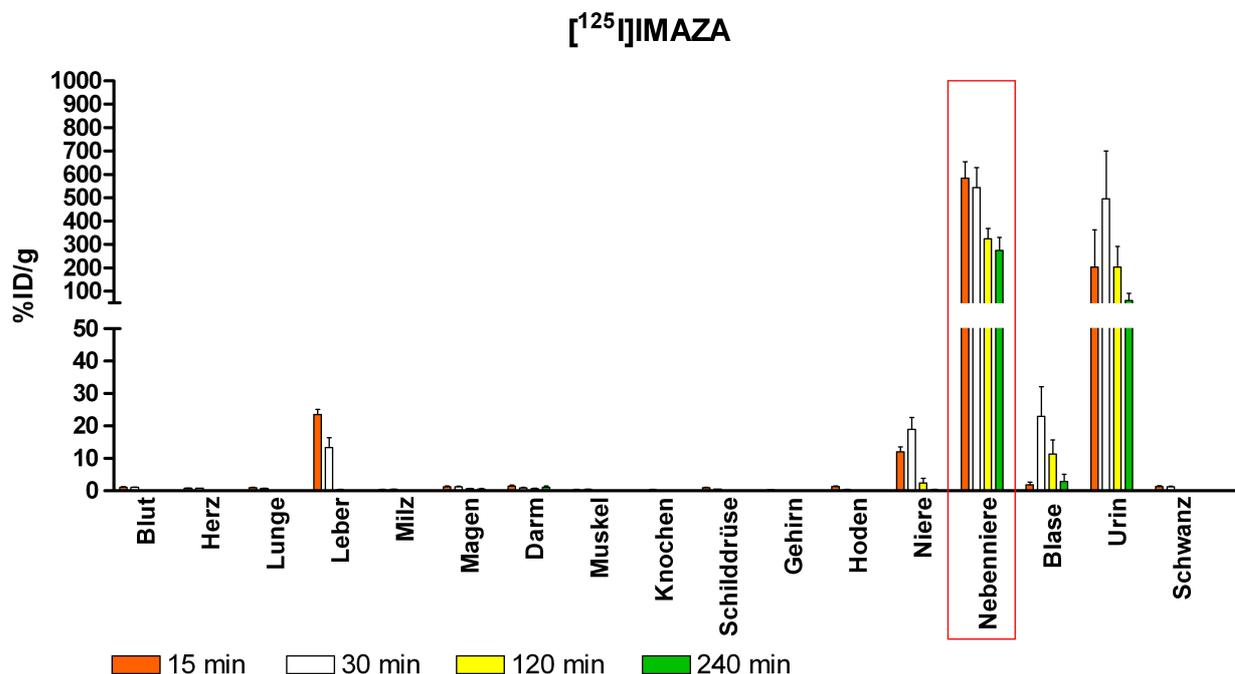


Abbildung 17 Biodistribution von [¹²⁵I]IMAZA in allen Organen

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der in den einzelnen Organen nachgewiesenen relativen Aktivitätsmengen in Bezug auf das Organgewicht und die jeweils applizierte Aktivitätsmenge (%ID/g); Angabe als Mittelwert \pm Standardabweichung.

Organ	¹²⁵ I]IMAZA			
	15 Min. n=5	30 Min. n=5	120 Min. n=6	240 Min. n=5
Blut	1,07 ± 0,43	1,02 ± 0,18	0,07 ± 0,02	0,06 ± 0,02
Herz	0,80 ± 0,21	0,76 ± 0,06	0,04 ± 0,02	0,03 ± 0,00
Lunge	0,93 ± 0,21	0,71 ± 0,12	0,09 ± 0,08	0,05 ± 0,01
Leber	23,53 ± 3,37	13,41 ± 6,61	0,37 ± 0,14	0,25 ± 0,11
Milz	0,38 ± 0,10	0,44 ± 0,23	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,01
Magen	1,18 ± 0,65	1,21 ± 0,38	0,66 ± 0,22	0,58 ± 0,31
Darm	1,35 ± 0,73	0,85 ± 0,52	0,64 ± 0,39	1,06 ± 0,94
Muskel	0,39 ± 0,10	0,46 ± 0,23	0,04 ± 0,02	0,06 ± 0,10
Knochen	0,24 ± 0,13	0,35 ± 0,25	0,03 ± 0,04	0,02 ± 0,03
Schilddrüse	0,94 ± 0,31	0,50 ± 0,08	0,13 ± 0,02	0,22 ± 0,08
Gehirn	0,34 ± 0,04	0,14 ± 0,02	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01
Hoden	1,28 ± 0,36	0,38 ± 0,20	0,11 ± 0,13	0,03 ± 0,01
Niere	11,93 ± 3,63	18,99 ± 8,11	2,34 ± 3,71	0,40 ± 0,10
Nebenniere	710,93 ± 210,48	720,36 ± 169,71	395,72 ± 92,62	275,36 ± 124,04
Blase	1,83 ± 1,94	22,98 ± 20,39	11,30 ± 10,84	2,89 ± 4,88
Urin	203,05 ± 355,69	494,17 ± 460,96	203,60 ± 213,49	59,81 ± 67,25
Schwanz	1,30 ± 0,62	1,21 ± 0,46	0,11 ± 0,06	0,06 ± 0,02

Tabelle 15 Absolute Ergebnisse der Biodistribution von [¹²⁵I]IMAZA

Angabe der Ergebnisse als Mittelwert ± Standardabweichung (in %ID/g)

[¹²⁵I]IEMA zeigte nach 15 Minuten eine Aufnahme von 538,23 ± 256,58 %ID/g in das Nebennierengewebe, allerdings mit kontinuierlichem Rückgang der adrenal nachweisbaren Aktivitätsmenge mit einem Abfall auf 394,46 ± 128,44 %ID/g nach 30 Minuten, einem weiteren Abfall auf 96,84 ± 60,70 %ID/g nach 120 Minuten sowie einem insgesamt im Vergleich zum Maximum nach 15-minütiger Inkubation deutlichen Abfall auf 62,31 ± 55,67 %ID/g nach 240 Minuten (Abbildung 18). Auch in den restlichen Organen zeigten sich 15 Minuten nach Applikation mit Werten zwischen 0,64 ± 0,12 %ID/g im Knochen- beziehungsweise 0,64 ± 0,12 %ID/g im Muskelgewebe und 19,62 ± 2,97 %ID/g in der Leber nachweisbare Aktivitätsmengen. Nach 240 Minuten zeigten sich mit 1,9 ± 0,63 %ID/g in Leber, 3,33 ± 3,73 %ID/g in Magen, 2,70 ± 1,12 %ID/g in Darm, 1,30 ± 0,29 %ID/g in Schilddrüse und 1,03 ± 0,21 %ID/g in der Niere nachweisbare Restaktivitätsmengen (siehe Abbildung 19, Tabelle 16).

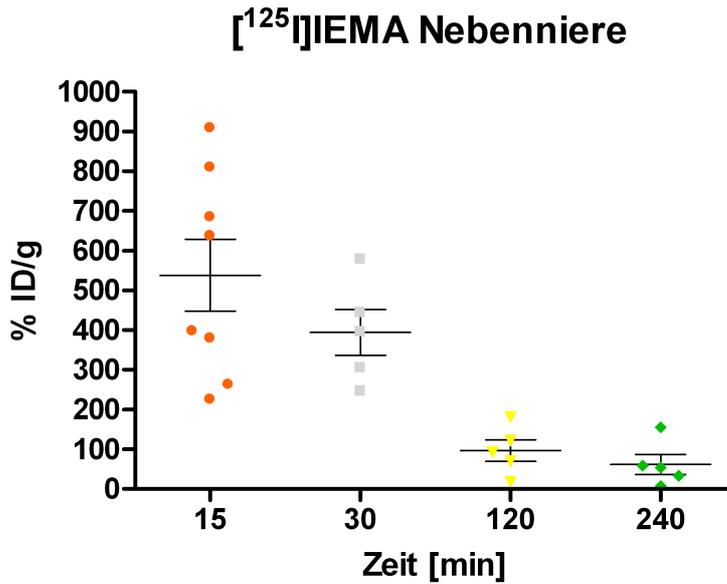


Abbildung 18 Uptake von [¹²⁵I]IEMA in murinen Nebennieren im Rahmen von Biodistributionsversuchen

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der in den Nebennieren nachgewiesenen relativen Aktivitätsmengen in Bezug auf das Organgewicht und die jeweils applizierte Aktivitätsmenge (%ID/g); Angabe als Mittelwert ± Standardabweichung.

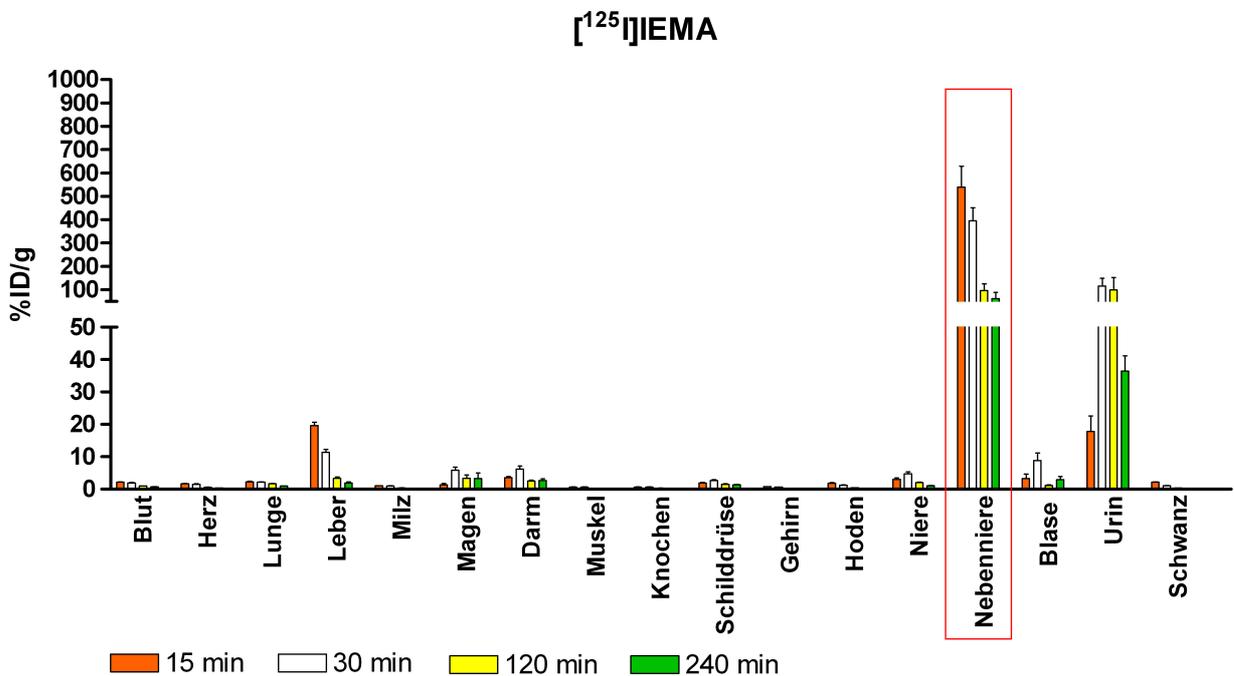


Abbildung 19 Biodistribution von [¹²⁵I]IEMA in allen Organen

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der in den einzelnen Organen nachgewiesenen relativen Aktivitätsmengen in Bezug auf das Organgewicht und die jeweils applizierte Aktivitätsmenge (%ID/g); Angabe als Mittelwert ± Standardabweichung.

