

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Pharmazeutin Anastasia Loktev

aus Omsk, Russische Föderation

Tag der mündlichen Prüfung:

**Identifizierung und Charakterisierung
FAP-spezifischer Liganden für die zielgerichtete
Diagnostik und Therapie maligner Tumoren**

Gutachter: Prof. Dr. Walter Mier

Prof. Dr. Gert Fricker

„Um also Chemotherapie erfolgreich zu betreiben, müssen wir Substanzen aufsuchen, bei denen die (...) Abtötungskraft die Körperschädigung in der Weise überwiegt, dass eine Abtötung (...) ohne erhebliche Schädigung des Organismus möglich ist. Wir wollen also (...) möglichst isoliert treffen, das heißt, wir müssen zielen lernen, chemisch zielen lernen! (...) Die Auffindung solcher spezifischen Heilmittel ist (...) das höchste Ziel der ärztlichen Kunst!“

Paul Ehrlich. Über den jetzigen Stand der Chemotherapie, 1908.

Abstract

The identification of novel tumor-specific ligands as transport vehicles for both diagnostic and therapeutic radionuclides represents a major objective in nuclear medical oncology research. The use of selective compounds with high affinity to their target structure results in an increased tumor uptake of the radionuclide, while minimizing undesired radiation exposure of healthy tissue. Based on increasing knowledge about tumor physiology as well as ongoing technological progress, numerous tumor-targeting compounds have been identified and transferred into clinical practice. However, the majority of these compounds comprises antibodies, which feature serious deficiencies, such as poor membrane permeability and tissue penetration, slow clearance and immunogenicity. Peptides, instead, represent a favorable alternative with regard to size, pharmacokinetics and the possibility to be produced cost-effectively in large quantities by automated solid phase synthesis.

Phage display technology represents a powerful tool for the *de novo* identification of target-specific peptides. This technique is based on the presentation of large polypeptide libraries on the surface of bacteriophages. To this end, the phage genome is manipulated to display the foreign peptides, which are physically linked to their encoding nucleic acids. Following several iterative rounds of incubation with any target protein of interest, the enriched target-specific ligands can therefore be easily identified by DNA sequencing.

Tumor growth and malignancy are not only affected by the characteristics of cancer cells but strongly depend on the attributes of several different cell types within the local tumor microenvironment. Cancer-associated fibroblasts (CAFs) represent an important subpopulation of these stromal cells and are known to promote tumor growth, inflammation and metastasis. They account for a large part of the tumor mass and are genetically more stable and therefore less susceptible to the development of therapy resistance than cancer cells per se. In contrast to normal fibroblasts, CAFs entail a number of tumor-specific marker proteins such as the integral membrane peptidase *Fibroblast Activation Protein- α* (FAP). This protein is highly expressed in the microenvironment of more than 90 % of epithelial tumors including breast, lung and pancreatic carcinoma. Overexpression of FAP is associated with a poor prognosis in a wide range of different cancers. Due to very low expression

levels in normal tissues, FAP represents an attractive molecular target for the development of tumor-specific diagnostics and therapies.

To identify novel FAP-specific peptides using phage display, two combinatorial libraries based on the scaffold structures *Sunflower Trypsin Inhibitor-1* (SFTI-1) and Min-23 were built. They comprise a cyclic, disulfide-bridged backbone and a variable sequence consisting of six to ten random amino acids. After incubation of the libraries with the target protein in four rounds of biopanning, the FAP-specific ligands were isolated and their sequence determined using next-generation sequencing. A selection of suitable peptides was synthesized by solid phase synthesis, purified and characterized in different cell-based radioligand assays.

In contrast to the SFTI-1 based biopanning, which did not lead to any enrichment of FAP-specific peptides, the use of the Min-23 library was successful in identifying several FAP-targeting ligands. However, these peptides showed a very low affinity to their target protein, which most likely results from a rapid degradation. It is conceivable that the enzymatic function of the membrane protein effectuates a rapid hydrolysis of the small peptides upon initial binding. A solution to this is the use of an alternative scaffold, which impedes enzymatic cleavage or ensures cell internalization after hydrolysis.

In this context, the cyclotide-based FAP-specific miniprotein MC-FA-012, identified by BionTech AG, was characterized regarding target affinity, specificity and pharmacokinetic profile in radioligand binding assays as well as in FAP-positive tumor-bearing mice. In contrast to the Min-23-based peptides, MC-FA-012 and its trimerized version DOTA-(MC-FA-012)₃ demonstrated high affinity to human FAP, while no substantial binding to the structurally related protein CD26 was observed. In addition, DOTA-(MC-FA-012)₃ rapidly accumulated in FAP-positive tumor xenografts *in vivo* and showed negligibly low unspecific binding in healthy tissue, except for the kidneys. A first clinical analysis of the radiolabeled compound in patients with metastatic pancreatic carcinoma revealed a robust accumulation of the tracer in the primary tumor as well as in lymph node and bone metastases. In contrast, tracer uptake into normal tissue was very low. The radioactivity was cleared rapidly from the blood stream and excreted predominantly via the kidneys, resulting in high contrast PET images.

Since the high accumulation of DOTA-(MC-FA-012)₃ in the kidneys could not be sufficiently reduced by different competition strategies, further development of the radiotracer regarding a potential therapeutic application was not pursued. The investigation of the structure-activity relations of MC-FA-012 revealed that both the scaffold and certain

functional groups within the FAP-specific binding sequence account for high FAP affinity. Introducing even minor changes in the molecule's conformation resulted in an almost complete loss of binding.

Consequently, a different approach towards the development of a FAP-specific compound was adopted by designing the small molecules FAPI-01 to FAPI-15 based on a potent FAP-inhibitor. Each of the compounds demonstrated high specific binding to human and murine FAP and internalized rapidly into FAP-expressing cells. Imaging and biodistribution studies in xenotransplanted mice proved a rapid tumor uptake of the tracers in a genetically modified FAP-overexpressing tumor model as well as in human FAP-negative tumors due to endogenous murine FAP expression. Notably, the radiotracers demonstrated rapid renal clearance without substantial binding to non-cancerous tissue. Due to their advantageous pharmacokinetics and an excellent stability in human serum, the compounds FAPI-02 and FAPI-04 were selected for further clinical investigation. Using PET/CT, biodistribution of the radiotracers was analyzed in patients with metastasized epithelial cancers, including breast, lung, pancreatic and colon carcinoma as well as in high-grade glioblastomas. Both tracers rapidly accumulated in the primary tumor as well as in soft tissue, lymph node and bone metastases. In contrast, tracer uptake into normal tissue was very low, resulting in favorable tumor-to-organ ratios and high contrast images.

Comparative imaging in one patient with locally advanced lung adenocarcinoma revealed an obvious advantage of FAPI-02 compared to the commonly used PET tracer ^{18}F -FDG. FAPI-02 showed a higher tumor uptake and significantly lower activities in blood and liver, resulting in higher image contrast with better visibility of metastatic lesions. In contrast to FDG, which highly accumulates in cells with high glucose consumption, e.g. the brain or inflammatory tissue, FAPI-02 selectively targets FAP-expressing carcinomatous lesions. This opens up new perspectives for the precise diagnosis of malignant lesions in tissues with high metabolic activity, such as liver or brain.

Furthermore, various approaches for a potential therapeutic application of the FAP-ligands are currently being investigated, including different radionuclides and alternative effector molecules, such as chemotherapeutics or immunomodulators. Given the possibility to use either diagnostic or therapeutic nuclides with the same molecule, FAPI-02 allows simple stratification of patient cohorts likely to benefit from a therapeutic intervention.

Zusammenfassung

Die Identifizierung neuer tumorspezifischer Liganden für den Transport von diagnostischen und therapeutischen Radionukliden ist ein wichtiges Ziel der nuklearmedizinisch-onkologischen Forschung. Durch den Einsatz selektiver Verbindungen mit hoher Affinität zur adressierten Zielstruktur soll die Aufnahme des Radiopharmakons in den Tumor erhöht und eine unnötige Strahlenbelastung von gesundem Gewebe minimiert werden. Dank zunehmender Erkenntnisse über die Physiologie von Tumoren sowie kontinuierlich verbesserter technischer Möglichkeiten konnten bereits zahlreiche zielgerichtete Liganden identifiziert werden. Bei dem Großteil dieser Verbindungen handelt es sich um Antikörper, die aufgrund ihrer Größe und ihrer Immunogenität jedoch auch einige Nachteile mit sich bringen. Im Gegensatz dazu stellt der Einsatz von Peptiden hinsichtlich Größe, Membranpermeabilität und Pharmakokinetik eine sinnvolle Alternative dar.

Eine Möglichkeit für die Identifizierung neuer Peptidliganden ist das Screening rekombinanter Bibliotheken im Phagen-Display. Dieses biotechnologische Verfahren beruht auf der Präsentation beliebiger Polypeptide an der Oberfläche von Bakteriophagen, deren Genom die für die Peptide kodierende DNA enthält. Während einer Inkubation der Phagenbibliothek mit dem Zielprotein über mehrere Runden, dem sogenannten Biopanning, erfolgt eine Anreicherung der Target-affinen Peptide, deren Primärstruktur durch die Sequenzierung der korrespondierenden DNA ermittelt werden kann.

Das Wachstum und die Metastasierung maligner Neoplasien sind nicht nur auf die Eigenschaften der Tumorzellen zurückzuführen, sondern werden erst durch eine Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen im Tumorstroma ermöglicht. Hierzu gehören auch die Tumorassoziierten Fibroblasten (CAFs), die in unterschiedlichen Tumorarten nachgewiesen werden können und eine wichtige Rolle für das Wachstum, die Progression sowie die Migration maligner Neoplasien spielen. Sie bilden einen Großteil des Tumorstromas und sind genetisch deutlich stabiler und somit weniger anfällig für die Entwicklung einer Therapieresistenz als Tumorzellen selbst. Im Gegensatz zu normalen Fibroblasten exprimieren CAFs eine Reihe von tumorspezifischen Oberflächenproteinen, wie das *Fibroblast Activation Protein- α* (FAP), eine membranständige Serinprotease, deren hohe intratumorale Expression

mit einer schlechten Tumorprognose assoziiert wird. Indessen kann das Protein in benignen Läsionen oder gesundem adultem Gewebe nicht nachgewiesen werden, was es zu einer idealen Zielstruktur für die Entwicklung zielgerichteter Verbindungen für die Tumordiagnostik und -therapie macht.

Für die Identifizierung neuer peptidischer FAP-Liganden mit Hilfe der Phagen-Display-Technologie wurden kombinatorische Bibliotheken eingesetzt, bei welchen sechs bis zehn variable Aminosäuren in eine Gerüststruktur, ein sogenanntes Scaffold, eingebunden sind. Hierfür wurden die zyklischen, durch Disulfidbrücken stabilisierten Peptide *Sunflower Trypsin Inhibitor-1* (SFTI-1) und Min-23 verwendet. Nach Inkubation der Bibliotheken mit dem Zielprotein über vier Runden wurden die FAP-spezifischen Binder isoliert und deren Peptidsequenz mittels *Next Generation Sequencing* bestimmt. Eine geeignete Auswahl der angereicherten Peptide wurde mittels Festphasensynthese und anschließender Oxidation in Lösung hergestellt und nach radioaktiver Markierung im Zellbindungsassay hinsichtlich Targetaffinität und -spezifität charakterisiert. Im Gegensatz zum Biopanning mit der SFTI-1-Bibliothek, welches zu keiner Anreicherung FAP-spezifischer Peptide führte, gelang es mit Hilfe der Min-23-Bibliothek, mehrere Target-spezifische Binder zu identifizieren, deren Affinität gegenüber dem Zielprotein jedoch sehr gering war. Eine mögliche Erklärung hierfür liegt in einer unzureichenden Stabilität der Liganden, welche aufgrund der enzymatischen Funktion des Membranproteins nach initialer Bindung rasch hydrolysiert werden. Dieses Problem könnte durch den Einsatz eines alternativen Scaffolds umgangen werden, welches nicht enzymatisch gespalten wird bzw. auch nach hydrolytischer Spaltung eine ausreichend hohe Internalisierung des Liganden in die Zelle ermöglicht.

Vor diesem Hintergrund wurde der von BionTech AG entwickelte cyclotidische FAP-Ligand MC-FA-012 hinsichtlich Targetaffinität und -spezifität in Zellbindungs- sowie Organverteilungsstudien in tumortragenden Mäusen charakterisiert. Im Gegensatz zu den kleineren Min-23-Peptiden zeigte MC-FA-012 und seine trimerisierte Variante DOTA-(MC-FA-012)₃ eine deutlich höhere Bindung an humanes FAP, wobei die Bindung an das strukturell verwandte Membranprotein CD26 vernachlässigbar gering war. Darüber hinaus reichte sich DOTA-(MC-FA-012)₃ rasch in FAP-positiven Tumoren im Tiermodell an und zeigte keine unspezifische Bindung in gesundem Gewebe, mit Ausnahme der Niere. Auch eine erste klinische Untersuchung von Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom unter Verwendung der radiomarkierten Substanz lieferte vergleichbare Ergebnisse und diagnostische PET-Bilder mit einem ausgezeichneten Bildkontrast. Aufgrund einer hohen Akkumulation der Substanz in der Niere, die durch unterschiedliche Kompetitionsstrategien bislang nicht ausreichend reduziert werden konnte, wurde eine weitere Entwicklung des Radiotra-

cers im Hinblick auf eine potentielle therapeutische Anwendung nicht weiter verfolgt. Die Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehungen von MC-FA-012 zeigte, dass sowohl das Scaffold als auch bestimmte funktionelle Gruppen innerhalb der FAP-spezifischen Bindesequenz für die hohe FAP-Bindung verantwortlich sind. Selbst eine minimale Veränderung der Konformation des Moleküls resultierte in einem nahezu vollständigen Bindungsverlust.

Weiterhin wurden, ausgehend von einem selektiven FAP-Inhibitor, die FAP-spezifischen Tracer FAPI-01 bis FAPI-15 entwickelt und in Zellbindungsstudien sowie im Tiermodell charakterisiert. Alle Verbindungen zeigten eine hohe und spezifische Bindung an humanes und murines FAP *in vitro* und internalisierten nahezu vollständig in FAP-positive Zellen. Bildgebungs- und Bioverteilungsstudien in tumortragenden Mäusen demonstrieren eine schnelle Tumoraufnahme der Tracer, keine unspezifische Bindung in gesundem Gewebe sowie eine rasche renale Clearance. Dabei akkumulierten die Tracer sowohl in einem gentechnisch modifizierten Tumormodel, das sich durch eine Überexpression des humanen Proteins auszeichnet, als auch in ursprünglich FAP-negativen Xenotransplantaten, was auf eine Bindung des Liganden an endogenes murines FAP zurückzuführen ist. Aufgrund ihrer vorteilhaften Pharmakokinetik sowie einer hohen Stabilität in humanem Serum wurden FAPI-02 und FAPI-04 in einer ersten klinischen Studie untersucht. Hierfür wurde die Bioverteilung der radiomarkierten Tracer in Patienten mit diversen epithelialen Tumoren, u.a. Brust-, Lungen-, Pankreas- und Kolonkarzinom, mittels PET analysiert. Beide Tracer akkumulierten schnell im Primärtumor sowie in Weichteil-, Lymphknoten- und Knochenmetastasen, jedoch nicht in gesundem Gewebe, was zu einer vorteilhaften Tumor-Organverteilung führte. Im Vergleich zu dem nuklearmedizinischen Standarddiagnostikum ^{18}F -FDG zeigte FAPI-02 bei einem Patienten mit einem metastasierten Lungentumor eine höhere Tumoraufnahme und eine deutlich geringere Aktivität im Blut und in der Leber. Dies resultierte in einem höheren Bildkontrast und einer besseren Darstellung der malignen Läsionen. Im Gegensatz zum Glucose-basierten Radiotracer, welcher in Organen mit einem physiologisch hohen Energieumsatz sowie in entzündlichem Gewebe eine starke Anreicherung zeigt, akkumulierte FAPI-02 lediglich in den karzinomatösen Läsionen, die das Zielprotein exprimieren. Dies eröffnet neue Perspektiven für die zielgerichtete Diagnose von malignen Läsionen in Geweben mit hoher metabolischer Aktivität, wie der Leber oder dem Gehirn. Darüber hinaus werden derzeit verschiedene Ansätze für eine therapeutische Anwendung des FAP-Liganden untersucht. Hierzu gehört eine Kopplung des FAP-affinen Strukturelementes mit therapeutisch wirksamen Radionukliden sowie alternativen Effektmolekülen, wie z.B. Chemotherapeutika oder Immunmodulatoren.

Publikationen, Poster und Vorträge

Patente

Europäische Patentanmeldung EP 18155420.5

FAP-Inhibitor (für die Kombination mit Radionukliden)

Erfindungsanteil: 30%

Europäische Patentanmeldung EP 18155419.7

FAP-Inhibitor (für die Kombination mit Immunmodulatoren und Chemotherapeutika)

Erfindungsanteil: 20%

Publikationen

Loktev A, Haberkorn U, Mier W.

Multicyclic Peptides as Scaffolds for the Development of Tumor Targeting Agents.

Curr Med Chem. 2017;24(20):2141-2155.

Loktev A, Lindner T, Mier W, Debus J, Altmann A, Jäger D, Giesel F, Kratochwil C, Barthe P, Roumestand C, Haberkorn U.

A New Method for Tumor Imaging by Targeting Cancer Associated Fibroblasts.

J Nucl Med. 2018 Apr 6. [Epub ahead of print]

Lindner T, **Loktev A**, Altmann A, Giesel F, Kratochwil C, Debus J, Jäger D, Mier W, Haberkorn U.

Development of Quinoline Based Theranostic Ligands for the Targeting of Fibroblast Activation Protein.

J Nucl Med. 2018 Apr 6. [Epub ahead of print]

Roesch S, Lindner T, Sauter M, **Loktev A**, Flechsig P, Müller M, Mier W, Warta R, Dyckhoff G, Herold-Mende C, Haberkorn U, Altmann A.

Comparative Study of the Novel RGD Motif-Containing ITG α v β 6 Binding Peptides SFLAP3 and SFITGv6 for Diagnostic Application in HNSCC.

J Nucl Med. 2018 Apr 19. [Epub ahead of print]

Poster

Wüstehube-Lausch J, **Loktev A**, Fiedler M, Altmann A, Mier W, Daneschdar M, Schmoltdt HU, Haberkorn U, Sahin U.

Targeting the Tumor Microenvironment with an Engineered Knottin Peptide

12th German Peptide Symposium, Darmstadt

18. – 21. März 2015

Loktev A, Wüstehube-Lausch J, Fiedler M, Altmann A, Mier W, Daneschdar M, Schmoltdt HU, Sahin U, Haberkorn U.

Theranostic Miniprotein Targets Tumor Microenvironment in vivo

21st Annual DKFZ PhD Retreat, Weil der Stadt

11. – 15. Juli 2016

Vorträge

Tumor Targeting in vivo: Theranostic Miniprotein Against Human Sepsin

10th International PhD Student Cancer Conference Cambridge, UK

22. – 24. Juni 2016

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Zielgerichtete Diagnose und Therapie maligner Tumoren	1
1.2	Die Tumormikroumgebung als Angriffspunkt für die zielgerichtete Therapie	4
1.3	Identifizierung tumoraffiner Peptide mit Hilfe des Phagen-Displays	12
1.4	Nuklearmedizinische Diagnostik und Therapie maligner Tumoren	19
2	Zielsetzung der Arbeit	24
3	Material und Methoden	25
3.1	Materialien und Geräte	25
3.2	Allgemeine molekularbiologische Methoden	29
3.2.1	Zellkultur	29
3.2.2	Bestimmung der Proteinexpression	30
3.2.3	Plasmidpräparation	32
3.2.4	DNA-Reinigung mittels Agarose-Gelextraktion	33
3.2.5	DNA-Restriktion und Anlagerung von Sequenzierprimern	33
3.3	Aufbau der Peptid-Bibliotheken für den Einsatz im Phagen-Display	34
3.4	Durchführung des Biopannings	41
3.5	Sequenzierung und Datenauswertung	43
3.6	Festphasenynthese der Phagen-Display-Peptide	44
3.7	Radiomarkierung der Peptide	45
3.8	Synthese der FAP-Inhibitoren	47
3.9	Radiomarkierung der FAP-Inhibitoren	48
3.10	Bestimmung der Serumstabilität	49
3.11	Fluoreszenzfärbung und Mikroskopie	50
3.12	In vitro-Charakterisierung der FAP-Liganden im Zellbindungsassay	50
3.13	In vivo-Charakterisierung der FAP-Liganden in tumortragenden Mäusen	51
3.13.1	Positronen-Emissions-Tomographie	52
3.13.2	Organverteilungsstudien	53

3.14	Klinische Evaluierung der FAP-Liganden	53
3.14.1	Radiomarkierung von DOTA-(MC-FA-012) ₃	53
3.14.2	Radiomarkierung von FAPI-02 und FAPI-04	54
3.14.3	Diagnostische Bildgebung mittels PET/CT	55
3.14.4	Therapeutische Anwendung der FAP-Liganden	56
3.15	Datenauswertung und statistische Analyse	56
4	Ergebnisse und Diskussion	58
4.1	Identifizierung FAP-affiner Binder mittels Phagen-Display	58
4.1.1	Biopanning gegen rekombinantes FAP mit der SFTI8-Bibliothek	58
4.1.2	Biopanning gegen FAP-exprimierende Zellen mit der Min10.GP-FAP-Bibliothek	61
4.2	Charakterisierung der FAP-Binder MC-FA-012 und DOTA-(MC-FA-012) ₃	66
4.2.1	Zellbasierte Bestimmung der Bindungsaffinität und -spezifität	66
4.2.2	Charakterisierung der Pharmakokinetik im Tiermodell	69
4.2.3	Klinische Testung von DOTA-(MC-FA-012) ₃	74
4.2.4	Experimente zur Reduktion der Nierenanreicherung von DOTA-(MC-FA-012) ₃	78
4.3	Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehungen von MC-FA-012	84
4.4	Entwicklung neuer FAP-Liganden durch chemische Modifikation eines FAP-Enzyminhibitors	87
4.4.1	In vitro-Charakterisierung der Leitstrukturen FAPI-01 und -02	87
4.4.2	Charakterisierung von FAPI-02 in tumortragenden Nacktmäusen	90
4.4.3	In vitro-Charakterisierung der FAPI-Derivate FAPI-03 bis -15	96
4.4.4	In vivo-Charakterisierung von FAPI-03 bis -15	100
4.4.5	Klinische Evaluierung von FAPI-02 und -04	105
5	Anhang	116
	Abkürzungsverzeichnis	116
	Abbildungsverzeichnis	123
	Tabellenverzeichnis	125
	Analytische Daten	126
	Experimentelle Originaldaten	129
	Literaturverzeichnis	154
	Danksagung	164

1 Einleitung

1.1 Zielgerichtete Diagnose und Therapie maligner Tumoren

Tumorerkrankungen gehören zu den häufigsten Erkrankungen weltweit und zählen zu den Haupttodesursachen in den wirtschaftlich entwickelten Ländern^[1]. Im Jahr 2012 wurden weltweit 14 Millionen neu diagnostizierte Krebsfälle und acht Millionen tumorbedingte Todesfälle registriert. Prognosen gehen davon aus, dass die Zahl der jährlich neu auftretenden Tumorerkrankungen bis zum Jahre 2030 auf 22 Millionen ansteigen wird^[2].

Der Begriff ‚Tumorerkrankungen‘ im engeren Sinn umfasst dabei jede pathologische Neubildung von Körpergeweben, sogenannte Neoplasien, die durch Fehlregulationen bei der Zellproliferation entstehen und beschreibt somit eine äußerst heterogene Gruppe von Erkrankungen. Das Klassifikationssystem der Weltgesundheitsorganisation für medizinische Diagnosen (ICD-10) unterscheidet grundsätzlich vier Kategorien: gutartige Neubildungen, in-situ-Neubildungen, Neubildungen unsicheren oder unbekanntem Verhaltens sowie bösartige Neubildungen. Letztere werden, je nach Ursprungsgewebe des Tumors, wiederum in 97 verschiedene Subgruppen unterteilt. Im Gegensatz zu gutartigen, sogenannten benignen Neubildungen, zeichnen sich bösartige Tumoren oder maligne Neoplasien dadurch aus, dass sie invasiv in das umliegende Gewebe einwachsen und dieses zerstören. Darüber hinaus bilden sie durch hämatogene oder lymphogene Verbreitung häufig Metastasen in entfernten Geweben.