Organ	$[^{125}\text{I}]\text{IEMA}$			
	15 Min. n=8	30 Min. n=5	120 Min. n=5	240 Min. n=5
Blut	2,14 ± 0,29	1,09 ± 0,30	0,93 ± 0,15	0,74 ± 0,10
Herz	1,66 ± 0,19	1,47 ± 0,30	0,57 ± 0,11	0,37 ± 0,05
Lunge	2,24 ± 0,67	2,13 ± 0,20	1,59 ± 0,33	0,92 ± 0,17
Leber	19,62 ± 2,97	11,40 ± 1,98	3,42 ± 0,87	1,90 ± 0,63
Milz	1,02 ± 0,18	0,99 ± 0,15	0,37 ± 0,10	0,26 ± 0,05
Magen	1,29 ± 1,08	5,90 ± 2,03	3,39 ± 2,20	3,33 ± 3,73
Darm	3,54 ± 0,88	6,21 ± 2,09	2,51 ± 0,68	2,70 ± 1,12
Muskel	0,64 ± 0,15	0,65 ± 0,15	0,23 ± 0,08	0,16 ± 0,04
Knochen	0,64 ± 0,12	0,64 ± 0,14	0,24 ± 0,21	0,15 ± 0,03
Schilddrüse	1,90 ± 0,38	2,68 ± 0,54	1,48 ± 0,27	1,30 ± 0,29
Gehirn	0,76 ± 0,05	0,60 ± 0,09	0,25 ± 0,06	0,12 ± 0,02
Hoden	1,78 ± 0,57	1,25 ± 0,18	0,48 ± 0,04	0,30 ± 0,08
Niere	3,07 ± 1,19	4,68 ± 1,40	1,95 ± 0,35	1,03 ± 0,21
Nebenniere	538,23 ± 256,58	394,46 ± 128,44	96,84 ± 60,70	62,31 ± 55,67
Blase	3,27 ± 3,82	8,83 ± 5,11	1,12 ± 0,46	2,94 ± 2,08
Urin	17,78 ± 13,67	115,61 ± 74,95	98,79 ± 120,64	36,47 ± 10,46
Schwanz	2,10 ± 0,64	1,07 ± 0,18	0,36 ± 0,05	0,27 ± 0,03

Tabelle 16 Absolute Ergebnisse der Biodistribution von $[^{125}\text{I}]\text{IEMA}$

Angabe der Ergebnisse als Mittelwert ± Standardabweichung (in %ID/g)

3.4.1 Ergebnisse der Biodistributionsversuche absolut und in Relation zu $[^{125}\text{I}]\text{IMTO}$

ABSOLUTE WERTE	15 Min.	30 Min.	120 Min.	240 Min.
$[^{125}\text{I}]\text{IMTO}$	491,11 ± 170,22	321,32 ± 170,63	90,63 ± 52,57	27,44 ± 25,97
$[^{125}\text{I}]\text{IMAZA}$	710,93 ± 210,48	720,36 ± 169,71	395,72 ± 92,62	275,36 ± 124,04
$[^{125}\text{I}]\text{IEMA}$	538,23 ± 256,58	394,46 ± 128,44	96,84 ± 60,70	62,31 ± 55,67
RELATIVE WERTE	15 Min.	30 Min.	120 Min.	240 Min.
$[^{125}\text{I}]\text{IMTO}$	1,00	1,00	1,00	1,00
$[^{125}\text{I}]\text{IMAZA}$	1,45	2,24	4,37	10,03
$[^{125}\text{I}]\text{IEMA}$	1,10	1,23	1,07	2,27

Tabelle 17 Ergebnisse der Biodistribution (Nebennieren) aller Substanzen

Angabe der Ergebnisse als Mittelwert ± Standardabweichung, Angaben im oberen Teil der Tabelle als absolute Ergebnisse in %ID/g, im unteren Teil dimensionslos als relative Werte (IMTO-Wert als Referenz)

Die in Tabelle 17 dargestellten absoluten Werte der Biodistributionsversuche sind in folgender Grafik (Abbildung 20) nochmals zur besseren Anschauung vergleichend dargestellt:

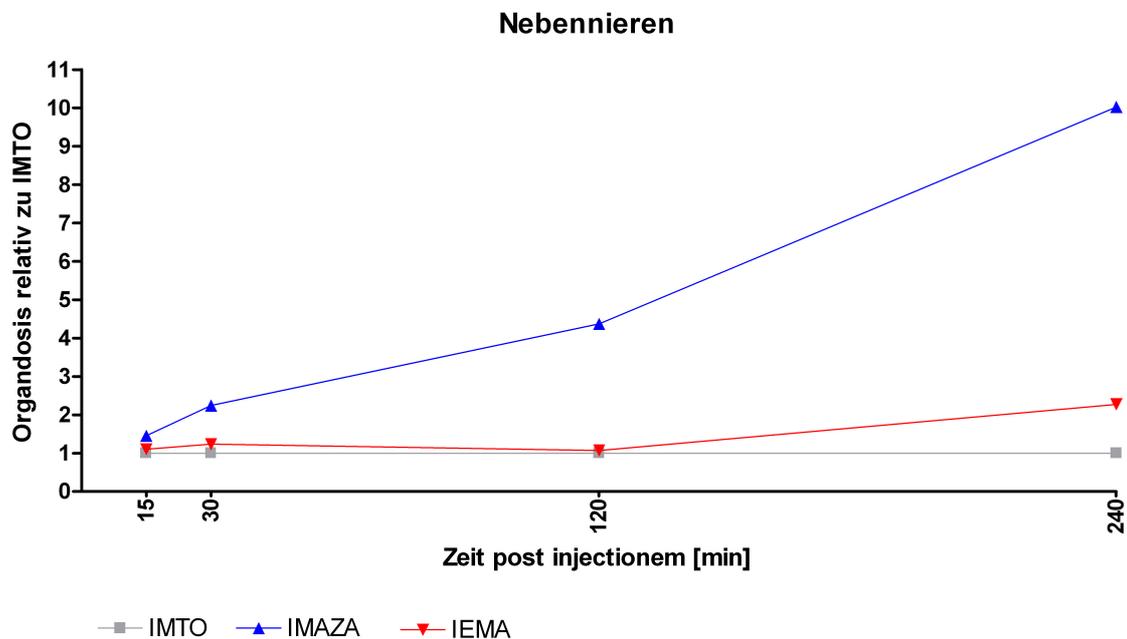


Abbildung 20 Ergebnisse der Biodistribution, Nebennieren

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der in den Nebennieren nach Inkubation mit $[^{125}\text{I}]\text{IMTO}$, $[^{125}\text{I}]\text{IMAZA}$ und $[^{125}\text{I}]\text{IEMA}$ nachgewiesenen relativen Organdosis (jeweils aus Übersichtsgründen nur der Mittelwert, Angaben als %ID/g).

3.5 Heilversuch mit $[^{131}\text{I}]\text{IMAZA}$

Im Rahmen eines ersten klinischen Heilversuches wurden erste Erkenntnisse bezüglich der Wirksamkeit der Substanz $[^{131}\text{I}]\text{IMAZA}$ erlangt.

Es zeigte sich *in vivo* eine deutlich höhere metabolische Stabilität bei gleichzeitig rascher Elimination von ungebundenem Radiotracer in den übrigen Organen der Patienten. Diese deutlich höhere Tumor/Hintergrund-Relation verbesserte deutlich die Qualität der Bildgebung (siehe Abbildung 20). Gleichzeitig wurde im Vergleich zu IMTO eine bis zu 5-fach erhöhte Dosis der Substanz im Tumorgewebe erreicht. Eine Dosimetrie zeigte, dass das Knochenmark das kritische Organ zu sein scheint. Die behandelte Patientin erhielt 28 GBq $[^{131}\text{I}]\text{IMAZA}$; hierbei wurden Tumordosen von bis zu 265 Gy in 5 ausgesuchten Zielläsionen erreicht.

Vergleichende low-dose Computertomographien vor und 9 Wochen nach der Behandlung mit [¹³¹I]IMAZA ergaben eine stabile Erkrankung (stable disease) nach Behandlung bei zuvor nachweisbarem Progress (progressive disease) (Bildquelle: Klinik für Nuklearmedizin, Universitätsklinikum Würzburg).

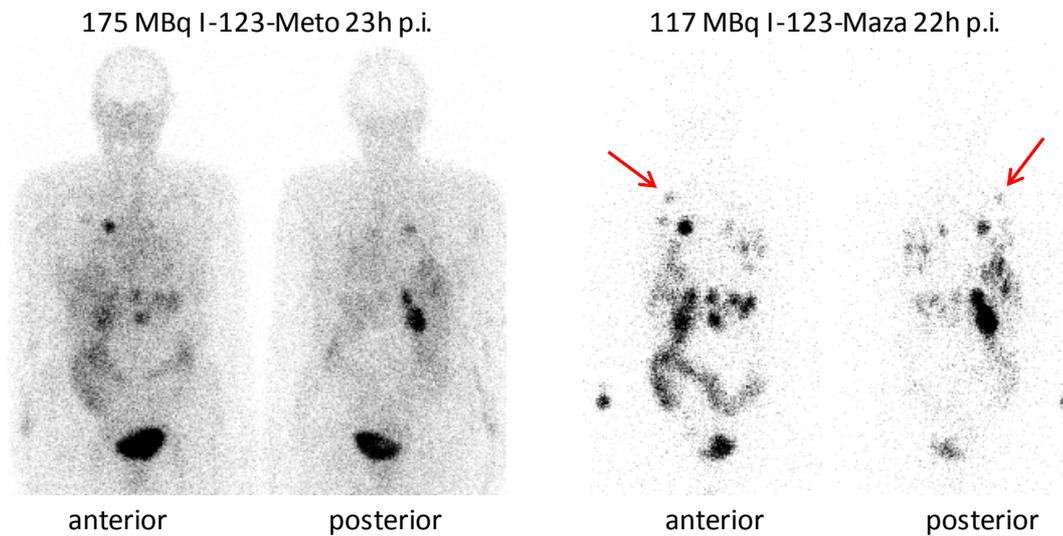


Abbildung 21 Szintigraphie nach Injektion von [¹²³I]IMTO bzw. [¹²³I]IMAZA

Dargestellt sind die Szintigramme nach Injektion von 175 MBq [¹²³I]IMTO (links) und 117 MBq [¹²³I]IMAZA (rechts). Eine thorakale Metastase ist mit Pfeilen markiert und nur eindeutig im [¹²³I]IMAZA-Szintigramm sichtbar.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden neue, metabolisch stabilere IMTO-Derivate hinsichtlich ihrer Einsatzmöglichkeit in der Diagnostik und Therapie von Nebennierenkarzinomen untersucht. Ziel war es, eine frühere Diagnosestellung und somit eine insgesamt effektivere Therapie, aber auch deutlich bessere therapeutische Möglichkeiten bei späterer Diagnosestellung mit daraus insgesamt resultierender Prognoseverbesserung zu erreichen.

4.1 Carbonsäureamide als metabolisch stabilere IMTO-Derivate

Um der Forderung nach metabolisch stabileren IMTO-Derivaten gerecht werden zu können, wurden im Vorfeld dieser Arbeit verschiedene Optionen der chemischen Strukturänderung diskutiert.

Carbonsäureester wie z.B. IMTO sind aufgrund ubiquitär vorkommender Esterasen metabolisch instabil und werden in der Pharmazie daher oft als Prodrugs für Carbonsäuren bzw. Alkohole verwendet. Eine Stabilisierung von Carbonsäureestern lässt sich unter anderem durch den Ersatz des Carbonsäureesters durch spezielle, als metabolisch stabil bekannte Carbonsäureester oder durch sogenannte Bioisostere erzielen. Der am häufigsten in der Pharmazie verwendete Ansatz ist jedoch der Ersatz der Carbonsäureester durch Carbonsäureamide, da letztere generell metabolisch stabiler sind (59). Ein weiterer willkommener Nebeneffekt dieser Transformation ist die im Vergleich zu den Carbonsäureestern höhere Polarität der Carbonsäureamide. Da IMTO aufgrund seiner recht hohen Lipophilie nur bedingt wasserlöslich ist, ergaben sich insbesondere bei der Endoradiotherapie praktische Probleme, welche durch ein polareres Derivat umgangen werden könnten.

Die Substanz IMAZA, (R)-1-[1-(4-Iodphenyl)ethyl]-1H-imidazol-5-carbonsäure-azetidinylamid, zeigte eine mit IMTO vergleichbare geringe Lipophilie bei sogar höherer metabolischer Stabilität, was zur Beobachtung passt, dass die Bindungsstellen metabolisierender Enzyme lipophil sind (60).