Eine alternative Klassifikation unterscheidet Tumorerkrankungen nach dem Phänotyp der entarteten Zellen. Hierbei wird zwischen Zellen epithelialen und mesenchymalen Ursprungs differenziert. Maligne Tumoren mesenchymaler Zellen werden als Sarkome bezeichnet, bösartige Neubildungen epithelialen Ursprungs werden Karzinome genannt. Diese Gruppe umfasst ca. 80 % aller malignen Tumore und zeichnet sich durch eine häufige, primär lymphogene Metastasierung aus. Karzinome können vom Plattenepithel (squamöse Karzino-

me) oder vom Drüsenepithel (Adenokarzinome) ausgehen und betreffen vornehmlich die Lunge, das Kolon, das Brustgewebe bei Frauen sowie die Prostata bei Männern^[2,3]. Zu den weiteren Tumorarten gehören die malignen Neubildungen der Haut (Melanome), hämatopoetische Krebsformen (Leukämien), Lymphome, Myelome sowie neuroektodermale Tumoren (Gliome).

Aufgrund der Vielfalt und der Heterogenität maligner Neoplasien kann die Frage nach der genauen Ätiopathogenese nicht pauschal beantwortet werden und erfordert eine differenzierte Betrachtung der einzelnen Tumor-Subtypen. Eine Gemeinsamkeit aller Tumore ist indessen eine Reihe genetischer Mutationen, die über kurz oder lang zu einer pathologischen Entartung der betroffenen Zellen führen. Diese können vererbt sein, durch spezifische Kanzerogene ausgelöst werden oder spontan auftreten^[4]. Nach derzeitigem Kenntnisstand handelt es sich bei den Hauptrisikofaktoren für die Tumorentstehung um Bewegungsmangel, ungesunde Ernährung, Übergewicht, Alkohol- und Tabakabusus, Umweltverschmutzung sowie eine positive Familienanamnese. Zu den spezifischen Kanzerogenen gehören physikalische (UV-Strahlung, ionisierende Strahlung), chemische (z.B. N-Nitrosornikotin, Aflatoxin, Arsen, Asbest) oder biologische Faktoren, wie Viren (z.B. Humane Papillomviren), Bakterien (z.B. *Helicobacter pylori*) oder Parasiten^[5-10]. Dessen ungeachtet ist die wohl wichtigste Ursache für die Entstehung eines Tumors die zunehmende Alterung der Körperzellen, deren Reparaturmechanismen im Laufe des Lebens an Funktionalität einbüßen^[11].

Im Vergleich zu normalen Zellen weisen Tumorzellen einige Besonderheiten auf, die eine essentielle Rolle für die Karzinogenese spielen. Die wichtigsten Eigenschaften maligner Neoplasien wurden von Hanahan und Weinberg systematisch charakterisiert und sind in Abbildung 1.1 zusammengefasst. Zu den wichtigsten Tumormerkmalen gehören ein beschleunigtes Zellwachstum durch die Hemmung von Wachstumssuppressoren und der Immunabwehr, eine ungehinderte Replikation durch die Hemmung apoptotischer Zellmechanismen sowie eine die Proliferation stimulierende Signaltransduktion. Weiterhin zeichnen sich Tumore durch eine Neubildung von Blutgefäßen zur Nährstoffversorgung (Angiogenese), eine Infiltration in umliegendes Gewebe sowie eine Metastasierung aus. Auch die genetische Instabilität der Tumorzellen sowie inflammatorische Prozesse in der Tumorumgebung gehören zu den besonderen Merkmalen maligner Neoplasien^[12,13].

Für die Behandlung maligner Tumoren steht eine Reihe unterschiedlicher Therapien zur Verfügung. Die gängigsten Therapieoptionen sind eine chirurgische Resektion des Primärtumors, sofern dieser operabel ist, die Bestrahlung sowie die konventionelle Chemotherapie. Letztere beruht auf der Toxizität bestimmter chemischer Verbindungen gegenüber allen sich schnell teilenden Zellen. Hierzu gehören neben den Tumorzellen auch gesunde Zellen mit einer physiologisch hohen Zellteilungsrate, wie z.B. Zellen des Knochenmarks oder der Haut. Diese werden bei einer Chemotherapie somit ebenfalls stark geschädigt, was teilweise schwerwiegenden Nebenwirkungen verursacht.

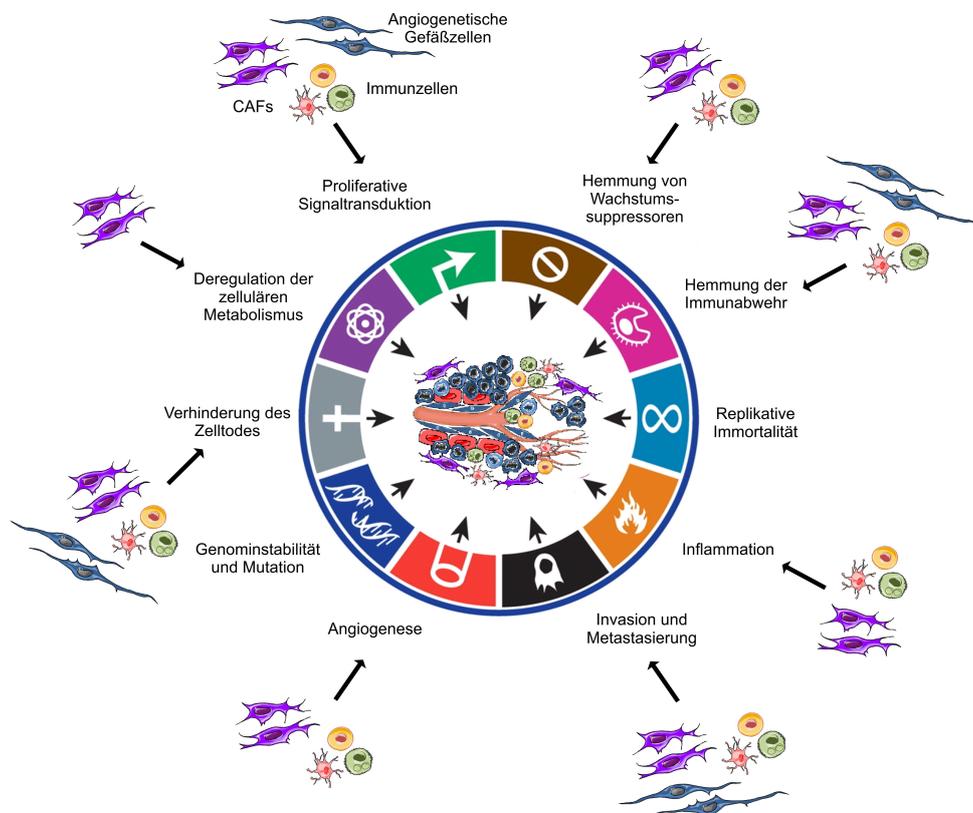


Abbildung 1.1. Die wichtigsten Eigenschaften maligner Tumoren und deren Beeinflussung durch unterschiedliche Zelltypen der lokalen Tumorumgebung; modifiziert nach Hanahan *et al.*

Um eine möglichst selektive Zerstörung des Tumors zu erreichen und den Schaden an gesundem Gewebe zu minimieren, wurde in den letzten Jahren zunehmend an der Entwicklung zielgerichteter Therapien (*Targeted Tumor Therapies*) gearbeitet. Im Gegensatz zu den konventionellen Methoden beruht die zielgerichtete Tumorthherapie auf dem Angriff bestimmter Zielstrukturen, die selektiv im Tumorgewebe exprimiert werden und nicht oder in erheblich geringerem Maße im gesunden Gewebe vorzufinden sind. Dank neuer molekularbiologischer Erkenntnisse und einem besseren Verständnis der Physiologie von

Tumorzellen und deren Mikroumgebung sowie des erheblichen technischen Fortschritts in den letzten Jahrzehnten, insbesondere durch den Einsatz der Genomsequenzierung, gelang es, selektive Tumormarker zu identifizieren. Diese können als Angriffspunkte für die zielgerichtete Diagnose und Behandlung von malignen Tumoren dienen und ermöglichen personalisierte Therapiekonzepte, die in Kombination mit den etablierten Behandlungsoptionen in einer effizienteren Tumorthherapie resultieren^[14]. Lange Zeit lag der Fokus der Entwicklung zielgerichteter Tumorthapeutika in der Modulation veränderlicher Prozesse in der Tumorzelle selbst. Hierzu zählt die Inhibition bestimmter Onkogene oder onkogener Signalwege, deren Aktivierung bzw. Funktionsverlust zu einem aberranten Verhalten normaler Körperzellen führen^[14]. Tumoren sind jedoch nicht als eine lose Ansammlung von Tumorzellen zu verstehen, sondern bilden vielmehr ein komplexes Organ, bestehend aus unterschiedlichen Komponenten, die in ihrer Gesamtheit einen Teil zur Malignität, Progression und Metastasierung des Tumors beitragen^[12,15].

1.2 Die Tumormikroumgebung als Angriffspunkt für die zielgerichtete Therapie

Das Wachstum von Tumoren und insbesondere deren Invasion und Metastasierung in umliegendes Gewebe sind nicht nur auf die Eigenschaften der Tumorzellen per se zurückzuführen, sondern werden erst durch die Funktion anderer im Tumor vorliegender Zellen, dem Tumorstroma, auch als Mikroumgebung des Tumors bezeichnet, ermöglicht. Das Wachstum von soliden Neoplasien über einen Durchmesser von ein bis zwei Millimetern hinaus erfordert die Ausbildung des unterstützenden Tumorstromas, um die Versorgung mit Nährstoffen für das Überleben und das Wachstum der Tumorzellen sicherzustellen^[16]. Die unterschiedlichen Komponenten der Tumormikroumgebung tragen zu den verschiedenen tumoralen Phänotypen bei und sind maßgeblich an malignen Prozessen beteiligt, indem sie eine proliferative Signaltransduktion fördern und die zellulären Maßnahmen der Tumorsuppression und des programmierten Zelltods abschwächen, was die replikative Immortalität der Tumorzellen ermöglicht. Sie sind in der Lage, angiogenetische Prozesse zu induzieren, den Energiestoffwechsel zu verändern sowie die immunvermittelte Zelldestruktion zu schwächen und fördern Invasion und Metastasierung in gesundes Gewebe. Zudem besitzen sie einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss auf die Effektivität antitumoraler Therapien^[17,18].

Dvorak *et al.* stellten die Theorie auf, dass es sich bei Tumoren um Wunden handelt, die niemals heilen. Ähnlich wie die Wundheilung ist auch die Tumorentwicklung ein dynamischer Prozess, der durch die Interaktion verschiedener Zelltypen gekennzeichnet ist. Die Zusammensetzung des Tumorstromas ähnelt stark der Struktur von Wundheilungsgewebe und viele der Wachstumsfaktoren und Zytokine, die bei Gewebeverletzungen und Fibrosen eine Rolle spielen, stehen in direktem Zusammenhang mit dem Wachstum und der Progression maligner Neoplasien^[15,19].

Das Tumorstroma bildet einen erheblichen Teil des gesamten Tumors und beträgt bei einigen Tumorarten, wie z.B. dem Brust-, Pankreas- oder Kolonkarzinom, über 90 % der Tumormasse. Es unterliegt morphologischen Veränderungen, rekrutiert aktivierte Fibroblasten, Makrophagen und Lymphozyten, erhöht die Sekretion von Wachstumsfaktoren und Proteasen und resultiert in einer veränderten extrazellulären Matrix (reaktives Stroma). Diese Effekte werden durch eine Reihe von parakrinen und autokrinen Stimuli vermittelt, u.a. durch Sekretion von *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β), *Basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF), *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF) sowie Interleukinen. Diese Zytokine werden nicht nur von den Tumorzellen und den umgebenden Fibroblasten sezerniert, sondern können auch durch die Wirkung von Proteasen, wie z.B. der Matrixmetalloproteasen (MMP), aus der extrazellulären Matrix (ECM) freigesetzt werden^[20].

Nachdem der Einfluss der Mikroumgebung auf die Tumorprogression für lange Zeit unerkannt bzw. unterschätzt blieb, ist er in den letzten zwei Jahrzehnten in den Fokus der onkologischen Forschung gerückt und wurde Gegenstand der Entwicklung einer Vielzahl von entsprechenden zielgerichteten Therapien. Hierzu gehört u.a. der Einsatz von Angiogenesehemmern (z.B. Inhibitoren von VEGF/VEGFR), Immuntherapeutika (z.B. Checkpoint-Inhibitoren) oder die gezielte Beeinflussung des ECM-Remodelings durch Inhibitoren der Matrixmetalloproteasen^[21]. Da die Zellen des Tumorstromas genetisch stabiler sind als die Tumorzellen selbst, kann das Risiko einer Therapieresistenz durch die gezielte Adressierung der Stromazellen deutlich vermindert werden^[22,23].

Die Zellen der Tumormikroumgebung lassen sich generell in drei Gruppen einteilen. Man unterscheidet angiogene, vaskuläre Zellen, infiltrierende Immunzellen und Tumor-assoziierte Fibroblasten (*Cancer-Associated Fibroblasts*, CAFs)^[24].

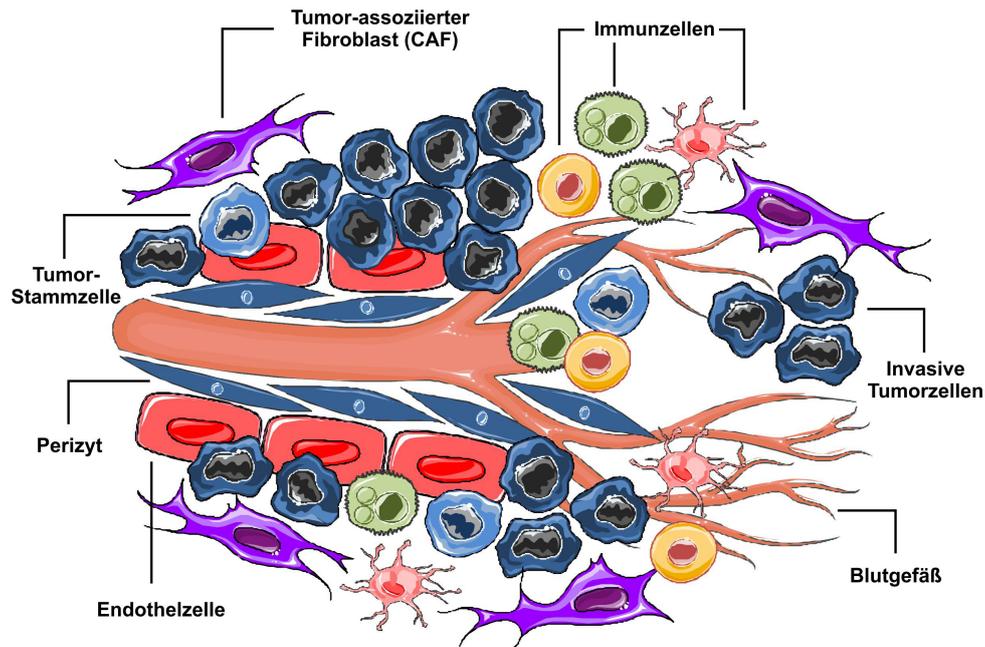


Abbildung 1.2. Schematischer Aufbau des Tumorstromas

CAFs können in zahlreichen unterschiedlichen Tumorarten nachgewiesen werden, u.a. in Brust-, Pankreas-, Prostata-, Lungen-, Magen- und Gallengangstumoren sowie dem kolorektalen Karzinom und seltener auch in Gehirn-, Nieren- und Ovarialtumoren und spielen eine wichtige Rolle für die aggressive Entwicklung von malignen Neoplasien. So wurde gezeigt, dass eine Inokulation von neoplastischen Zellen, darunter Brust-, Ovarial- und Pankreas-Tumorzellen, in Kombination mit CAFs in immundefizienten Mäuse zu einem massiven Anstieg der Tumorigenität der Krebszellen führt^[20].

Verschiedene Untersuchungen Tumor-assoziiierter Fibroblasten belegen die Existenz unterschiedlicher Subpopulationen dieser stromalen Zellen, die durch eine nur teilweise übereinstimmende Proteinexpression gekennzeichnet sind. Zu den bekanntesten Markerproteinen zählen α -Aktin, PDGF-Rezeptoren und *Fibroblast-Specific Protein-1* (FSP-1). Die Heterogenität der Proteinexpression kann zum Teil durch einen unterschiedlichen Ursprung der CAFs erklärt werden, die aus ansässigen Gewebefibroblasten, mesenchymalen Knochenmarksstammzellen, hämatopoetischen Stammzellen sowie differenzierten Epithel- und Endothelzellen entstehen können^[15,25].

Es werden verschiedene Mechanismen der Differenzierung von CAFs aus den unterschiedlichen Zelltypen diskutiert, die jedoch bislang nicht vollständig geklärt werden konnten. Zum einen sind Tumorzellen selbst in der Lage, lokale Gewebefibroblasten in CAFs umzuprogrammieren. Dies geschieht u.a. durch eine microRNA-induzierte Änderung der Genex-

pression in den Fibroblasten^[26] oder durch Akkumulation des Hypoxie-induzierten Faktors (HIF-1 α) und des CXCL12-Chemokins in Folge einer erhöhten Sekretion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)^[27]. Weiterhin wurde eine Umwandlung von ansässigen Fibroblasten in CAFs durch die Sekretion von TGF- β_1 von rekrutierten mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks (BM-MSCs) beschrieben^[28]. Auch Tumor-assoziierte Adipozyten werden als mögliche Vorläufer für CAFs diskutiert. So demonstrierten Jotzu *et al.* eine Umwandlung von Stammzellen des Fettgewebes in CAF-ähnliche Myofibroblasten in mit humanen Brustkrebslinien konditioniertem Zellkulturmedium^[29]. Ferner scheint eine Transformation von mesenchymalen und hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks in aktivierte Fibroblasten stattzufinden^[15]. Dabei wird angenommen, dass Tumor-assoziiertes Osteopontin eine Umwandlung mesenchymaler Stammzellen induziert, was in einem verstärkten Tumorwachstum resultiert^[30].

Eine der geläufigsten Erklärungen für die Entstehung Tumor-assoziiierter Fibroblasten ist allerdings die epithelial-mesenchymale Transition (EMT). Bei diesem Prozess werden Epithelzellen in Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften umgewandelt. Dabei verlieren die ursprünglich durch Tight Junctions fest verknüpften Epithelzellen ihre Zellpolarität und -verknüpfung, was in einer erhöhten Zellmobilität resultiert. Dieser Prozess ist für die physiologische Migration von Zellen während der Embryonalentwicklung oder Wundheilung von großer Bedeutung, spielt aber auch bei der Metastasierung von Tumoren eine wichtige Rolle. Die Umwandlung erfolgt unter Beteiligung verschiedener molekularer Prozesse, wie der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, der Expression spezifischer Zelloberflächenproteine, der Reorganisation und Expression von Zytoskelettproteinen, der Produktion von ECM-abbauenden Enzymen sowie Veränderungen in der Expression spezifischer microRNAs^[31].

Die genauen Mechanismen für die Tumor-assoziierte EMT konnten bislang nicht vollständig geklärt werden, doch es wurde eine Reihe von Faktoren beschrieben, die an der Induktion der EMT beteiligt sind. Hierzu gehören neben unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren insbesondere die Wachstumsfaktoren *Hepatocyte Growth Factor* (HGF), EGF, PDGF sowie TGF- β ^[15,31]. Es wird angenommen, dass Tumorzellen in Folge der genetischen und epigenetischen Veränderungen, die sie im Verlauf der Primärtumorbildung erfahren haben, besonders anfällig für EMT-induzierende Prozesse im Tumorstroma sind^[31].

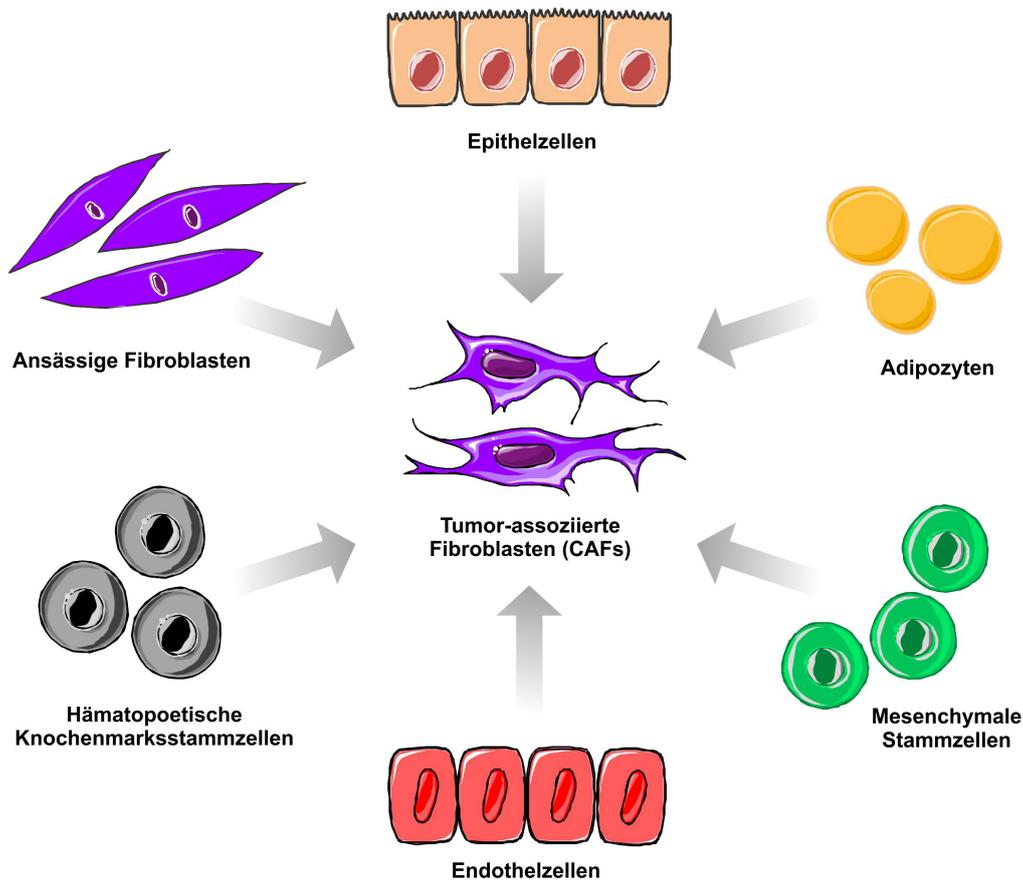


Abbildung 1.3. Entstehung Tumor-assoziiierter Fibroblasten aus unterschiedlichen Vorläuferzellen

Entsprechend der EMT kann auch eine Umwandlung von Endothelzellen in CAFs erfolgen. Dieser Prozess, der als endothelial-mesenchymale Transition bezeichnet wird, scheint jedoch eine deutlich geringere Rolle zu spielen als die EMT^[15].

Aktivierte Fibroblasten exprimieren eine Reihe von bestimmten Proteinen, die als tumor-spezifische Marker dienen können. Hierzu zählen α -Glattmuskelaktin (α -SMA), Tenascin-C, Periostin und FSP-1^[15]. Eines der wichtigsten Proteine ist jedoch das *Fibroblast Activation Protein- α* (FAP- α , FAP), welches aufgrund seiner Funktion als Serinprotease auch Seprase genannt wird. Es handelt sich um ein integrales Typ II-Transmembranprotein und gehört zur Familie der Postprolyl-dipeptidyl-aminopeptidasen (Subfamilie S9b)^[20]. Humanes FAP besitzt eine hohe strukturelle Homologie zu der verwandten Dipeptidylpeptidase IV (DPPIV, CD26), mit deren Aminosäuresequenz es zu 52 % übereinstimmt^[32,33]. Murines FAP zeigt mit einer Sequenzidentität von 90 % ebenfalls eine hohe strukturelle Ähnlichkeit mit der humanen Proteinvariante^[34]. FAP wurde erstmals 1986 in kultivierten Fibroblasten mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers F19 nachgewiesen^[32,35]. Die Kristallstrukturaufklärung der Protease hat ergeben, dass es sich um ein Homodimer handelt und das Vorlie-

gen der dimerisierten Form die Voraussetzung für eine enzymatische Aktivität darstellt^[20]. Die glykosylierte Form des Proteins zeigt sowohl Postprolyl-dipeptidylpeptidase- als auch Gelatinase-Eigenschaften während die nicht glykosylierte Variante keinerlei enzymatische Aktivität zu besitzen scheint. Die enzymatische Funktion dieser integralen Membranprotease trägt maßgeblich zum Abbau der ECM bei und erleichtert damit die Metastasierung von Tumorzellen. Aus diesem Grund wird eine hohe intratumorale Expression des Proteins mit einer schlechten Tumorprognose assoziiert^[32]. Dies wurde insbesondere für das kolorektale Karzinom sowie für Ovarial-, Pankreas- und Lebertumoren gezeigt^[15,21]. FAP wird selektiv in über 90 % der Tumore epithelialen Ursprungs ausgebildet. Auch in einigen Knochen- und Weichteilsarkomen und Melanomen wurde das Protein nachgewiesen. Weiterhin zeigt sich eine Expression während der Embryonalentwicklung, im Wundheilungsgewebe und bei chronischen Entzündungen sowie in fibrotischen Geweben, z.B. bei der Leberzirrhose oder idiopathischer Lungenfibrose. Anders als das verwandte CD26, wird FAP nicht in benignen Läsionen oder gesundem, adultem Gewebe ausgebildet und eignet sich daher als spezifischer Marker für maligne Tumoren^[36].