Die deutlich höhere metabolische Stabilität von IMAZA kann außerdem durch die Eigenschaften der funktionellen Carbonsäureamid-Gruppe sowie die zyklische Struktur erklärt werden (61).

4.2 Aufnahme der Carbonsäureamide in humane NCI H295-Zellen

Wie bereits durch die Uptakeversuche von Martin Ries bestätigt, wird IMTO in humane Nebennierenkarzinomzellen aufgenommen. Analog zu den bereits erhaltenen Ergebnissen von Martin Ries wurde zur Verifizierung der Methodik sowie zum Erhalt von Referenzwerten zunächst ein Zell-Uptake-Versuch mit [¹²⁵I]IMTO durchgeführt. Nach Inkubation der Zellsuspension mit [¹²⁵I]IMTO konnte bereits direkt nach Hinzufügen und Zentrifugation $22,0 \pm 5,1$ % der Aktivität im Zellpellet nachgewiesen werden. Da sich im zeitlichen Verlauf eine deutliche Zunahme der Aktivitätsmenge in diesem Kompartiment zeigte, kann analog zu den durch Martin Ries gewonnenen Ergebnissen sowie aufgrund der bekannten adrenalen Bindung (siehe Abschnitt 1.4) von einer Aufnahme des Radiotracers IMTO in humane NCI H295-Zellen ausgegangen werden. Desweiteren zeigte sich auch in unseren Experimenten eine deutliche Zunahme der gemessenen Aktivität nach Inkubation mit IMTO im NCI-Zellen beinhaltenden Zellpellet im zeitlichen Verlauf auf zunächst $30,9 \pm 9,4$ % nach 15 Minuten sowie $36,3 \pm 15,8$ % nach 30 Minuten. Passend hierzu zeigte sich eine im zeitlichen Verlauf nachweisbare Abnahme der gemessenen Aktivität im Überstand von $42,6 \pm 2,9$ % direkt nach Hinzufügen von IMTO auf $38,5 \pm 3,7$ % nach 30-minütiger Inkubation. Nach 45 Minuten zeigte sich ein leichter Abfall der im Zellpellet gemessenen Aktivität auf $31,0 \pm 8,0$ % sowie eine leichte Zunahme auf $39,2 \pm 4,7$ % im Überstand. Eine Möglichkeit könnte sein, dass die Zellen nach dem 45 Minuten dauernden Entzug ihres regulären Nährmediums bereits zunehmend apoptotisch wurden und somit aufgrund bereits nicht mehr intakter Zellmembranen oder bereits funktionsuntüchtiger Transportproteine eine Freisetzung aus dem Zellinneren beziehungsweise mangelnde Aufnahme in das Zellinnere und eine daraus resultierende Abzentrifugation von IMTO mit dem Überstand erfolgte. Eine andere Möglichkeit wäre ein bereits eingetretenes Diffusionsgleichgewicht (steady state) sowie eine Sättigung der Bindungsstellen, welches nach zu einem zwischen 30 und 45 Minuten liegenden Zeitpunkt eingetreten ist.

[¹²⁵I]IMAZA zeigte eine ebenso im zeitlichen Verlauf zunehmende, messbare Aktivitätsmenge im Zellpellet. Direkt nach Hinzugabe der Substanz konnten bereits $15,4 \pm 4,4$ % der Aktivität im Zellpellet nachgewiesen werden. Aufgrund der im zeitlichen Verlauf im Zellpellet gemessenen zunehmenden Aktivität auf $46,9 \pm 13,5$ % nach 15 Minuten und $58,6 \pm 12,6$ % nach 30 Minuten kann auch hier mit hoher

Wahrscheinlichkeit von einer Aufnahme in die Zelle ausgegangen werden. Aufgrund der leichten Abnahme der im Zellpellet nachweisbaren Aktivität nach 45 Minuten auf nun $56,6 \pm 14,1$ % kann man analog zu IMTO hierbei ebenso die für IMTO in Betracht kommenden möglichen Ursachen vermuten, zum Einen eine bereits eingetretene Apoptose und zum Anderen ein bereits eingetretenes Diffusionsgleichgewicht. Hierzu passend konnte analog zu IMTO ein zeitlicher Verlauf der gemessenen Aktivität im zentrifugierten Überstand festgestellt werden.

Unabhängig vom zugrundeliegenden Bindungsmechanismus von [125 I]IMTO und [125 I]IMAZA zeigt sich doch bereits direkt nach Inkubation (1 Min.) eine um 30 % niedrigere im Zellpellet nachweisbare Aktivität für [125 I]IMTO-Azetidinylamid ($p=0,27$), nach 15 Minuten konnte eine um etwa 51,9 % höhere ($p=0,73$) und nach 30 Minuten um 61,4 % höhere ($p=0,73$) Aktivitätsmenge in den Zellen gezeigt werden. Zwar waren diese Unterschiede nicht signifikant. Aufgrund der erhaltenen Messergebnisse könnte man dennoch vermuten, dass IMAZA ein zumindest *in vitro* messbares ähnliches physikalisch-chemisches Profil wie IMTO besitzt, das heißt eventuell *in vivo* eine Verbesserung in der Diagnostik und Therapie bieten könnte. Eine weitere Abklärung der bislang für IMAZA gemessenen Ergebnisse erfolgte daher mittels Zellkompartimentisolation nach Inkubation von NCI H295 Zellen mit IMAZA, um dessen Bindungseigenschaften an der Zelle genauer zu analysieren. Außerdem wurde die Substanz männlichen CD1-Mäusen intravenös appliziert, um Hinweise auf die Verteilung und deren Dynamik *in vivo* gewinnen zu können.

Für [125 I]IEMA hingegen konnte mit Messwerten von $2,3 \pm 0,3$ % im Zellpellet direkt nach Inkubation (entsprechend 10,6 % des Wertes von IMTO, $p=0,0005$) und Zunahme auf maximale $2,72 \pm 0,64$ % nach 30 Minuten (entsprechend 7,5 % des IMTO-Wertes nach 30 Minuten, $p=0,02$) eine signifikant schlechtere Aufnahme von [125 I]IEMA in humane NCI H295-Zellen ermittelt werden. Zwar zeigte sich die Substanz auch nach 45 Minuten mit einer nachweisbaren Aktivität von $2,7 \pm 0,7$ % im Zellpellet stabil (entsprechend 8,8 % des IMTO-Wertes nach 45 Minuten, $p=0,0005$), sodass man gegebenenfalls über die Vorteile der Stabilität der in der Tumorzelle vorhandenen Aktivitätsmenge und ihre therapeutischen Vorteile diskutieren könnte, jedoch konnte aufgrund der sehr geringen Zunahme und somit insgesamt sehr niedrigen Aufnahme in die Zellen nicht davon ausgegangen werden, dass die Substanz [125 I]IEMA unabhängig vom eventuell zugrunde liegenden Mechanismus überhaupt in die Zelle gelangte. Gegebenenfalls haftete der Tracer aufgrund seiner

physikalisch-chemischen Eigenschaften nur an der Zelloberfläche der verwendeten NCI H295-Zellen. Aufgrund dieser Überlegungen wurden mit dieser Substanz keine zusätzlichen Zell-Uptake-Versuche oder Mitochondrien-Isolationsversuche durchgeführt. Die sehr niedrige Aufnahme würde keine sinnvollen Messergebnisse und Erkenntnisse liefern. Da die Substanz allerdings eine, wenn auch nur auf niedrigem Level nachweisbare, für den therapeutischen Einsatz nutzbare Stabilität suggerierte, wurden dennoch *in vivo*-Versuche an männlichen CD1-Mäusen durchgeführt und deren Ergebnisse analysiert.

4.3 Spezifität der Aufnahme von [¹²⁵I]IMAZA in humane NCI H295-Zellen

Wie bereits zu Beginn dieser Arbeit erwähnt, bindet das Hypnotikum Etomidat spezifisch an Nebennierenrindenzellen und führt somit aufgrund einer Blockierung des Enzyms 11- β -Hydroxylase zu einer reversiblen Suppression der Kortisolsynthese (46, 47). Zum Nachweis einer spezifischen Bindung an der Membran der Nebennierenkarzinomzellen wurde daher unter Annahme eines eventuell kompetitiven Mechanismus eine zeitgleiche Inkubation mit dem zu testenden Radiotracer und Etomidat durchgeführt. Hierbei zeigte sich für [¹²⁵I]IMAZA bereits nach Hinzugabe von 1 μ M Etomidat eine Suppression der Aufnahme von [¹²⁵I]IMAZA um $95,0 \pm 2,6$ % im Vergleich zur Aufnahme ohne gleichzeitige Hinzugabe von Etomidat. Die Suppression stieg nach Hinzugabe von 10 μ M Etomidat auf $96,2 \pm 3,1$ % beziehungsweise von 100 μ M Etomidat auf $97,3 \pm 1,8$ % weiter an. Im Vergleich hierzu konnte für IMTO nach Hinzugabe von 1 μ M Etomidat lediglich eine Suppression der Aufnahme um $71,9 \pm 12,0$ % im Vergleich zur Aufnahme ohne gleichzeitige Hinzugabe von Etomidat gezeigt werden. Unter Hinzugabe von 10 μ M Etomidat konnte ebenfalls mit einer Suppression von nur $69,2 \pm 16,8$ % beziehungsweise unter Hinzugabe von 100 μ M Etomidat mit nur $68,5 \pm 8,5$ % eine im Vergleich zu IMTO geringere Suppression nachgewiesen werden. Insgesamt könnte daher in Erwägung eines kompetitiven Mechanismus eine spezifische Bindung von IMAZA ähnlich der Bindung von Etomidat an der Membran der Nebennierenzellen vermutet werden. Zwar handelt es sich hierbei nicht um signifikante Unterschiede, dennoch kann ein messbarer Unterschied nachgewiesen werden. Bezüglich einer möglichen Therapie von Nebennierenkarzinomen und womöglich kanzerogen veränderter Zellstrukturen ergibt sich hierbei jedoch die Frage, inwieweit eine solche

spezifische Bindung auf jede Karzinomzelle übertragen werden kann. Fakt bleibt ein *in vitro* messbarer, vermutlich kompetitiver Effekt bei gleichzeitiger Inkubation mit Etomidat, welcher eine dem Hypnotikum Etomidat verwandte Bindung des Radioaktivtracers [¹²⁵I]IMAZA vermuten lässt.

Um weitere Erkenntnisse über den Bindungsort von IMAZA zu erlangen, wurde die im Folgenden beschriebene Zellfragmentierung nach Inkubation mit [¹²⁵I]IMAZA durchgeführt.

4.4 Aufnahme von [¹²⁵I]IMAZA in humane NCI H295-Zellen

Um die Aufnahme der getesteten Substanzen genauer analysieren zu können, erfolgte eine Bestimmung der relativen Aktivitätsmengen in den einzelnen Zellkompartimenten im zeitlichen Verlauf nach Inkubation humaner NCI H295-Zellen mit dem zu untersuchenden Tracer unter Zuhilfenahme eines Mitochondrien-Isolations-Kits.