Aufgrund der selektiven Expression von FAP in der Mikroumgebung zahlreicher verschiedener Tumore, stellt das Membranprotein eine ideale Zielstruktur für die zielgerichtete Tumorthherapie dar. In der Vergangenheit gab es unterschiedliche Ansätze für eine FAP-spezifische antitumorale Therapie. So wurde der ursprünglich für die Identifikation des Proteins verwendete monoklonale murine Antikörper F19 auch klinisch zur Diagnostik und Therapie eingesetzt. Zwei Phase-I-Studien mit dem mit Iod-131 markierten Antikörper in Patienten mit kolorektalem Karzinom sowie Weichteilsarkomen zeigten eine selektive Anreicherung des Antikörpers im Tumor^[37]. Basierend auf den erfolgreichen Studien wurde eine humanisierte Variante des Antikörpers, Sibrotuzumab, entwickelt und in Patienten mit unterschiedlichen Epithelialtumoren untersucht, darunter Brust-, Kolon- und nicht-kleinzellige Lungentumore (NSCLC). Dabei zeigte der Antikörper allerdings eine lange Zirkulation im Blutkreislauf sowie eine langsame Elimination aus der Leber, der Milz und anderen gesunden Organen, was eine erhöhte Strahlenbelastung der entsprechenden Gewebe zur Folge hatte. Da in diesen Studien kein klinischer Nutzen nachgewiesen werden konnte, wurde eine weitere klinische Untersuchung des Antikörpers eingestellt^[16,21,37,38].

Weitere Therapiestrategien beruhen auf der Anwendung radiomarkierter Single-Chain-Antikörper^[39–41] sowie humaner Antikörper-Fragmente (Fabs), die mit Hilfe einer Antikörper-Phagenbibliothek identifiziert worden waren^[42]. Darüber hinaus wurden immunologische Ansätze mit einem bispezifischen Antikörper mit T-Zell-Stimulation^[43], CAR-T-Zellen (*Chimeric Antigen Receptor*)^[44] oder die Entwicklung FAP-assoziierter DNA- und Peptid-Impfstoffe verfolgt^[45,46]. Leider führte bislang keine dieser Strategien zu einem zufriedenstellenden Therapieerfolg.

Ein weiterer Ansatz für ein gezieltes FAP-vermitteltes Tumor-Targeting wurde von Brennen *et al.* beschrieben. Hierbei werden inaktive Prodrugs eingesetzt, die sich aus einer potenten zytotoxischen Verbindung sowie einer durch FAP spaltbaren Peptidgruppe, der sogenannten *FAP Cleavage Site*, zusammensetzen. Die Peptidgruppe verhindert die Penetration des Zytostatikums durch die Zellmembran, so dass die Substanz zunächst in ihrer inaktiven Form zirkuliert, ohne das Gewebe zu schädigen. Nach erfolgter FAP-Bindung wird die Peptidgruppe proteolytisch gespalten und das Zytostatikum kann sein intrazelluläres Target erreichen. Da das Zytostatikum selbst keine Target-Spezifität aufweist, kann es von allen umliegenden Zellen aufgenommen werden und adressiert somit Tumorzellen, Fibroblasten und Endothelzellen, wodurch ein höherer antitumoraler Effekt erreicht wird (Bystander-Effekt)^[47].

Ein alternativer FAP-spezifischer Therapieansatz beruht auf der direkten Hemmung der enzymatischen Funktion des Proteins. Hierfür wurde der niedermolekulare Enzyminhibitor Talabostat (Val-boroPro) eingesetzt und in einer ersten klinischen Studie an 28 Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom untersucht. Obwohl eine signifikante, wenngleich nicht vollständige Enzymhemmung in den Patienten nachgewiesen wurde, konnte eine objektive Ansprechrates jedoch nicht erzielt werden^[48]. Eine weitere Studie untersuchte den antitumoralen Effekt von Talabostat in Kombination mit dem Zytostatikum Docetaxel in Patienten mit fortgeschrittenem NSCLC. Auch hier konnte kein positiver Einfluss des FAP-Inhibitors auf den Therapieerfolg gezeigt werden. Vielmehr resultierte die kombinierte Gabe der beiden Therapeutika in einer geringeren Überlebensrate der Lungenkrebspatienten^[49]. Auch eine kombinierte Gabe von Talabostat und dem Chemotherapeutikum Cis-Platin in Patienten mit Stadium II-Melanomen führte zu keiner signifikanten Verbesserung des Therapieerfolges im Vergleich zu einer reinen Cis-Platin-Therapie^[50].

Erfolgreicher verlief eine Studie zur kombinierten Behandlung von Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) oder einem Non-Hodgkin-Lymphom mit Talabostat und dem CD-20-Antikörper Rituximab. Hierbei führte die Therapie in drei von 20 Patienten, die zuvor nicht auf die alleinige Gabe von Rituximab angesprochen hatten, zu einer partiellen Remission des Tumors^[51]. Allerdings ist davon auszugehen, dass der Therapieerfolg weniger auf die direkte Hemmung des Enzyms zurückzuführen ist, sondern vielmehr das Ergebnis einer immunologischen Wirkung darstellt. Wie in Tierversuchen gezeigt wurde, führt die Gabe von Talabostat zu einer Verstärkung der tumorspezifischen T-Zell-Immunität durch Erhöhung der Zytokin- und Chemokinausschüttung sowohl in lymphatischen Organen als auch im Tumor. Auch wurde eine T-Zell-unabhängige Stimulation der antitumoralen Aktivität von Neutrophilen, Makrophagen und natürlichen Killerzellen beobachtet^[51,52]. Dessen ungeachtet scheint Talabostat weder als Monotherapeutikum noch in Kombination mit klinisch etablierten Chemotherapeutika einen relevanten Zusatznutzen zu haben. Zudem inhibiert die Substanz neben FAP auch das verwandte Membranprotein CD26, welches in zahlreichen gesunden Geweben exprimiert wird^[20,51].

Eine weitere Möglichkeit für eine FAP-spezifische Therapie liegt im gezielten Transport von zytotoxischen Wirkstoffen in die FAP-exprimierenden Zellen des Tumorstromas. So konnten Ostermann *et al.* durch die Gabe eines Antikörper-Wirkstoffkonjugats, bestehend aus einem monoklonalen FAP-Antikörper und dem Maytansinoid DM1, eine Hemmung des Tumorwachstums in tumortragenden Mäusen nachweisen^[53].

Die unterschiedlichen Effekte der bisherigen FAP-spezifischen Therapien werden darauf zurückgeführt, dass verschiedene Fibroblasten-Subtypen gegensätzliche Effekte auf die Tumorprogression haben und diese nicht nur hemmen, sondern teilweise auch fördern können, so dass eine zuverlässige Prognose über den Verlauf einer zielgerichteten Therapie im Grunde nicht erfolgen kann. Indessen wurden bislang in keiner der durchgeführten Studien schwerwiegende, dosislimitierende Nebenwirkungen beobachtet, obwohl eine FAP-Expression auch auf multipotenten Knochenmarksstammzellen (*Bone Marrow Stem Cells*, BMSCs) diskutiert wird^[54] und zudem eine lösliche Form des Proteins, bekannt als *Antiplasmin-Cleaving Enzyme* (APCE), im Blutplasma zirkuliert^[55,56]. Damit scheint eine FAP-Inhibition, ungeachtet ihrer Effekte auf die Tumorprogression, zumindest ohne erhöhtes Toxizitätsrisiko grundsätzlich möglich zu sein.

1.3 Identifizierung tumoraffiner Peptide mit Hilfe des Phagen-Displays

Die Entwicklung zielgerichteter Therapeutika kann mit unterschiedlichen Strategien erfolgen. Hierzu gehört die Testung bekannter Naturstoffe im Hinblick auf eine Bindung an die gewünschte Zielstruktur, was in Hochdurchsatzverfahren mit großen Substanzbibliotheken beliebig durchgeführt werden kann. Dieser Ansatz verlässt sich allerdings auf eine mehr oder minder zufällige Entdeckung geeigneter Bindungspartner. Anders verhält es sich bei der gezielten Weiterentwicklung bereits bekannter Pharmazeutika, z.B. durch Affinitätsreifung oder chemische Modifikation, was allerdings die Verfügbarkeit einer geeigneten Leitsubstanz voraussetzt. Die Nachteile beider Methoden lassen sich durch die Anwendung des *De novo*-Screenings künstlicher Substanzbibliotheken überwinden. Im Gegensatz zur Entwicklung natürlich vorkommender oder bereits identifizierter Substanzen ermöglicht das *De novo*-Screening die Entdeckung völlig neuartiger Strukturen und erweitert damit das Spektrum möglicher zukünftiger Therapeutika. Zudem erlaubt das Verfahren die Identifizierung potentieller Bindungspartner von bislang unbekanntem Targetproteinen durch die Verwendung von Tumorzellen oder -gewebefraktionen.

Eine Möglichkeit der Identifizierung bislang unbekannter Peptid- oder Protein-basierter Liganden für membranständige Proteine ist der Einsatz kombinatorischer Peptidbibliotheken im Phagen-Display^[57,58]. Das biotechnologische Verfahren, welches 1985 erstmalig beschrieben wurde, beruht auf der Präsentation einer Vielzahl unterschiedlicher Polypeptide auf der Oberfläche von Bakteriophagen, die in ihrem Genom die korrespondierende DNA enthalten (Genotyp-Phänotyp-Kopplung). Hierfür wird die für das Peptid kodierende DNA an einen DNA-Abschnitt des Phagen fusioniert, der für eines der Hüllproteine kodiert. In Folge dessen wird das entsprechende Peptid als Fusionprodukt des Hüllproteins auf der Oberfläche des Phagen exprimiert^[59]. Nach Inkubation der Phagenbibliothek mit dem Zielprotein werden die ungebundenen Phagen entfernt, die gebundenen eluiert und durch Infektion geeigneter Wirtsbakterien amplifiziert. Dieser als Biopanning bezeichnete Prozess wird über mehrere Runden wiederholt, so dass eine Anreicherung der Target-affinen Peptide stattfindet. Diese können nach Sequenzierung der zugrundeliegenden Phagen-DNA identifiziert, synthetisiert und charakterisiert werden. Eine schematische Darstellung des Biopanning-Prozesses ist in Abbildung 1.4 gegeben.