Für [¹²⁵I]IMTO konnte nach 30 Minuten Inkubation nach Isolation der einzelnen Kompartimente $47,0 \pm 5,9$ % der Aktivität in der mitochondrialen Fraktion nachgewiesen werden. Im Verlauf fiel die gemessene Aktivität auf $19,9 \pm 1,6$ % nach 60 Minuten ab. Da nach 30 Minuten in der mitochondrialen Fraktion der größte Anteil der Aktivität vorhanden war, konnte ein Bindungsort an den an der inneren Mitochondrienmembran lokalisierten CYP11B-Enzymen bestätigt werden. Der nach 60 Minuten nachgewiesene Abfall der Aktivitätsmenge in den Mitochondrien bei gleichzeitigem Anstieg in den restlichen Kompartimenten könnte am ehesten auf einen Fehler im Versuch zurückzuführen sein. Eine Bindung von [¹²⁵I]IMTO an die mitochondrialen Enzyme CYP11B1 (11 β -Hydroxylase) und CYP11B2 (Aldosteron-Synthase) wurde in früheren Arbeiten jedoch nachgewiesen (50-53). Man könnte in Anlehnung an die im Uptake-Versuch erhaltenen Ergebnisse von einem erreichten Gleichgewicht (steady state) mit daraus resultierendem Aktivitätsabfall im zeitlichen Verlauf ausgehen. Eine andere Option wäre eine eventuell durch den Entzug des Nährmediums bereits eingetretene Apoptose der Karzinomzelle mit darauf folgender Abnahme der Aktivität. Die Ergebnisse stimmten jedoch insgesamt mit den Beobachtungen von Martin Ries und der nuklearmedizinischen Abteilung bei Inkubation von NCI H295-Zellen mit Iodmetomidat und dem Zell-Uptake-Versuch

unter gleichzeitiger Blockierung mit Etomidat überein, was die Hypothese einer Aufnahme des Tracers in die Zellen stützt.

Für [¹²⁵I]IMAZA konnte nach 15 Minuten eine Aktivität von 39,6 ± 5,6 % in der mitochondrialen Fraktion nachgewiesen werden. Mit einem leichten Rückgang auf 35,6 ± 3,3 % nach 30-minütiger Inkubation zeigte sich die nachgewiesene Aktivitätsmenge in der mitochondrialen Fraktion relativ stabil.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der gleichzeitigen Inkubation mit Etomidat sowie den Ergebnissen der Mitochondrien-Isolation kann man bei [¹²⁵I]IMAZA aufgrund der hohen Aktivitätsanreicherung in der mitochondrialen Fraktion insgesamt eine indirekte Bindung analog zu [¹²⁵I]IMTO an den mitochondrialen CYP11B-Enzymen vermuten.

Vergleicht man beide Substanzen nach 30 Minuten, so zeigt [¹²⁵I]IMAZA eine um etwa 25 % niedrigere nachweisbare relative Aktivitätsmenge (p=0,41) in der mitochondrialen Fraktion. In der Zytosolfraktion ergab sich für [¹²⁵I]IMAZA nach 30 Minuten eine um etwa 56 % geringere relative Aktivitätsmenge im Vergleich zu [¹²⁵I]IMTO (p=0,34). Mikrosomal konnte für [¹²⁵I]IMAZA nach 30 Minuten hingegen eine um etwa 88 % höhere relative Aktivitätsmenge nachgewiesen werden (p=0,14). In der Fraktion des Zelldebris zeigte sich nach 30 Minuten eine um etwa 15 % geringere relative Aktivitätsmenge im Vergleich zu IMTO (p=0,22). 30 Minuten nach Inkubation zeigte sich demnach kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Substanzen [¹²⁵I]IMTO und [¹²⁵I]IMAZA bezüglich einer Aufnahme und Verteilung in die Zellkompartimente humaner NCI H295-Zellen. Auch im Hinblick auf die relative Aktivitätsverteilung innerhalb einer Substanz ergaben sich sowohl für [¹²⁵I]IMTO als auch für [¹²⁵I]IMAZA erkennbare Unterschiede. In der Mikrosomenfraktion ergab sich für [¹²⁵I]IMTO nach 60 Minuten eine deutlich höhere Aktivitätsmenge als in der mitochondrialen Fraktion, während dieser Wert nach 30-minütiger Inkubation umgekehrt zu messen gewesen war. Analog hierzu ließ sich auch ein Verlauf für [¹²⁵I]IMAZA nachweisen. Nach 15 Minuten zeigte sich ein im Vergleich zur Mikrosomenfraktion deutlich höherer Wert in der mitochondrialen Fraktion, während auch hier nach 30 Minuten eine deutliche Zunahme der Aktivitätsmenge in der Mikrosomenfraktion zu verzeichnen war. Passend hierzu konnten Verläufe in der Zytosolfractionen beider Substanzen gemessen werden. In Beiden zeigte sich eine Abnahme auf knapp die Hälfte des Ausgangswertes. Lediglich im Vergleich der Messwerte der Zelldebrisfraktionen zeigte sich ein unterschiedliches kinetisches

Verhalten. Da bereits nach 15 Minuten ein Abfall der in der mitochondrialen Fraktion messbaren Radioaktivität zu verzeichnen war, wurde auf eine weitere Testreihe mit 60-minütiger Inkubation verzichtet, da hierdurch offensichtlich keine zusätzlichen Erkenntnisse zu erwarten waren und ein erneuter Wiederanstieg der gemessenen Aktivität sehr unwahrscheinlich schien.

Auf die Durchführung des Experimentes mit der Substanz [^{125}I]IEMA wurde aufgrund der niedrigen Aufnahme des Tracers in die Zelle und den dadurch vermutlich sehr gering ausfallenden Unterschieden in den einzelnen Kompartimenten gänzlich verzichtet.

Insgesamt lässt sich daher nach Durchführung des Experimentes für [^{125}I]IMAZA ein dem [^{125}I]IMTO ähnliches pharmakologisches Profil mit dennoch deutlich divergenter Dynamik und teilweise divergenter Kinetik vermuten. Die Frage nach dem Verhalten des Radioaktivtracers [^{125}I]IMAZA *in vivo* wurde in hierauf folgenden Biodistributionsversuchen an männlichen CD1-Mäusen evaluiert.

4.5 Biodistribution der IMTO-Derivate in männlichen CD1-Mäusen

Um Erkenntnisse einerseits über eine Verteilung der Radioaktivtracer *in vivo* und andererseits über die Dynamik der getesteten Substanzen zu erhalten, wurden die Radiotracer wie beschrieben männlichen CD1-Mäusen intravenös appliziert und anschließend die prozentuale Verteilung der applizierten Aktivität in den unterschiedlichen Organen mittels γ -Counter gemessen.

Betrachtet man die Referenzsubstanz [^{125}I]IMTO, welche bereits durch die Forschungsgruppe um Prof. Dr. Stefanie Hahner erfolgreich in einzelnen Heilversuchen an Patienten Anwendung fand, so zeigte sich nach Injektion der Substanz und anschließender Organdosimetrie ein hierzu passendes Profil. Bereits nach 15-minütiger Inkubation konnte mit einem Wert von $491,1 \pm 170,2$ %ID/g in der Nebenniere eine beträchtliche Dosis nachgewiesen werden, während die Aktivität in den restlichen Organen in Relation hierzu deutlich geringer gemessen wurde. Über den zeitlichen Verlauf konnten nach 30 Minuten $321,3 \pm 170,6$ %ID/g, nach 120 Minuten $90,6 \pm 52,6$ %ID/g und nach 240 Minuten $27,4 \pm 26,0$ %ID/g in den Nebennieren nachgewiesen werden. In Bezug auf den Ausgangswert von $491,1 \pm 170,2$ %ID/g entsprach dies einer Restaktivität von 5,6 % nach 240 Minuten. Mithilfe

dieses mit 240 Minuten relativ lang gewählten Inkubationsintervalles sollten Rückschlüsse auf die Verteilung der Substanz bezüglich einer therapeutischen Anwendung der Substanz erlangt werden, da hierzu eine lange Verweildauer des Radiotracers im Nebennierengewebe notwendig war. Entsprechend der hierbei nach 240 Minuten deutlich nachweisbaren gemessenen Restaktivität wurden bereits erste erfolgversprechende Heilversuche an Patienten durchgeführt. Hierbei konnte durch die Forschungsgruppe um Prof. Dr. Stefanie Hahner beispielsweise in einem Fall im metastasierten Stadium eine deutliche Abnahme der radiologisch detektierbaren Tumormasse im pulmonal metastasierten Tumorstadium erreicht werden (siehe Abschnitt 1.4.2).

Auffallend war die bei [^{125}I]IMTO gemessene initial mit $10,9 \pm 1,7$ %ID/g hohe Aktivität in der Leber, welche für eine starke hepatische enzymatische Bindung und somit auch für einen möglichen Abbau durch hepatische Enzyme sprechen könnte. Hierdurch könnte die begrenzte therapeutische Wirkung begründet sein, welche zur Forderung nach metabolisch stabileren IMTO-Derivaten und somit zu dieser Arbeit führte. Hierzu passte auch der zeitliche Verlauf, bei dem sich eine deutliche Abnahme der unter anderem in der Nebenniere messbaren Aktivität zeigte, was wiederum für einen Abbau der Substanz durch hepatische Enzyme sprach. Passend hierzu konnte *in vitro* ein Abbau der Substanz [^{125}I]IMTO durch hepatische Esterasen mittels HPLC gezeigt werden (siehe Abschnitt 3).

Der in der Schilddrüse initial messbare hohe Wert spricht für eine Bindung von freiem Iod, welches aus [^{125}I]IMTO frei gesetzt worden ist. Die Ursache der Freisetzung könnte einerseits zwar durch eine Instabilität der Substanz [^{125}I]IMTO mit konsekutiver Iodfreisetzung oder durch in der Radiotracer-Lösung befindliches ungebundenes Iod hervorgerufen worden sein. Hiergegen spricht jedoch die relative Stabilität der Substanz [^{125}I]IMTO (siehe Abschnitt 3). Andererseits spricht diese Freisetzung und die über einen langen Verlauf mit $0,8 \pm 0,4$ %ID/g nach 240 Minuten nachweisbare Aktivität für eine eventuelle Iodfreisetzung aus [^{125}I]IMTO durch enzymatischen Abbau. Diese Bindung nahm jedoch im zeitlichen Verlauf ab und kann somit diagnostisch beziehungsweise therapeutisch zunächst vernachlässigt werden. Wünschenswert wäre eine weitere Reduktion des Anteils an freiem Iod, beispielsweise durch eine weitere Aufreinigung der Injektionslösung vor Verabreichung oder eine metabolische Stabilisierung zur Reduktion radioaktiv-induzierter Gewebeschäden oder Folgen der Iodüberdosierung. Da bei der

Anwendung der Radiotracer die Schilddrüse jedoch mit Irenat blockiert wird, fallen die Nebenwirkungen in Bezug auf die Schilddrüse gering aus.

Der mit $11,0 \pm 3,5$ %ID/g hohe initiale Wert im Blut erklärt sich durch die kurz zuvor applizierte radioaktive Substanz und nimmt passend hierzu im zeitlichen Verlauf deutlich ab. Nach 240 Minuten waren mit $2,9 \pm 4,1$ %ID/g etwa 26 % der Ausgangsaktivität vorhanden. Hierzu passen die ermittelten Werte in den gut durchbluteten Organen Herz, Lunge, Milz sowie dem Magen-Darm-Trakt. Die schwankenden Werte könnten eventuell durch eine unterschiedlich stark ausgeprägte Durchblutung im zeitlichen Verlauf, durch Messfehler oder beispielsweise eine nur im sauren pH-Milieu des Magens stattfindende Bindung an Proteine erklärt werden. Die genaue Ursache konnte demnach nur spekulativ beantwortet werden. Wenn auch nur gering ausgeprägt, zeigten sich zum Verlauf der Aktivitätsmesswerte im Blut passende Werte im Muskel- sowie Knochengewebe. Insgesamt war die Anreicherung hier mit Werten bis maximal $2,1 \pm 3,0$ %ID/g im Muskel nach 30 Minuten und $1,0 \pm 0,2$ %ID/g im Knochen nach 15 Minuten und anschließendem kontinuierlichem Abfall im Knochen gering. Myelosuppressive Nebenwirkungen könnten demnach gering ausfallen. Eine weitere Reduktion der Dosis im Knochen wäre jedoch wünschenswert. Positiv zeigte sich die Messung der Aktivität im Gehirn. Diese fiel mit Werten von maximal $0,7 \pm 0,1$ %ID/g nach 15 Minuten und kontinuierlichem Abfall im zeitlichen Verlauf sehr gering aus. Eine radiotoxische Nebenwirkung erscheint somit unwahrscheinlich, jedoch wäre auch hier eine weitere Reduktion nicht nachteilig. Im Hoden wurden ebenfalls mit einem Maximum von $3,4 \pm 1,0$ %ID/g nach 15 Minuten im Vergleich zur Aktivität in der Nebenniere geringe Werte ermittelt. Auch hier zeigte sich ein Abfall der Aktivität im zeitlichen Verlauf; eine Reduktion wäre auch hier zum Schutz der Gonaden wünschenswert.