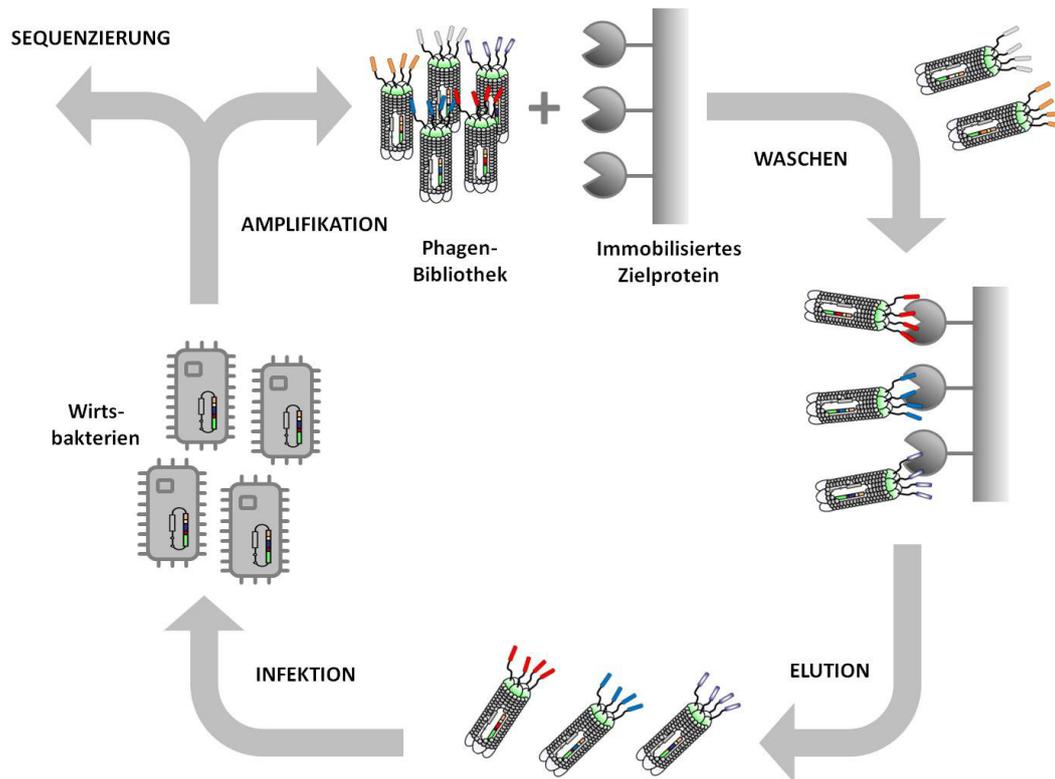


Abbildung 1.4. Ablauf des Phagen-Display-Pannings

Die vorwiegend eingesetzten Phagen M13, Fd und f1 entstammen der Ff-Familie, einer Gruppe filamentöser Phagen, die gram-negative Bakterien wie *E.coli* über den F-Pilus infizieren können. Ff-Phagen sind nicht-lytische Phagen, die ihre Wirtsbakterien nach Infektion nicht abtöten, so dass diese kontinuierlich Phagenpartikel vermehren und freisetzen können. Sie besitzen ein zirkuläres einzelsträngiges DNA-Genom, welches aus insgesamt elf Genen besteht, von welchen fünf für unterschiedliche Hüllproteine des Phagen kodieren^[60,61]. Eines dieser Hüllproteine ist das *Minor Coat Protein* pIII, welches in fünf Kopien an einem Ende des Bakteriophagen vorliegt und für die Infektion des Wirtsbakteriums verantwortlich ist^[58,62]. Da es möglich ist, Peptide mit einer Länge von bis zu 50 Aminosäuren an das Hüllprotein zu fusionieren, ohne einen Verlust der Infektiosität zu bewirken oder den Zusammenbau des Virions zu beeinträchtigen, wird pIII oftmals für die Präsentation ganzer Peptid- oder Antikörperbibliotheken verwendet. Dabei wird die für die Bibliothek kodierende Fremd-DNA direkt oder über einen kurzen Spacer an das 5'-Ende des für pIII kodierenden Gens in einen Phagenvektor kloniert. Für die Präsentation von Peptiden mit mehr als 50 Aminosäuren wird das monovalente Phagemid-System eingesetzt. Im Gegensatz zu dem konventionellen Phagenvektor enthält das Phagemid lediglich die für das pIII kodierende Sequenz sowie ein Verpackungssignal und ist damit nicht eigenständig repli-

kationsfähig. Für die Entstehung neuer Virionen ist daher eine Co-Infektion durch einen Helferphagen, z.B. M13KO7, notwendig, der die für die Phagenbildung erforderlichen Gene komplementiert. Da das für pIII kodierende Gen des Helferphagen nicht modifiziert ist, entsteht auf den rekombinanten Phagen eine Mosaikstruktur aus Wildtyp-pIII und maximal einer Kopie des pIII-Fusionsproteins. Dadurch wird zugleich das Problem möglicher Aviriditätseffekte durch die Präsenz von mehr als einem Fusionsprotein pro Virion umgangen, welche zu einer Anreicherung mäßig affiner Binder führt^[63].

Abbildung 1.5 zeigt den schematischen Aufbau einer Phagemid-basierten Bibliothek. Dabei wird die randomisierte Peptidbibliothek direkt oder über einen kurzen Spacer an das Hüllprotein pIII des Phagen kloniert. Nach Ligation der resultierenden DNA-Sequenz an einen schwachen Promotor sowie ein Sekretionssignal wird das Konstrukt mit Hilfe geeigneter Restriktionsenzyme in den Phagemid-Vektor integriert. Dieser trägt neben dem E.coli- und dem Phagen-Replikationsursprung (ori) auch ein Antibiotikaresistenz-Gen (z.B. Ampicillin) als Selektionsmarker^[64,65].

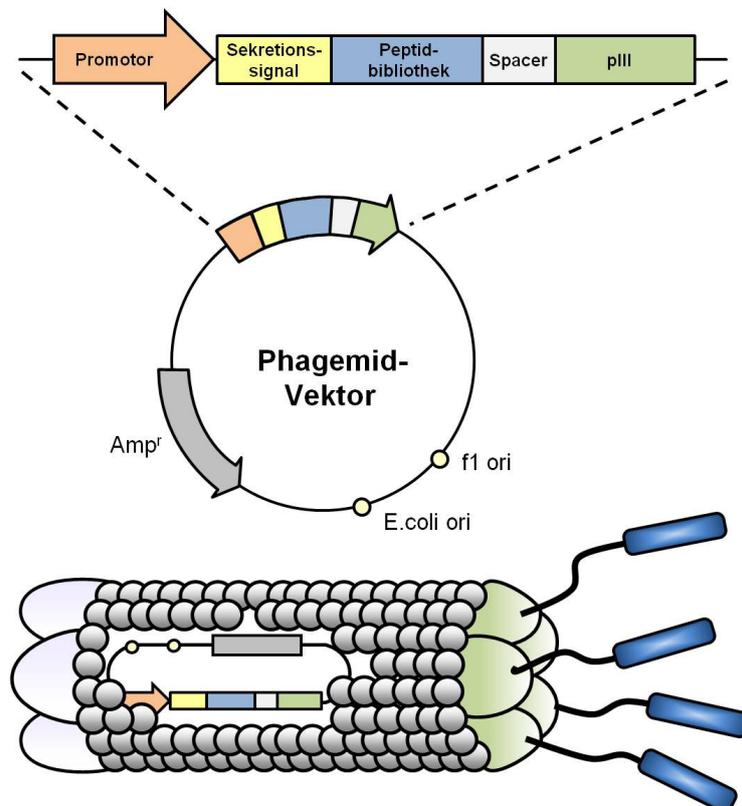


Abbildung 1.5. Schematischer Aufbau der Phagemid-basierten Phagenbibliothek. Nach Ligation der Peptidbibliothek an das Hüllprotein pIII des Phagen wird das DNA-Konstrukt in den Phagemid-Vektor integriert. Dieser trägt den Phagen-Replikationsursprung f1 ori sowie den bakteriellen Replikationsursprung E.coli ori und ein Antibiotika-Resistenzgen Amp^r.

Ein entscheidender Vorteil des Phagen-Displays besteht in der direkten Verknüpfung der präsentierten Peptide mit ihrer entsprechenden genetischen Information. Diese Genotyp-Phänotyp-Kopplung ermöglicht die einfache Identifizierung potentieller Bindungspartner einer jeden beliebigen Zielstruktur. Dabei können mit nur relativ geringem Aufwand große Bibliotheken mit bis zu 10^{10} verschiedenen Peptiden aufgebaut werden^[58].

Mit Hilfe des Phagen-Displays konnten bereits zahlreiche vielversprechende Protein-Liganden identifiziert werden. Hierzu gehört der humane monoklonale IgG κ -Antikörper Adalimumab (Humira[®]), der an Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) bindet und damit die Aktivierung von TNF-Rezeptoren verhindert und zur Behandlung von rheumatoider und psoriatischer Arthritis sowie den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa zugelassen ist. Auch das mit 7,1 kDa vergleichsweise kleine Protein Ecallantid (Kalbitor[®]), welches als Kallikrein-Inhibitor zur Behandlung des hereditären Angioödems eingesetzt wird, wurde mittels Phagen-Display identifiziert^[58].

Bei dem Großteil der bislang identifizierten Verbindungen zur zielgerichteten Tumordiagnostik und -therapie handelt es sich um Antikörper, die sich durch eine hohe chemische Stabilität sowie eine außergewöhnliche Target-Affinität und -Spezifität auszeichnen. Allerdings besitzen Antikörper auch eine Reihe von nachteiligen Eigenschaften: Sie sind nicht chemisch-synthetisch zugänglich und erfordern einen hohen Reinigungsaufwand nach rekombinanter Synthese, was in hohen Produktionskosten resultiert. Antikörper sind in der Regel nicht oral bioverfügbar und besitzen aufgrund ihrer Größe oftmals eine unzureichende diffusionsabhängige Penetration in tiefere Gewebeschichten sowie eine geringe zelluläre Aufnahme. Damit sind sie für die Therapie von großen soliden Tumoren häufig nicht geeignet. Zudem rufen Antikörper oftmals unerwünschte Immunreaktionen hervor, was eine effektive Therapie erschwert bzw. gänzlich zum Abbruch zwingt^[66]. Demnach stellt der Einsatz von Peptiden hinsichtlich Größe, Membranpermeabilität und Pharmakokinetik eine sinnvolle Alternative dar. Zudem sind Peptide auch in großen Mengen synthetisch leicht zugänglich und somit in der Regel kosteneffizienter herstellbar als rekombinant erzeugte Wirkstoffe.

Peptide spielen in zahlreichen biomolekularen Prozessen eine Schlüsselrolle, da sie hinsichtlich ihrer Funktion als Hormone, Neurotransmitter oder Zytokine wichtige Effektoren in den meisten Signaltransduktionswegen darstellen. Die physiologische Interaktion zwischen

zwei oder mehreren Reaktionspartnern, z.B. zwischen Rezeptor und Ligand, beruht nahezu ausschließlich auf der Interaktion zwischen definierten und räumlich beschränkten Regionen. Selbst bei großen Proteinen sind in der Regel nur bestimmte Epitope an der Wechselwirkung beteiligt, die durch wenige Aminosäuren charakterisiert werden können, aber bis zu 80 % der Bindungsenergie ausmachen^[67]. Es ist somit möglich, Miniproteine und Peptide zu konstruieren, die die biologischen Funktionen großer Biomoleküle imitieren. Mit ihrer geringen Größe und der strukturellen Flexibilität besitzen Peptide eine gewisse Ähnlichkeit mit Transkriptionsfaktoren oder microRNAs, welche natürlicherweise an diverse Rezeptorproteine binden. Im Gegensatz zu Antikörpern zeigen Peptide im Allgemeinen eine bessere Tumorpenetration sowie eine schnellere Clearance aus gesundem Gewebe. Peptide haben eine deutlich geringere Tendenz immunogene Reaktion hervorzurufen und sind leicht zugänglich für rationales Wirkstoffdesign, chemische Synthese und einfache Modifikation^[68-70].

Aufgrund der fehlenden dreidimensionalen Struktur werden die meisten linearen Peptide durch Peptidasen enzymatisch rasch abgebaut, was in sehr kurzen Zirkulationshalbwertszeiten resultiert. Weiterhin sind Membranpermeabilität und Affinität zum Zielprotein bei vielen linearen Peptiden sehr gering, weshalb eine ausreichend hohe Tumoranreicherung nur selten erzielt werden kann^[68]. Um diese Nachteile zu überwinden, wurde eine Reihe unterschiedlicher Strategien zur Stabilisierung von Peptiden entwickelt. Hierzu gehört der Einbau von unnatürlichen Aminosäuren, die keine natürlichen Substrate von Enzymen repräsentieren und somit die Wahrscheinlichkeit einer proteolytischen Spaltung reduzieren. Chemische Modifikationen wie die Kopplung an Polyethylenglykol (PEGylierung) oder Hydroxyethylstärke (HESylierung) erhöhen die Löslichkeit und Stabilität. Letzteres kann auch durch Lipidmodifikation oder Multimerisation erreicht werden^[67]. Um die Membranpermeabilität der Peptide zu erhöhen, kann eine Kopplung an *Cell-Penetrating Peptides* (CPPs) vorgenommen werden. Diese relativ kurzen Aminosäureketten, die zumeist reich an Lysin oder Arginin sind, besitzen ein hohes Internalisierungspotential in eukaryotische Zellen und können für die Einschleusung fremder Moleküle in das Zellinnere genutzt werden^[70]. Die meisten der genannten Strategien sind jedoch nicht mit dem Einsatz im Phagen-Display kompatibel, da sie posttranslationale Modifikationen erfordern, die nicht von den natürlich vorhandenen Enzymen vorgenommen werden können.