In Zusammenschau ergeben die Werte in Leber, Blut, Niere und Harnblase eine initiale hepatische Bindung sowie Verstoffwechslung von [125 I]IMTO mit anschließender renaler Elimination über den Harn, welcher zuletzt nach 240 Minuten passend zur zunehmend geringer werdenden vorhandenen Aktivitätsmenge im Blut wieder abnimmt. Hierzu passend zeigten sich in den Versuchen Schwankungen der in der Harnblase und den Nieren gemessenen Werte, welche am ehesten durch die im Urin vorhandene Aktivität beeinflusst wurden. Die durchgeführte Messung der Aktivitätsmenge im Mäuseschwanz diente lediglich dem Nachweis einer möglichen

Kontamination des Schwanzgewebes und damit eines Injektionsfehlers. Hierfür ergab sich bei insgesamt nur gering nachgewiesenen Aktivitätsmengen kein Hinweis, sodass zusammenfassend von einer korrekten intravenösen Injektion bei den durchgeführten Versuchen ausgegangen werden kann.

Aufgrund des insgesamt guten Profils von IMTO erfolgte dessen Anwendung bereits in einzelnen klinischen Heilversuchen (siehe Abschnitte 1.4.2 und 3.5.1). Hierbei konnten erste erfolgversprechende Ergebnisse erreicht werden. Dieser Umstand stellte unter anderem eine Grundlage für diese Arbeit dar. Es galt, stabilere Derivate mit längerer Anreicherung im Tumorgewebe bei gleichzeitig reduzierter relativer Restorgandosis zu entwickeln, um somit die Prognose einer Erkrankung am Nebennierenkarzinom zu verbessern und eventuelle radiotoxische Spätfolgen zu reduzieren.

Die im Nebennierengewebe gemessene Aktivität nach Inkubation mit [¹²⁵I]IMAZA ergab im Vergleich zu [¹²⁵I]IMTO deutlich höhere Werte. So wurde nach 15 Minuten bereits ein Wert von $710,9 \pm 210,5$ %ID/g ermittelt. Der Unterschied war nicht signifikant ($p=0,73$). Dennoch entspricht er einem im Vergleich zu [¹²⁵I]IMTO um etwa 45 % höheren Wert. Nach 30 Minuten wurde für [¹²⁵I]IMAZA das Maximum mit einem Wert von $720,4 \pm 169,7$ %ID/g ermittelt, was weiterhin kein signifikanter Unterschied war ($p=0,47$), aber einem um etwa 124 % höheren Wert im Vergleich zu [¹²⁵I]IMTO nach 30 Minuten entspricht. Nach zwei Stunden fiel der für [¹²⁵I]IMAZA gemessene Wert auf $395,7 \pm 92,6$ %ID/g ab. Hierbei handelte es sich um einen um etwa 337 % höheren Wert im Vergleich zu [¹²⁵I]IMTO, was einer signifikanten Mehranreicherung im Nebennierengewebe entspricht ($p=0,01$).

Nach vier Stunden Inkubation konnte ein Wert von $275,4 \pm 124,0$ %ID/g ermittelt werden. Auch hier war der Wert im Vergleich zu [¹²⁵I]IMTO signifikant höher ($p=0,01$), nämlich um 905 %, die nachweisbare Aktivität in der Nebenniere folglich mehr als zehnmal so hoch.

Allein diese Tatsache ergab schon erste Hinweise auf eventuell mögliche positive therapeutische Konsequenzen nach einem Einsatz der Substanz [¹²⁵I]IMAZA in der Therapie des Nebennierenkarzinoms.

Betrachtet man die in den restlichen Organen im zeitlichen Verlauf gemessenen Aktivitätsmengen, so wird dies bestätigt. So konnten im Blut, in den Knochen, im Herz, in der Lunge, im Gehirn, in den Hoden und im Schwanz der Maus nach 15 Minuten jeweils sehr geringe Aktivitätswerte nachgewiesen werden, welche im

zeitlichen Verlauf stetig abfielen und nach 240 Minuten alle unter 0,07 %ID/g lagen. Bei den Proben von Milz, Magen, Darm und Muskel zeigten sich ebenfalls deutlich niedrigere Werte, welche zwar im Verlauf etwas in ihrer Höhe schwankten, jedoch letztendlich alle nach 240 Minuten auf einen Wert unter 1,07 %ID/g sanken, was in etwa 0,4 % der zu diesem Zeitpunkt im Nebennierengewebe messbaren Restaktivität entsprach. Die initial nach 15 Minuten mit $23,5 \pm 3,4$ %ID/g erhöhten Messwerte im Lebergewebe könnten analog zur Referenzsubstanz [^{125}I]IMTO mit einer erhöhten hepatischen Bindung und gegebenenfalls einem enzymatischen Abbau in Verbindung gebracht werden. Nach 240 Minuten Inkubation war auch hier nur ein Mittelwert von $0,3 \pm 0,1$ %ID/g bei weiterhin auf hohem Niveau stabilen Werten im Nebennierengewebe zu ermitteln. Dies könnte eventuell daran liegen, dass die Substanz [^{125}I]IMAZA zwar temporär hepatisch bindet, nicht aber enzymatisch verändert wird. Ähnlich den Beobachtungen bei [^{125}I]IMTO konnten im zeitlichen Verlauf unterschiedliche Aktivitätslevel im Schilddrüsengewebe gemessen werden. Da das Maximum mit $0,9 \pm 0,3$ %ID/g nach 15 Minuten bei [^{125}I]IMAZA im Vergleich zu $6,3 \pm 9,3$ %ID/g bei IMTO nach 15 Minuten jedoch deutlich geringer ausfiel, konnte mit [^{125}I]IMAZA eine Substanz mit deutlicher Reduktion der thyreoidalen Iodbindung gefunden werden. Dies könnte auf die extrem gute Durchblutung der Schilddrüse zurückzuführen sein. Auch im weiteren zeitlichen Verlauf zeigte sich eine Reduktion der in der Schilddrüse gemessenen Aktivität, passend zu den jeweiligen Werten im Blut. Die Abnahme der gemessenen Aktivität in der Niere im zeitlichen Verlauf von $11,9 \pm 3,6$ %ID/g nach 15 Minuten auf $0,4 \pm 0,1$ %ID/g nach vier Stunden sowie die im Urin sowie der Blase im zeitlichen Verlauf zunächst zunehmenden und schließlich nach vier Stunden wieder abnehmenden Aktivitätsmengen weisen gemeinsam mit den Blut- und Leberwerten auf eine hepatische Bindung nach intravenöser Injektion mit anschließender renaler Elimination hin. Insgesamt könnte man demnach eine dem [^{125}I]IMTO ähnliche Verstoffwechslung vermuten. Die Verweildauer des Radiotracers im Nebennierengewebe war in den Biodistributionsversuchen mit [^{125}I]IMAZA auf erhöhten Leveln deutlich verlängert. Dies könnte auf einen möglichen Benefit in der Therapie des Nebennierenkarzinoms hinweisen. Die schon initial nach 15 Minuten deutlich geringere Aktivität in allen Organen außer Leber, Niere und Urin sowie die deutlich erhöhte Aktivität im Nebennierengewebe im Vergleich zu [^{125}I]IMTO ([^{125}I]IMTO 15 Minuten, NN: $491,1 \pm 170,2$ %ID/g, [^{125}I]IMAZA 15 Minuten, NN: $710,9 \pm 210,5$ %ID/g) sowie der deutliche

Abfall der Aktivität in allen Organen bei weiterhin hohen Aktivitätsmengen in der Nebenniere könnte ein Hinweis auf bessere Einsatzmöglichkeiten von [¹²⁵I]IMAZA in der Diagnostik adrenaler Läsionen sein. Je nach eingesetztem Radionuklid könnten sich hieraus sowohl diagnostische als auch therapeutische Verbesserungen ergeben. Die Klärung des genauen Bindungsmechanismus von [¹²⁵I]IMAZA an adrenalen Karzinomzellen sowie die Frage nach einer Übertragbarkeit auf kanzerogen veränderte Zellen könnten Bestandteil weiterer Forschungsprojekte sein. Aufgrund der guten Daten im HPLC-Stabilitätsversuch und auf niedrigem Niveau stabilen Werten in den Uptake-Versuchen wurde die Substanz [¹²⁵I]IEMA männlichen CD1-Mäusen intravenös verabreicht, um trotz zunächst niedriger Aufnahme in NCI H295-Zellen in *in vitro*-Versuchen Erkenntnisse über ein Verhalten der Substanz *in vivo* erlangen zu können. Die durchgeführten Biodistributionsversuche mit der Substanz [¹²⁵I]IEMA ergaben insgesamt keinen signifikanten Unterschied zu [¹²⁵I]IMTO. Nach 15 Minuten konnten $538,2 \pm 256,6$ %ID/g Aktivität im Nebennierengewebe nachgewiesen werden ($p=0,50$), was einem um 9,5 % höheren Wert im Vergleich zu [¹²⁵I]IMTO nach 15 Minuten entsprach. Nach 30 Minuten sank der für [¹²⁵I]IEMA in der Nebenniere gemessene Wert bereits auf $394,5 \pm 128,4$ %ID/g ab. Dies entsprach einem im Vergleich zu [¹²⁵I]IMTO um etwa 23 % höheren Wert ($p=0,29$). Nach zwei Stunden war der gemessene Wert deutlich auf $96,8 \pm 60,7$ %ID/g gesunken. Dies entsprach einem um etwa 7 % höheren Wert im Vergleich zu [¹²⁵I]IMTO ($p=0,07$). Nach weiteren zwei Stunden konnte eine Restaktivität im Nebennierengewebe von $62,3 \pm 55,7$ %ID/g ermittelt werden. Dieser Wert war jetzt um etwa 127 % höher als bei [¹²⁵I]IMTO nach vier Stunden Inkubation ($p=0,82$). Im direkten Vergleich der Substanzen [¹²⁵I]IMTO und [¹²⁵I]IEMA zeigte [¹²⁵I]IEMA eine messbare Mehranreicherung im Nebennierengewebe zu allen Zeitpunkten. Vor allem nach 240 Minuten zeigte sich eine mehr als doppelt so hohe Anreicherung der Substanz [¹²⁵I]IEMA.

In den restlichen Organen konnte nach 15 Minuten maximal $3,5 \pm 0,9$ %ID/g im Darm nachgewiesen werden. Ausnahmen stellten die Leber mit $19,6 \pm 3,0$ %ID/g und der Urin mit $17,8 \pm 13,7$ %ID/g dar. In allen Organen fiel die gemessene Aktivität im Verlauf deutlich ab. Ausnahmen stellten der Magen mit einer Zunahme auf $3,3 \pm 3,7$ %ID/g sowie der Urin mit einer Zunahme auf $36,5 \pm 10,5$ %ID/g dar. Auch in der Schilddrüse zeigten sich nach vier Stunden mit $1,3 \pm 0,3$ %ID/g geringfügig nachweisbare Aktivitätsmengen, was in Analogie zu den Substanzen [¹²⁵I]IMTO und

[¹²⁵I]IMAZA einerseits durch in der Injektionslösung vorhandenes freies Iod oder aus der Substanz durch enzymatischen Abbau freigesetztes Iod verursacht worden sein könnte. Insgesamt könnte man einen ähnlich dem [¹²⁵I]IMTO und [¹²⁵I]IMAZA zugrundeliegenden Prozess der Verstoffwechslung von [¹²⁵I]IEMA vermuten. Zunächst zeigten sich höhere Werte im Blut, welche im Verlauf abnahmen; initial fand eine hepatische Bindung mit im Verlauf abfallenden Werten statt, ohne die genaue Ursache zu kennen. Schließlich wurde auch [¹²⁵I]IEMA renal eliminiert, was zu den im zeitlichen Verlauf steigenden Werten im Urin und schwankenden Werten in der Blase und dem Nierengewebe passt. Im Vergleich zu [¹²⁵I]IMTO könnte [¹²⁵I]IEMA eine leichte Verbesserung sowohl in der Diagnostik als auch in der Therapie adrenaler Karzinome darstellen, obwohl insgesamt statistisch keine signifikanten Unterschiede in der Biodistribution ermittelt werden konnten. Vergleicht man insgesamt die beiden Substanzen [¹²⁵I]IMAZA und [¹²⁵I]IEMA mit [¹²⁵I]IMTO als Referenz (jeweiliger [¹²⁵I]IMTO-Wert = 1 gesetzt) (siehe Abbildung 20), so erkennt man deutlich, dass beide Substanzen alleine in Bezug auf deren Anreicherung im Nebennierengewebe der Referenzsubstanz [¹²⁵I]IMTO überlegen sein könnten. [¹²⁵I]IMAZA ist im direkten Vergleich zu [¹²⁵I]IMTO im zeitlichen Verlauf sowie insbesondere mit jeweils signifikant höherer Anreicherung der Substanz im Nebennierengewebe mit mehr als 300 % gesteigertem Wert nach 120 Minuten sowie einem mehr als 10-fachen Wert nach 240 Minuten im Vergleich zur Referenz [¹²⁵I]IMTO deutlich überlegen. Die im Rahmen der Biodistributionsversuche an männlichen CD1-Mäusen gewonnenen Ergebnisse müssen bezüglich ihrer Übertragbarkeit auf eine Anwendung beim Menschen mit Vorsicht interpretiert werden, da die Maus- und Mensch-Protein-Sequenz nur zu etwa 70 % übereinstimmt und daher die gewonnenen Erkenntnisse nicht direkt übertragen werden können. Da [¹²⁵I]IMAZA aufgrund der deutlich geringeren Anreicherung der Substanz in den restlichen, zum Teil sehr strahlensensiblen Geweben (z.B. Knochen, Gehirn, Schilddrüse etc.) insgesamt ein deutlich besseres Profil im Vergleich zu IMTO und [¹²⁵I]IEMA zeigte, wurde ein klinischer Einsatz von [¹²⁵I]IMAZA diskutiert. Durch eine externe Institution wurde eine Toxizitätsstudie durchgeführt und nach deren Erhalt ein erster individueller Heilversuch an einer Patientin im metastasierten Tumorstadium durchgeführt (siehe Abschnitt 4.5).

4.6 Einsatzmöglichkeiten von [^{123/131}I]IMAZA in der Diagnostik und Therapie von Nebennierenkarzinomen

Zur weiteren Evaluation der Substanz IMAZA wurden zunächst IMAZA und IMTO *in vitro* miteinander verglichen und deren IC₅₀-Werte bestimmt. Hierbei zeigte IMAZA eine mit IMTO vergleichbare Enzyymbindung (siehe Tabelle 18, Abschnitt 3.5.1) bei gleichzeitig höherer Aufnahme des Tracers in Nebennierenrindenzellen.

Um das neuentwickelte IMAZA bewerten zu können, wurden [¹²³I]IMAZA und [¹²³I]IMTO im Abstand von wenigen Tagen einer Patientin mit metastasiertem Nebennierenkarzinom injiziert und die erhaltenen Szintigramme verglichen. Beide Substanzen zeigten bei der Patientin eine ausgeprägte Anreicherung in den bekannten Tumorkläsionen (Abbildung 21, siehe Abschnitt 3.5).

Bei Auswertung der prominenten thorakalen Metastase (ca. 2 cm Durchmesser) und der beiden zusammenhängenden Kläsionen in der Leber zeigte [¹²³I]IMAZA eine etwa 50 % höhere spezifische Speicherung. Nach einem Tag war das nicht gebundene [¹²³I]IMAZA fast vollständig und überwiegend renal ausgeschieden; nur etwas Darmaktivität und ein marginaler Gewebeuntergrund waren weiterhin zu erkennen. Das führt zu einer signifikanten Überlegenheit von [¹²³I]IMAZA als Diagnostikum. Es waren multiple Kläsionen deutlich sichtbar, die mit [¹²³I]IMTO gar nicht oder nur im Vergleich mit dem [¹²³I]IMAZA-Szintigramm erkennbar waren. Die mit [¹²³I]IMAZA trotz deutlich niedriger applizierter Aktivität eindeutig sichtbare, in den Bildern markierte Metastase hatte einen Durchmesser von nur wenigen Millimetern.

Durch die schnelle Ausscheidung nicht gebundener Aktivität ist bei der Therapie die Strahlenexposition des gesunden Gewebes pro verabreichter Aktivität stark erniedrigt. Bei der in Abschnitt 3.5 gezeigten Patientin (siehe Abbildung 21) ergab die prätherapeutische Dosimetrie, dass die Grenze von 2 Gy für die Blutdosis als Surrogat für das kritische Organ (das Knochenmark) erst bei über 60 GBq [¹³¹I]IMAZA erreicht wurde. Die Therapie wurde mit einer extrem hohen Aktivitätsmenge von 28 GBq [¹³¹I]IMAZA durchgeführt. Auch hier zeigte sich eine sehr spezifische und lang andauernde Speicherung in den Tumormanifestationen; die Therapie wurde von der Patientin praktisch ohne Nebenwirkungen gut toleriert. Eine intratherapeutisch durchgeführte Dosimetrie ergab für das Knochenmark eine Strahlenexposition von nur 1 Gy. Die Herddosen wurden für fünf ausgewählte Kläsionen ermittelt und ergaben selbst bei konservativer Betrachtung extrem hohe

Werte von bis zu 265 Gy. Ein Vergleich der [¹⁸F]FDG-PET-Untersuchungen und der Low-dose-CT vor und neun Wochen nach Therapie nach RECIST-Kriterien ergab eine Stabilisierung der Erkrankung, wobei bei einigen Lungenmetastasen sogar eine Volumenverkleinerung zu beobachten war. Da die Patientin zuvor bei drei Chemotherapien progredient war, ist dies als ein vielversprechender Erfolg zu werten. In Zusammenschau aller im Rahmen dieser Dissertation und der durch die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Stefanie Hahner und Dr. Andreas Schirbel gewonnenen Ergebnisse kann man demnach die zu Beginn dieser Arbeit gestellte Frage und Forderung nach stabileren IMTO-Derivaten zur Diagnostik und Therapie von Nebennierenkarzinomen positiv beantworten. IMAZA bietet aufgrund seiner in den Experimenten detektierten Eigenschaften sowohl deutliche Vorteile in der Diagnostik adrener Läsionen als auch in der Therapie des fortgeschrittenen Nebennierenkarzinoms. Die radiotoxischen Nebenwirkungen sollten aufgrund der reduzierten Aktivitätsmengen in den restlichen Organen insgesamt deutlich geringer ausfallen. Eine Therapie im frühen, operablen Tumorstadium kommt aufgrund der bislang nicht kalkulierbaren Folgen einer Anwendung der Substanz IMAZA nicht in Frage. Auch in Zukunft wird IMAZA daher lediglich eine Therapieoption im UICC-Stadium IV darstellen. Wie die Langzeitprognose nach einer solchen Anwendung und wie es bezüglich einer Reduktion radiotoxischer Nebenwirkungen bei gleichzeitiger Prognoseverbesserung aussieht, bleibt Gegenstand zukünftiger Forschungsarbeiten. Dennoch könnte [¹³¹I]IMAZA die Überlebenszeit im metastasierten Stadium deutlich verlängern.

5. Zusammenfassung

Die Erkrankung an einem Nebennierenkarzinom ist bis heute trotz der vielfältigen Therapieansätze mit einer sehr schlechten Prognose verbunden. Die Entwicklung von [¹³¹I]Iodmetomidat und dessen Anwendung bei Patienten im metastasierten Tumorstadium zeigte großes therapeutisches Potenzial. Aufgrund des enzymatischen Abbaus ist die Verweildauer und effektive Dosis im Tumorgewebe jedoch reduziert, sodass in dieser Arbeit nach einer metabolisch stabileren Substanz bei hoher Affinität zum Zielgewebe und gleichzeitig reduzierter Hintergrundaktivität gesucht wurde. Es wurden mehr als 80 IMTO-Derivate synthetisiert und anschließend deren metabolische Stabilität nach Inkubation mit hepatischen Esterasen mittels Radio-HPLC analysiert. Für die Substanzen [¹²⁵I]IMTO-Azetidinylamid und [¹²⁵I]IMTO-Ethylmethylamid wurden aufgrund ihrer mit [¹²⁵I]Iodmetomidat vergleichbaren chemisch-physikalischen Eigenschaften beziehungsweise ihrer besseren metabolischen Stabilität *in vitro*-Zellversuche zur Evaluation der Aufnahme der Substanzen in NCI H295-Zellen durchgeführt. Hierbei ergab sich kein signifikanter Unterschied bezüglich einer Aufnahme von [¹²⁵I]IMTO-Azetidinylamid. [¹²⁵I]IMTO-Ethylmethylamid wurde signifikant schlechter aufgenommen. Ein Uptake-Versuch mit [¹²⁵I]IMTO-Azetidinylamid unter zeitgleicher Inkubation mit nicht-radioaktiv markiertem Etomidat ergab Hinweise auf einen kompetitiven Aufnahmemechanismus analog der Referenzsubstanz [¹²⁵I]Iodmetomidat.

Mittels Mitochondrien-Isolationsversuchen festigten sich Hinweise auf eine dem [¹²⁵I]Iodmetomidat ähnliche Aufnahme der Substanz [¹²⁵I]IMTO-Azetidinylamid in mitochondriale Strukturen der NCI H295-Zellen.

Zur Evaluation des Verhaltens der Substanzen [¹²⁵I]Iodmetomidat, [¹²⁵I]IMTO-Azetidinylamid und [¹²⁵I]IMTO-Ethylmethylamid wurden *in vivo*-Versuche an männlichen CD1-Mäusen durchgeführt.

Hierbei ergaben sich nach intravenöser Injektion und Messung der relativen Organdosen nach definierten Zeitintervallen deutlich höhere und längere Anreicherungen der Substanz [¹²⁵I]IMTO-Azetidinylamid im Nebennierengewebe bei gleichzeitig sowohl initial als auch im Verlauf deutlich reduzierter Restorgandosis im Vergleich zur Referenz.

Eine extern durchgeführte Toxizitätsstudie ergab Hinweise auf dosisabhängige klinische Effekte, welche im Vergleich zu Etomidat jedoch deutlich geringer ausfielen (siehe Anhang). Insgesamt gab es weder Hinweise auf eine erhöhte Mortalität oder einen hämatologischen Effekt noch auf biochemische oder pathologische Veränderungen nach Applikation der Substanz IMTO-Azetidinylamid. Ein in Auftrag gegebener Ames-Test ergab keinen Hinweis auf eine mögliche Mutagenität der Substanz.

Die nach Abschluss des experimentellen Teils dieser Arbeit durch die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Stefanie Hahner und Dr. Andreas Schirbel durchgeführte Anwendung der Substanz [$^{123/131}\text{I}$]IMTO-Azetidinylamid erbrachte vielversprechende Ergebnisse. Im Vergleich zu [^{125}I]Iodmetomidat zeigte [^{125}I]IMTO-Azetidinylamid aufgrund seiner hochspezifischen Aufnahme in das Zielgewebe ein deutlich besseres Profil bezüglich eines diagnostischen und therapeutischen Einsatzes.

Das Iodmetomidat-Carbonsäureamid [$^{123/131}\text{I}$]IMTO-Azetidinylamid ist ein vielversprechender, im Vergleich zu [$^{123/131}\text{I}$]IMTO metabolisch stabilerer Radiotracer zur Diagnostik adrenaler Läsionen und könnte bei gleichzeitig reduzierten radiotoxischen Nebenwirkungen zur Verbesserung der Therapie adrenaler Karzinome beitragen.