Eine alternative Strategie zur Stabilisierung von Peptiden und Miniproteinen, die sich für den Aufbau von Display-Bibliotheken eignet, ist der Einsatz von Gerüstkonstruktionen, sogenannten Scaffolds. Dabei werden die variablen Peptidsequenzen in einen definierten Rahmen mit vorgegebener Sekundärstruktur eingebunden. Diese zeichnet sich häufig durch eine Kombination stabiler Strukturelemente wie Alpha-Helices oder Beta-Sheets sowie exponierter, leicht zugänglicher Schleifen aus, welche eine Bindung an das Zielprotein erleichtern und die Struktur natürlicher Proteinliganden imitieren^[71]. Dabei sollte das Proteingerüst eine Insertion der Peptidbibliothek tolerieren, ohne seine dreidimensionale Struktur wesentlich zu verändern. Zudem sollte eine effiziente Expression sowie die korrekte Faltung im Display-System gewährleistet sein^[66,72]. Gerüstbasierte Peptide zeichnen sich in der Regel durch eine hohe thermodynamische Stabilität und Affinität zu ihrer Zielstruktur aus und vereinen damit die Vorzüge von Antikörpern und kleinen Molekülen. Die einfachste Methode für die Stabilisierung von Peptidketten ist die Einführung einer einfachen kovalenten Verknüpfung durch Zyklisierung von zwei geeigneten Funktionalitäten. Da die konformationelle Entropie von zyklischen Peptiden im Allgemeinen kleiner ist als die der entsprechenden linearen Variante, erfolgt die Einnahme einer bestimmten Konformation nach Bindung an das Zielprotein mit einem geringeren Entropieverlust, was in der Regel in einer höheren Bindungsaffinität resultiert. Zudem führt die verringerte Flexibilität des Moleküls zu einer geringeren Anzahl an möglichen Isomeren, was eine höhere Targetspezifität gewährleistet^[73].

Die Formation einer Ringstruktur kann durch Ausbildung unterschiedlicher chemischer Bindungen erzielt werden, u.a. durch die Einführung einer Amid-, Lacton-, Ether- oder Thioetherbindung. Eine der gängigsten Zyklisierungsstrategien basiert jedoch auf der Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen zwei benachbarten Cysteinresten. Aufgrund ihrer geringen Größe und Flexibilität bewirken Disulfidbrücken keine unerwünschten strukturellen Veränderungen des zyklischen Peptids und zeichnen sich durch eine außergewöhnliche Stabilität aus. Damit eignen sich durch Disulfidbrücken stabilisierte Peptide ideal als Gerüststrukturen für den Einsatz im Phagen-Display und wurden in der Vergangenheit bereits mehrfach erfolgreich für die Identifizierung neuer Target-spezifischer Binder eingesetzt^[73].

Eine spezielle Gruppe zyklischer Peptide, die durch Disulfidbrücken stabilisiert werden, sind die Knotenpeptide oder Cyclotide, die in unterschiedlichen Pflanzenfamilien nachgewiesen worden sind. Cyclotide bestehen aus einem Kopf-Schwanz-zyklisierten Backbone

und einer speziellen Knotenstruktur, die aus mindestens drei Disulfidbrücken gebildet wird. Dieses *Cyclic Cystine Knot* (CCK)-Motiv entsteht, wenn eine Disulfidbrücke den Makrozyklus kreuzt, der von den beiden anderen Disulfidbrücken und dem Backbone gebildet wird. Aufgrund der rigiden Struktur und der Knotentopologie sind Cyclotide außerordentlich stabil gegenüber enzymatischem, thermischem oder chemischem Abbau und damit teilweise sogar oral bioverfügbar. So wird z.B. in der traditionellen Medizin afrikanischer Völker ein Teeaufguss aus den Blättern der Pflanzenart *Oldenlandia affinis* zur Geburtseinleitung bei Schwangeren eingesetzt. Dieser enthält das wehenfördernde Knotenpeptid Kalata B1, welches weder durch das starke Erhitzen während der Teezubereitung, noch durch sauren oder basischen pH während der gastrointestinalen Passage inaktiviert wird^[74]. Auch das Cyclotid MCoTI-II, welches ursprünglich aus der Pflanzenart *Momordica cochinchinensis* aus der Familie der Kürbisgewächse isoliert wurde, zeichnet sich durch eine außergewöhnliche Stabilität gegenüber chemischem, thermischem und enzymatischem Abbau aus^[74]. Weiterhin toleriert es den Einbau verschiedener Aminosäuresequenzen ohne negativen Einfluss auf die räumliche Struktur des knotenähnlichen Gerüsts und wird aufgrund seiner hohen Zellinternalisierungsrate als zyklisches CPP angesehen^[75]. Damit besitzt es die idealen Voraussetzungen für den Einsatz als Gerüststruktur in der peptidbasierten Wirkstoffentwicklung.

Zwei weitere Gerüststrukturen, die für den Einsatz im Phagen-Display vielfach beschrieben worden sind, sind die kleinen Peptide Min-23 und SFTI-1. Bei Min-23 handelt es sich um ein zyklisches Gerüstpeptid bestehend aus 23 Aminosäuren. Es ist strukturell vom Cyclotid EETI-II abgeleitet, welches selbst Verwendung als Scaffold-Peptid findet. Anders als EETI-II wird Min-23 durch zwei statt durch drei Disulfidbrücken stabilisiert, die sich aber nachweislich nativ falten, was darauf hindeutet, dass das CCK-Motiv als autonome Falteinheit betrachtet werden kann^[76,77]. Ähnlich wie das Cyclotid MCoTI-II ist Min-23 äußerst tolerant gegenüber Sequenzmodifikationen und erlaubt den Einbau von bis zu 18 variablen Aminosäuren unter Beibehaltung der korrekten Faltung^[78]. Die Insertion von Fremdaminosäuren erfolgt bevorzugt im Beta-Loop, welcher der Oberfläche ausgesetzt ist und somit für die Zielstruktur leicht zugänglich ist. SFTI-1 (*Sunflower Trypsin Inhibitor*-1) ist ein zyklisches Peptid aus 14 Aminosäuren, welches ursprünglich aus den Samen der Pflanzenart *Helianthus annuus* isoliert wurde und unterschiedliche Serinproteasen, darunter Chymotrypsin, Elastase, Thrombin und Trypsin, mit hoher Affinität inhibiert^[79,80].

Obwohl es lediglich durch eine Disulfidbrücke stabilisiert wird, besitzt das Peptid eine außergewöhnlich hohe proteolytische Stabilität sowie zellpenetrierende Eigenschaften. SFTI-1 toleriert den Einbau von bis zu acht verschiedenen Aminosäuren und ist aufgrund seiner geringen Größe leicht zu synthetisieren, was es als ideales Gerüstprotein für den Einsatz im Phagen-Display auszeichnet^[81]. Abbildung 1.6 zeigt den schematischen Aufbau der in dieser Arbeit eingesetzten Gerüststrukturen, die von den zyklischen Peptiden SFTI-1, Min-23 und MCoTI-II abgeleitet sind.

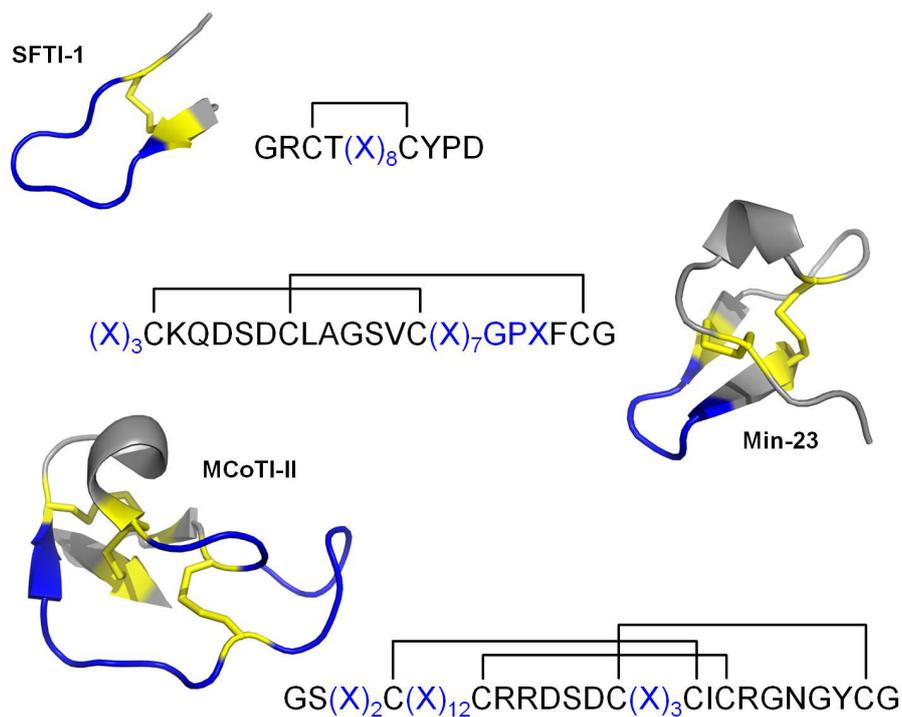


Abbildung 1.6. Disulfidbrücken-stabilisierte zyklische Gerüstproteine für den Einsatz im Phagen-Display. Die variablen Bereiche, bestehend aus randomisierten Aminosäuren, sind in blau gekennzeichnet.

1.4 Nuklearmedizinische Diagnostik und Therapie maligner Tumoren

Die Radiotherapie maligner Neoplasien gehört neben der chirurgischen Resektion und der Chemotherapie zu den zentralen Säulen der Tumorthherapie. Sie kann als alleinige Behandlungsmethode, in Kombination mit einer Chemotherapie als Radiochemotherapie sowie vor (neoadjuvant) oder nach (adjuvant) einer Operation eingesetzt werden. Die Strahlentherapie basiert auf einer Schädigung der DNA in den Tumorzellen durch ionisierende Strahlung

oder Teilchenstrahlung, wodurch eine weitere Zellteilung unterbunden wird^[82]. Dabei ist es einerseits möglich, den Tumor lokal mit Hilfe einer externen Strahlungsquelle perkutan zu bestrahlen. Hierfür wird hochenergetische Röntgenstrahlung sowie Schwerionen- oder Protonenstrahlung eingesetzt, die ausgehend von einer externen, in einer definierten Entfernung vom Patienten befindlichen Strahlungsquelle auf den Tumor trifft und diesen schädigt. Dabei muss die Strahlung, je nach Lage des Tumors, allerdings zahlreiche Gewebeschichten passieren und schädigt dabei unausweichlich auch gesundes Gewebe. Dies kann insbesondere bei strahlungssensitiven Organen, wie der Haut, den Schleimhäuten, dem Darm und dem Rückenmark, eine Limitation der möglichen Strahlendosis und damit des zu erwartenden Therapieerfolges darstellen. Zudem ist eine effektive Behandlung von Fernmetastasen und befallenen Lymphknoten durch die perkutane Bestrahlung nur unzureichend möglich^[83].

Eine alternative Möglichkeit ist die Brachytherapie, bei der die Strahlungsquelle direkt am Tumor platziert wird. Hierfür werden Radionuklide mit einer geringen Strahlungsreichweite eingesetzt, so dass das umliegende Gewebe einer geringeren Strahlungsbelastung ausgesetzt ist. Diese Methode eignet sich insbesondere für die Behandlung des Zervix- und des Prostatakarzinoms, sowie bei Sarkomen oder HNO-Tumoren^[82]. Ein weiterer Ansatz für die radiologische Behandlung von Tumoren ist die nuklearmedizinische Strahlentherapie oder Radionuklidtherapie. Hierbei werden dem Patienten radioaktive Substanzen intravenös verabreicht und gelangen über den Blutkreislauf in die betroffenen Organe, wobei idealerweise eine selektive Anreicherung des Radiopharmakons in den malignen Läsionen stattfindet. Diese Methode eignet sich besonders für die Behandlung von Metastasen, die für eine externe Bestrahlung nur schlecht zugänglich sind, wie z.B. Knochenmetastasen.