Bezüglich einer generellen Empfehlung der Anwendung von [$^{123/131}\text{I}$]IMTO-Azetidinylamid in der Diagnostik und Therapie von Nebennierenkarzinomen sollten zunächst weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Anhang

Toxizitätsstudie IMAZA

Im Rahmen der extern durchgeführten Toxizitätsstudie wurden acht bis neun Wochen alten CD1-Mäusen beiderlei Geschlechts zunächst sehr hohe Einzeldosen der Substanz IMAZA verabreicht (Dose Escalation): 30, 90 und 120 mg/kg KG. Auf diese Weise sollten zunächst Erkenntnisse darüber erlangt werden, in welchem Bereich überhaupt klinische Effekte auftreten.

Im weiteren Verlauf wurden Konzentrationen von 30 und 90 mg/kg KG täglich über sieben Tage verabreicht. Es erfolgte somit eine wiederholte Injektion von IMAZA.

Folgende Ergebnisse der Toxizitätsstudie konnten gewonnen werden:

Mortalität:	Es verstarb keine einzige Maus.
Klinische Effekte:	Bei einigen Tieren traten dosisabhängig leichte bis moderate Effekte auf: <ul style="list-style-type: none">- spontane Aktivität leicht reduziert- Augen halb geschlossen- Kyphose- Piloerektion
Körpergewicht:	Minimaler Gewichtsverlust bei einigen Tieren
Hämatologie:	Keine toxikologisch relevanten Effekte
Klinische Biochemie:	Keine toxikologisch relevanten Effekte
Pathologie:	Keine sichtbaren Veränderungen feststellbar

Insgesamt konnten die klinischen Effekte im Vergleich zu Etomidat vernachlässigt werden. Hierzu zum Vergleich die bekannten LD₅₀-Werte der Substanz Etomidat: Die Verabreichung einer einzigen ähnlich hohen Dosis einer Etomidat-Lösung (29,5) beziehungsweise von Etomidat-Lipuro (37,0) führt bei jeder zweiten Applikation zum Tod der Maus.

Ames-Test

Zusätzlich wurde ein Ames-Test (Test auf Mutagenität) in Auftrag gegeben. Hierbei ergaben sich keinerlei Hinweise auf eine mögliche Mutagenität der Substanz.

Biometrische Planung im Tierversuchsantrag

(Tierversuchsantrag AZ 55.2-2331.01-93/10)

Den Angaben zur Fallzahl liegen Erfahrungen aus vorangegangenen Untersuchungen mit ^{125}I -Iodmetomidat unserer Arbeitsgruppe zugrunde. Der Traceruptake (%Injektionsdosis/g Organgewicht) von ^{125}I -Iodmetomidat lag 15 min nach i.v.-Injektion um einen Faktor von mindestens 11 über dem Uptake anderer untersuchter Organe. Zielgröße ist der Uptake in der Nebenniere im Vergleich zu weiteren Organen. Für die aktuellen Tracer erwarten wir aufgrund der in vitro-Analysen einen ähnlich spezifischen und hohen Uptake. Unter Zugrundelegung der bereits vorhandenen Daten lässt sich für eine Power von 80% unter der Annahme des Fehlers 1. Art von 0,05 eine Fallzahl von 5 Tieren berechnen. Die Misserfolgsrate bezüglich einer sicheren i. v.-Tracerapplikation lag bei ca. 10%. Daher wird für eine ausreichend gute Abschätzung von Traceruptake und Pharmakokinetik, die letztendlich auch der Dosisberechnung für den Einsatz in klinischen Studien zugrunde gelegt wird, der Einsatz von 6 Tieren pro Substanz als notwendig erachtet. Zunächst soll eine Organdosimetrie mit den sechs im Zellkulturmodell besten I-125-Iodmetomidatestern bzw. Bioisosteren durchgeführt werden. Hierbei werden fünf Tiere pro Zeitpunkt bei 5 Messzeitpunkten (15 min, 30 min, 60 min, 120 min und 180 min) untersucht.

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Sonographisches Bild einer rechten Nebenniere Mit freundlicher Genehmigung der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Klinikum Aschaffenburg, Ltd. Arzt Neonatologie, Dr. med. Christian Wieg	1
Abbildung 2	Physiologische Steuerung der adrenalen Kortisolsekretion	3
Abbildung 3	Steroidbiosynthese	4
Abbildung 4	Skizze des verwendeten Schlauchs zur intravenösen Applikation	17
Abbildung 5	Schematische Darstellung der Mehrstufensynthese der Radiotracer	20
Abbildung 6	Schematische Darstellung der Radioiodierung	21
Abbildung 7	Messung der metabolischen Stabilität von [¹²⁵ I]IMTO	29
Abbildung 8	Messung der metabolischen Stabilität von [¹²⁵ I]IMAZA	30
Abbildung 9	Zell-Uptake [¹²⁵ I]IMTO	31
Abbildung 10	Zell-Uptake [¹²⁵ I]IMAZA	32
Abbildung 11	Zell-Uptake [¹²⁵ I]IEMA	32
Abbildung 12	Inkubation der NCI H295-Zellen unter gleichzeitiger Blockierung mit Etomidat	35
Abbildung 13	Mitochondrien-Isolation [¹²⁵ I]IMTO und [¹²⁵ I]IMAZA	36
Abbildung 14	Uptake von [¹²⁵ I]IMTO in murinen Nebennieren im Rahmen von Biodistributionsexperimenten	38
Abbildung 15	Biodistribution von [¹²⁵ I]IMTO in allen Organen	39
Abbildung 16	Uptake von [¹²⁵ I]IMAZA in murinen Nebennieren im Rahmen von Biodistributionsexperimenten	40
Abbildung 17	Biodistribution von [¹²⁵ I]IMAZA in allen Organen	41
Abbildung 18	Uptake von [¹²⁵ I]IEMA in murinen Nebennieren im Rahmen von Biodistributionsexperimenten	43
Abbildung 19	Biodistribution von [¹²⁵ I]IEMA in allen Organen	43
Abbildung 20	Ergebnisse der Biodistribution, Nebennieren	45

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	TNM-Klassifikation des Nebennierenkarzinoms	6
Tabelle 2	ENSAT-Klassifikation des Nebennierenkarzinoms	7
Tabelle 3	Verwendetes Material für die zellbiologischen Versuche	15
Tabelle 4	Verwendetes Material für die Biodistributionsversuche	16
Tabelle 5	Material zur Herstellung des Schlauches zur intravenösen Radiotracerapplikation	16
Tabelle 6	Verwendete Chemikalien	17
Tabelle 7	Verwendete Puffer, Medien und Lösungen	18
Tabelle 8	In den Versuchen verwendete Radiotracer	18
Tabelle 9	Verwendete Kits	19
Tabelle 10	<i>In vitro</i> Halbwertszeiten von IMTO und IMAZA	31
Tabelle 11	Tabellarische Darstellung der Ergebnisse des Zell-Uptake-Versuches	34
Tabelle 12	Tabellarische Darstellung der relativen Ergebnisse des Zell-Uptake-Versuches	34
Tabelle 13	Übersicht über die Ergebnisse der Mitochondrien-Isolation in Relation zu IMTO	37
Tabelle 14	Absolute Ergebnisse der Biodistribution von [¹²⁵ I]IMTO	40
Tabelle 15	Absolute Ergebnisse der Biodistribution von [¹²⁵ I]IMAZA	42
Tabelle 16	Absolute Ergebnisse der Biodistribution von [¹²⁵ I]IEMA	44
Tabelle 17	Ergebnisse der Biodistribution (Nebennieren) aller Substanzen	44

9. Literaturverzeichnis

1. Frick H, Leonhardt H, Starck D. *Spezielle Anatomie II*. 4 ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 1992
2. Lüllmann-Rauch R. *Histologie*. 3 ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2005
3. Klinker R, Silbernagl S. *Lehrbuch der Physiologie*. 2 ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 1996
4. Eckert R et al. *Tierphysiologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2002
5. Veldhuis JD, Iranmanesh A, Johnson ML & Lizarralde G. *Amplitude, but not frequency, modulation of adrenocorticotropin secretory bursts gives rise to the nyctohemeral rhythm of the corticotropic axis in man*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism; 1990; 71 (2):452-463
6. Rivest S et al. *How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli*. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine; 2000; 223 (1):22-38
7. Borkowski AJ, Levin S, Delcroix C, Mahler A, Verhas V. *Blood cholesterol and hydrocortisone production in man: quantitative aspects of the utilization of circulating cholesterol by the adrenals at rest and under adrenocorticotropin stimulation*. J Clin Invest. 1967;46(5):797
8. Bolté, E, Coudert, S, Lefebvre, Y. *Steroid production from plasma cholesterol II. In vivo conversion of plasma cholesterol to ovarian progesterone and adrenal C19 and C21 steroids in humans*. J Clin Endocrinol Metab. 1967; 38:394

9. Miller WL. *Molecular biology of steroid hormone synthesis*. Endocr Rev. 1988;9(3):295
10. White PC, Curnow KM, Pascoe L. *Disorders of steroid 11 beta-hydroxylase isozymes*. Endocr Rev. 1994;15(4):421
11. White PC. *Disorders of aldosterone biosynthesis and action*. N Engl J Med. 1994;331(4):250
12. Endoh A, Kristiansen SB, Casson PR, Buster JE, Hornsby PJ. *The zona reticularis is the site of biosynthesis of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate in the adult human adrenal cortex resulting from its low expression of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase*. J Clin Endocrinol Metab. 1996;81(10):3558
13. Mantero F, Terzolo M, Arnaldi G, Osella G, Masini AM, AliA, Giovagnetti M, Opocher G, Angeli A. *A survey on adrenal incidentaloma in Italy. Study Group on Adrenal Tumors of the Italian Society of Endocrinology*. J Clin Endocrinol Metab. 2000;85(2):637
14. Siegenthaler W. *Klinische Pathophysiologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2006
15. Xiao XR, Ye LY, Shi LX, Cheng GF, Li YT, Zhou BM. *Diagnosis and treatment of adrenal tumours: a review of 35 years' experience*. Br J Urol. 1998;82(2):199
16. Fassnacht M, Johanssen S, Quinkler M, Bucsky P, Willenberg HS, Beuschlein F et al. *Limited prognostic value of the 2004 International Union Against Cancer staging classification for adrenocortical carcinoma: proposal for a Revised TNM Classification*. Cancer. 2009; 115(2):243-50
17. AJCC (American Joint on Cancer) *Cancer Staging Manual*. 7 ed. New York: Springer Verlag; 2010

18. Loncarevic IF, Hering A, Posorski N, Linden T, Hoyer H, Bucsky P. Number of genomic imbalances correlates with the overall survival for adrenocortical cancer in childhood. *Pediatr Blood Cancer*. 2008;51(3):356-362
19. Allolio B, Fassnacht M. *Clinical review: Adrenocortical carcinoma: clinical update*. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(6):2027
20. Fassnacht M, Allolio B. *Clinical management of adrenocortical carcinoma*. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2009;23(2):273
21. Arit W et al. *Urine steroid metabolomics as a biomarker tool for detecting malignancy in adrenal tumors*. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 Dec; 96(12):3775-84. Epub 2011 Sep 14
22. Young WF Jr. *Clinical practice. The incidentally discovered adrenal mass*. *N Engl J Med*. 2007;356(6):601
23. Groussin L et al. *18F-Fluorodeoxyglucose positron emission tomography for the diagnosis of adrenocortical tumors: a prospective study in 77 operated patients*. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(5):1713
24. Hennings J, Hellman P, Ahlström H, Sundin A. *Computed tomography, magnetic resonance imaging and 11C-metomidate positron emission tomography for evaluation of adrenal incidentalomas*. *Eur J Radiol*. 2009;69(2):314
25. Young WF Jr. *Clinical practice. The incidentally discovered adrenal mass*. *N Engl J Med*. 2007;356(6):601
26. Allolio B, Hahner S, Weismann D, Fassnacht M. *Management of adrenocortical carcinoma*. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2004;60(3):273

27. Schteingart DE, Doherty GM, Gauger PG, Giordano TJ, Hammer GD, Korobkin M, Worden FP. *Management of patients with adrenal cancer: recommendations of an international consensus conference*. *Endocr Relat Cancer*. 2005;12(3):667
28. Reibetanz J, Jurowich C, Erdogan I, Nies C, Rayes N, Dralle H, Behrend M, Allolio B, Fassnacht M, German ACC study group. *Impact of lymphadenectomy on the oncologic outcome of patients with adrenocortical carcinoma*. *Ann Surg*. 2012 Feb;255(2):363-9
29. Purushothaman K, Puthiyottil SS, Bhattacharya T, Muttath G. *Adjuvant Radiation Therapy and Local Control After Surgical Resection in Patients With Localized Adrenocortical Carcinoma: In Regard to Sabolch et al*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2015 Oct 1;93(2):465
30. Bertagna C, Orth DN. *Clinical and laboratory findings and results of therapy in 58 patients with adrenocortical tumors admitted to a single medical center (1951 to 1978)*. *Am J Med*. 1981;71(5):855
31. Stojadinovic A, Ghossein RA, Hoos A, Nissan A, Marshall D, Dudas M, Cordon-Cardo C, Jaques DP, Brennan MF. *Adrenocortical carcinoma: clinical, morphologic, and molecular characterization*. *J Clin Oncol*. 2002;20(4):941
32. Hough AJ, Hollifield JW, Page DL, Hartmann WH. *Prognostic factors in adrenal cortical tumors. A mathematical analysis of clinical and morphologic data*. *Am J Clin Pathol*. 1979;72(3):390
33. Schteingart DE, Motazed A, Noonan RA, Thompson NW. *Treatment of adrenal carcinomas*. *Arch Surg*. 1982;117(9):1142.
34. Gröndal S, Cedermark B, Eriksson B, Grimelius L, Harach R, Kristoffersson A, Rastad J, Udén P, Akerström G. *Adrenocortical carcinoma. A retrospective study of a rare tumor with a poor prognosis*. *Eur J Surg Oncol*. 1990;16(6):500

35. Wajchenberg BL, Albergaria Pereira MA, Medonca BB, Latronico AC, Campos Carneiro P, Alves VA, Zerbini MC, Liberman B, Carlos Gomes G, Kirschner MA. *Adrenocortical carcinoma: clinical and laboratory observations*. *Cancer*. 2000;88(4):711
36. Terzolo M, Angeli A, Fassnacht M, Daffara F, Tauchmanova L, Conton PA, Rossetto R, Buci L, Sperone P, Grossrubatscher E, Reimondo G, Bollito E, Papotti M, Saeger W, Hahner S, Koschker AC, Arvat E, Ambrosi B, Loli P, Lombardi G, Mannelli M, Bruzzi P, Mantero F, Allolio B, Dogliotti L, Berruti A. *Adjuvant mitotane treatment for adrenocortical carcinoma*. *N Engl J Med*. 2007;356(23):2372.
37. Schteingart DE. *Adjuvant mitotane therapy of adrenal cancer - use and controversy*. *N Engl J Med*. 2007;356(23):2415
38. Fassnacht M, Terzolo M, Allolio B, Baudin E, Haak H, Berruti A, Welin S, Schade-Brittinger C, Lacroix A, Jarzab B, Sorbye H, Torpy DJ, Stepan V, Schteingart DE, Arlt W, Kroiss M, Leboulleux S, Sperone P, Sundin A, Hermsen I, Hahner S, Willenberg HS, Tabarin A, Quinkler M, de la Fouchardière C, Schlumberger M, Mantero F, Weismann D, Beuschlein F, Gelderblom H, Wilmink H, Sender M, Edgerly M, Kenn W, Fojo T, Müller HH, Skogseid B, FIRM-ACT Study Group. *Combination chemotherapy in advanced adrenocortical carcinoma*. *N Engl J Med*. 2012;366(23):2189
39. Wortmann S, Quinkler M, Ritter C, Kroiss M, Johanssen S, Hahner S, Allolio B, Fassnacht M. *Bevacizumab plus capecitabine as a salvage therapy in advanced adrenocortical carcinoma*. *Eur J Endocrinol*. 2010 Feb;162(2):349-56. Epub 2009 Nov 10
40. Polat B, Fassnacht M, Pfreundner L, Guckenberger M, Bratengeier K, Johanssen S, Kenn W, Hahner S, Allolio B, Flentje M. *Radiotherapy in adrenocortical carcinoma*. *Cancer*. 2009;115(13):2816
- 40a. <http://www.nebennierenkarzinom.ukw.de/info-zur-erkrankung/therapie.html>

41. Abiven G, Coste J, Groussin L, Anract P, Tissier F, Legmann P, Dousset B, Bertagna X, Bertherat J. *Clinical and biological features in the prognosis of adrenocortical cancer: poor outcome of cortisol-secreting tumors in a series of 202 consecutive patients*. J Clin Endocrinol Metab. 2006;91(7):2650
42. Luton JP, Cerdas S, Billaud L, Thomas G, Guilhaume B, Bertagna X, Laudat MH, Louvel A, Chapuis Y, Blondeau P. *Clinical features of adrenocortical carcinoma, prognostic factors, and the effect of mitotane therapy*. N Engl J Med. 1990;322(17):1195
43. Terzolo M, Angeli A, Fassnacht M, Daffara F, Tauchmanova L, Conton PA, Rossetto R, Buci L, Sperone P, Grossrubatscher E, Reimondo G, Bollito E, Papotti M, Saeger W, Hahner S, Koschker AC, Arvat E, Ambrosi B, Loli P, Lombardi G, Mannelli M, Bruzzi P, Mantero F, Allolio B, Dogliotti L, Berruti A. *Adjuvant mitotane treatment for adrenocortical carcinoma*. N Engl J Med. 2007;356(23):2372
44. Vassilopoulou-Sellin R, Schultz PN. *Adrenocortical carcinoma*. Clinical outcome at the end of the 20th century. Cancer. 2001;92(5):1113
45. Bergen JM, Smith DC. *A review of etomidate for rapid sequence intubation in the emergency department*. J Emerg Med. 1997;15(2):221
46. Schenarts CL, Burton JH, Riker RR. *Adrenocortical dysfunction following etomidate induction in emergency department patients*. Acad Emerg Med. 2001;8(1):1
47. Cohan P, Wang C, McArthur DL, Cook SW, Dusick JR, Armin B, Swerdloff R, Vespa P, Muizelaar JP, Cryer HG, Christenson PD, Kelly DF. *Acute secondary adrenal insufficiency after traumatic brain injury: a prospective study*. Crit Care Med. 2005;33(10):2358
48. den Brinker M, Joosten KF, Liem O, de Jong FH, Hop WC, Hazelzet JA, van Dijk M, Hokken-Koelega AC. *Adrenal insufficiency in meningococcal sepsis: bioavailable cortisol levels and impact of interleukin-6 levels and intubation*

- with etomidate on adrenal function and mortality.* J Clin Endocrinol Metab. 2005;90(9):5110
49. Drake WM, Perry LA, Hinds CJ, Lowe DG, Reznick RH, Besser GM. *Emergency and prolonged use of intravenous etomidate to control hypercortisolemia in a patient with Cushing's syndrome and peritonitis.* J Clin Endocrinol Metab. 1998;83:3542-3544
 50. *The European Pharmacopeia 5.0; Etomidate, Monograph 1514;* Council of Europe, Maisonneuve: Sainte-Ruffine, France, 2005
 51. Berger, M. L.; Hahner, S.; Hammerschmidt, F.; Schirbel, A.; Yu, J.; Zolle, I. *Inhibitors of Adrenal P-450c11 Hydroxylase Characterized by Two Radioligands and Steroid Hormone Secretion.* Presented at the International Symposium on Trends in Radiopharmaceuticals (IAEA), Vienna, Austria, November 14–18, 2005
 52. Zolle IM, Berger ML, Hammerschmidt F, Stefanie Hahner S, Schirbel A, Peric-Simov B. *New Selective Inhibitors of Steroid 11-Hydroxylation in the Adrenal Cortex. Synthesis and Structure–Activity Relationship of Potent Etomidate Analogues.* J. Med. Chem. 2008;51:2244–2253
 53. Avram A, Hahner S. *Functional Imaging of Adrenocortical Carcinoma. Basic Science and Clinical Concepts.* Springer Science and Business Media, LLC 2011
 54. Schirbel A, Zolle I, Hammerschmidt F, Berger M, Schiller D, Kvaternik H, Reiners C. *4-[¹²³I/¹³¹I]iodometomidate as a radioligand for functional diagnosis of adrenal disease: synthesis, structural requirements and biodistribution.* Radiochim Acta 2004;92:297-303
 55. Hahner S, Stuermer A, Kreissl M, Reiners C, Fassnacht M, Haenscheid H, Beuschlein F, Zink M, Lang K, Allolio B, Schirbel A. *[¹²³I]iodometomidate for*

Molecular Imaging of Adrenocortical Cytochrome P450 Family 11B Enzymes.
J Clin Endocrinol Metab. 2008; 93(6):2358-2365

56. Hahner S, Kreissl M, Schirbel A. *Functional Characterization of Adrenal Lesions Using [123I]MTO-SPECT/CT.* J Clin Endocrinol Metab. 2013; 98: 1508-1518
57. Grünwald und Karl-Michael Derwahl: *Diagnostik und Therapie von Schilddrüsenerkrankungen.* Frankfurt, Berlin 2014 S.109
58. Hahner S, Kreissl M, Fassnacht M, Schirbel A. *[¹³¹I]Iodometomidate for Targeted Therapy of Advanced Adrenocortical Carcinoma.* J Clin Endocrinol Metab. 2012; 97: 914-922
59. Nassar A. *Drug Metabolism Handbook: Concepts and Applications*, 1. Auflage, John Wiley & Sons, 2009, Seite 257 ff]
60. Nassar A, Kamel A, Clarimont C. *Drug Discovery Today.* 2004; 9: 1020-1028
61. Blanchard S et al. *Pharm. Biotechnol.* 1999; 11: 445-463

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Durchführung und Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Zunächst möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Stefanie Hahner für die Möglichkeit der Doktorarbeit in der Endokrinologie und für die stets aufopferungsvolle und tatkräftige Unterstützung und geduldige Beratung bei allen Fragen bedanken.

Ein besonderes Dankeschön gilt Herrn Prof. Dr. Bruno Allolio, der stets großes Interesse an den Forschungsprojekten und Doktorarbeiten eines jeden einzelnen Doktoranden seiner Klinik hatte und der uns allen mit Rat und ausführlichen Erläuterungen jederzeit zur Seite stand. Wir werden ihn immer in guter Erinnerung behalten.

Ein wirklich herzliches und großes Dankeschön gilt Frau Dr. Britta Heinze, die mir zu jederzeit und bei jedem Problem sofort mit Rat und Tat zur Seite stand und sich aufopferungsvoll und selbstlos für die Nachwuchsforschung eingesetzt hat. Ihr verdanke ich es, dass meine Doktorarbeit mir so viel Freude bereitet hat und so produktiv war. Außerdem bedanke ich mich bei Lukas Nannen und Sabine Gabor für die schöne gemeinsame Zeit im Labor und die gegenseitige, tatkräftige Unterstützung bei unseren Projekten.

Desweiteren gilt mein Dank dem gesamten Team der Endokrinologie des Universitätsklinikums Würzburg sowie der nuklearmedizinischen Abteilung. Ganz besonders danken möchte ich Herrn Dr. Andreas Schirbel für die schnelle und unkomplizierte Synthese der Radiotracer und die großartige Unterstützung bei allen chemischen Fragen und der geduldigen Beratung bei allen aufkommenden Fragen.

Ebenso gilt der Dank dem Tierpfleger-Team des ZEMM der Universität Würzburg, die sich wirklich liebevoll um die in den Tierversuchen verwendeten Tiere gekümmert haben.

Ohne so viele helfende und beratende Hände wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Zum Schluss möchte ich mich noch ganz herzlich bei meiner Familie, insbesondere meiner Mutter für das Korrekturlesen und die Unterstützung bei der Umsetzung dieser Arbeit und bei meinem Vater für die stete Unterstützung und die Möglichkeit, studieren zu können, bedanken.