Eine Sonderform ist die Peptid-Rezeptor-Radionuklidtherapie (PRRT), bei der das Radionuklid mit Hilfe eines zielgerichteten Peptids in den Tumor transportiert wird^[84]. Gängige Radionuklide für die Radiotherapie sind Beta-Strahler mit einem linearen Energietransfer von ca. 0,2 keV/ μm , wie z.B. Yttrium-90, Iod-131, Lutetium-177 und Rhenium-186 bzw. -188 sowie Alpha-Emitter mit einer deutlich höheren Strahlungsenergie, wie z.B. Astat-211 und Bismut-212 bzw. -213 (50 bis 230 keV/ μm)^[85].

Eine möglichst präzise und damit nebenwirkungsarme Radionuklidtherapie setzt voraus, dass das Radiopharmakon möglichst rasch im Tumor anreichert und nicht in gesundem

Gewebe akkumuliert. Um dies zu erreichen, werden die Nuklide in chemische Verbindungen inkorporiert, die bevorzugt von Tumorzellen aufgenommen werden bzw. an bestimmte Liganden gekoppelt, die eine Affinität zu tumorspezifischen Molekülen besitzen. Da diese Verbindungen lediglich als Vehikel für den Transport der therapeutisch wirksamen Radioisotope dienen, können geringe Substanzmengen eingesetzt werden, die weit unterhalb einer pharmakologisch wirksamen Dosis liegen, was das Risiko von unerwünschten Nebenwirkungen minimiert. Gleichwohl sollten die Liganden eine hohe Affinität sowie Spezifität zu ihrem Zielprotein besitzen, um eine schnelle Tumoraufnahme des Radionuklids und eine geringe Strahlenbelastung von gesundem Gewebe zu gewährleisten.

Bislang wurde eine Reihe zielgerichteter Moleküle entwickelt, die für die Radionuklidtherapie zugelassen sind. Hierzu zählen z.B. die radiomarkierten CD20-Antikörper ^{90}Y -Ibritumomab (Zevalin[®]) und ^{131}I -Tositumomab (Bexxar[®]) zur Therapie des Non-Hodgkin-Lymphoms sowie ^{90}Y -DOTATOC zur palliativen Behandlung fortgeschrittener neuroendokriner Tumoren^[14].

Neben ihrer Bedeutung für die Radionuklidtherapie spielen zielgerichtete Verbindungen eine wichtige Rolle für die zuverlässige Diagnostik maligner Neoplasien. Dabei ist für eine möglichst exakte Beurteilung des Krankheitsstadiums (Tumor-Staging) sowie für eine präzise Therapieplanung vornehmlich die Detektion sehr kleiner Läsionen, Metastasen oder Lymphknoten von Bedeutung. Insbesondere im Hinblick auf die Auswahl einer geeigneten zielgerichteten Therapie ist eine akkurate Diagnose unerlässlich. Da nicht alle Patienten für eine zielgerichtete Therapie in Frage kommen und nur diejenigen Patienten profitieren können, deren Tumor die entsprechende Zielstruktur exprimiert, ist vor Beginn der Therapie eine Stratifizierung, d.h. eine Auswahl des geeigneten Patientenkollektivs, notwendig. Dies gilt z.B. für die hormonelle Therapie von Patienten mit einem Estrogenrezeptor-positiven Mammakarzinom oder die Behandlung mit Antikörpern gegen HER2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*), welcher nur in einem Drittel aller Brustkrebstypen nachgewiesen werden kann^[86].

Nachdem der klinische Stellenwert zielgerichteter Therapeutika in den letzten Jahren immer weiter zugenommen hat, gewinnt auch die Notwendigkeit einer zuverlässigen Diagnostik an Bedeutung. In Folge dessen rückten Moleküle in den Fokus, die sowohl diagnostisch als auch therapeutisch einsetzbar sind, sogenannte *Theranostics*^[86]. Theranostische Verbindungen eignen sich ideal für die Prognose eines möglichen Therapieerfolges sowie das

Monitoring des Therapieverlaufs und tragen somit zu einer verbesserten Therapiesicherheit bei. Nachdem eine Reduktion der Risiken auch eine Reduktion der Kosten zur Folge hat, ist ein Einsatz von theranostischen Verbindungen auch aus ökonomischen Gründen empfehlenswert.

Bildgebende Verfahren in der Nuklearmedizin

Bildgebende Verfahren spielen eine Schlüsselrolle in der Diagnostik maligner Läsionen und erlauben eine non-invasive Beurteilung der Lage, Größe sowie der Progredienz des Tumors. Der Einsatz langfristig etablierter Verfahren wie der Röntgen-Untersuchung oder der Sonographie werden dabei zunehmend von neueren Entwicklungen wie der Magnetresonanztomographie (MRT) oder der Computertomographie (CT) ergänzt.

Zu den nuklearmedizinischen Verfahren gehören die Szintigraphie, die Einzelphotonen-Emissions-Computertomographie (SPECT) sowie die Positronen-Emissions-Tomographie (PET). Diese funktionellen bildgebenden Verfahren haben den Vorteil, dass sie einen Rückschluss auf Stoffwechselprozesse oder die Expression bestimmter Oberflächenstrukturen, z.B. Rezeptoren oder Transportproteine, ermöglichen. Durch die gezielte Anreicherung der Nuklide in malignen Geweben lässt sich nicht nur deren Lage lokalisieren, sondern auch ein Rückschluss auf metabolische Funktionsstörungen ziehen. Eine parallele Anwendung von PET und CT (kombinierte PET/CT) vereint die Vorteile beider Methoden und erlaubt einen Rückschluss sowohl auf die Anatomie als auch die Physiologie des Tumors, was eine präzisere Diagnose und ein zuverlässigeres Staging ermöglicht.

Der am häufigsten eingesetzte Tracer für die Tumordiagnose im PET ist das mit Fluor-18 radiomarkierte Glucosederivat Fluordesoxyglucose (^{18}F -FDG). Nach intravenöser Gabe wird die Substanz bevorzugt in Geweben mit einer hohen metabolischen Rate angereichert. Dies gilt für Organe mit einem physiologisch hohen Energieumsatz, wie dem Gehirn oder der Leber, aber auch für entzündliche Gewebe sowie maligne Tumoren. Trotz des daraus resultierenden Nachteils der unspezifischen Anreicherung in nicht-kancerösen Geweben ist ^{18}F -FDG bis heute der Tracer der Wahl für die PET-basierte Tumordiagnostik^[87].

Eine mögliche Alternative ist die Verwendung radiofluorierter Aminosäuren, wie z.B. 2- ^{18}F Fluor-L-tyrosin (F-TYR) oder ^{18}F Fluor-L-dihydroxyphenylalanin (F-DOPA). Diese werden bevorzugt eingesetzt, wenn die Anwendung von ^{18}F -FDG nicht sinnvoll erscheint,

wie dies z.B. bei der Diagnose von Hirntumoren der Fall ist. Auch der Einsatz radiofluorierter Estrogene wie z.B. [^{18}F]-Fluoroestradiol für die Diagnose Estrogenrezeptor-positiver Brustkrebstypen findet bereits klinische Anwendung^[86].

Trotz der weiten Verbreitung dieser Substanzen und ihrer unbestritten wichtigen Bedeutung für die nuklearmedizinische Diagnostik sind die meisten Verbindungen aufgrund der geringen Spezifität in ihrem Einsatz limitiert und eignen sich nur unzureichend für die Darstellung angiogener Prozesse oder die Differenzierung von inflammatorischem und malignem Gewebe. Aus diesem Grund hat die Entwicklung tumorspezifischer Liganden einen wichtigen Stellenwert für die präzise nuklearmedizinische Diagnostik und die zielgerichtete Therapie maligner Tumoren.

2 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Identifizierung und Charakterisierung neuer tumorspezifischer Liganden für den zielgerichteten Transport diagnostischer oder therapeutischer Radionuklide sowie alternativer Effektormoleküle unter Verwendung der Phagen-Display-Technologie sowie Methoden des rationalen Wirkstoff-Designs. Bei dem Zielprotein handelt es sich um das tumorspezifische Markerprotein *Fibroblast Activation Protein- α* (FAP), welches selektiv in über 90 % der Tumore epithelialen Ursprungs exprimiert wird und nicht in benignen Läsionen oder gesundem, adultem Gewebe nachgewiesen werden kann.

Für die Identifizierung neuer Liganden mit Hilfe der Phagen-Display-Technologie wurden kombinatorische Peptidbibliotheken basierend auf den zyklischen, durch Disulfidbrücken stabilisierten Gerüststrukturen SFTI-1 und Min-23 hergestellt. Nach Durchführung des Biopannings über vier Runden wurden die identifizierten Peptide mittels Fmoc-Festphasensynthese hergestellt, zyklisiert und mittels HPLC/MS analysiert. Nach radioaktiver Markierung der Substanzen erfolgte eine Charakterisierung in Zellbindungsstudien.

Weiterhin sollte ein bereits mittels Phagen-Display identifiziertes FAP-spezifisches Mini-protein in Zellbindungs-, Kompletions- und Internalisierungsstudien sowie in tumortragenden Mäusen charakterisiert werden. Hierfür wurden Bioverteilungsexperimente sowie Bildgebungsstudien mit Hilfe eines Kleintier-PETs durchgeführt. Zur Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehungen des Miniproteins wurde eine Reihe von Strukturderivaten hergestellt, radiomarkiert und im Zellbindungsassay untersucht.

Darüber hinaus wurden, ausgehend von einem FAP-Inhibitor mit bekannter Leitstruktur, die FAP-spezifischen Tracer FAPI-01 bis FAPI-15 entwickelt und im Hinblick auf Target-Affinität und -Spezifität in Zellbindungs-, Kompletions- und Internalisierungsstudien sowie im Tiermodell charakterisiert. Hierfür wurden Bioverteilungsexperimente sowie Bildgebungsstudien mit Hilfe eines Kleintier-PETs durchgeführt. Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse der Tierexperimente wurden zwei der Substanzen für die klinische Bildgebung von Patienten mit unterschiedlichen epithelialen Tumoren sowie hochgradigen Glioblastomen eingesetzt.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Puffer und Lösungen

Die verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Lösungsmittel zur Herstellung der Puffer wurden von folgenden Herstellern bezogen:

Appllichem GmbH (Darmstadt), Bachem Distribution Services GmbH (Weil am Rhein), Bernd Kraft GmbH (Duisburg), Bio-Rad Laboratories GmbH (München), Biosolve BV (Valkenswaard, Niederlande), Carl Roth GmbH & Co.KG (Karlsruhe), Grüssing GmbH (Filsum), IRIS-Biotech (Marktredwitz), Merck Chemicals GmbH (Darmstadt), Orpegen (Heidelberg), Santa Cruz Biotechnology Inc. (Heidelberg), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) und VWR International GmbH (Bruchsal).

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Puffer mit deionisiertem, steril filtriertem Wasser angesetzt und ggf. vor Gebrauch autoklaviert. Der pH-Wert der Lösungen wurde vor dem Autoklavieren mit Hilfe eines pH-Meters bestimmt und bei Bedarf mit 1 M NaOH bzw. 1 M HCl-Lösung eingestellt.

Coomassie-Färbelösung: 45 % MeOH, 10 % HOAc, 0,1 % Brilliant Blue ad 500 ml H₂O

Coomassie-Entfärber: 2,5 % MeOH, 7 % HOAc, 1 % Glycerol ad 500 ml H₂O

DNA-Elektrophoresepuffer: 2 M Tris, 0,25 M NaOAc, 0,05 M EDTA ad 1000 ml H₂O

Elektrophoresepuffer: 3 g Tris, 14,4 g Glycin, 0,1% SDS ad 1000 ml H₂O

Glycin-HCl: 0,2 M Glycin ad 1000 ml H₂O, pH 2,2

Lysepuffer: 0,3 M NaOH, 0,2 % SDS ad 1000 ml H₂O

PEG/NaCl 20%: 100 g PEG-8000, 73 g NaCl ad 500 ml H₂O

PBS: 8 g NaCl, 0,27 g KCl, 1,42 g Na₂HPO₄, 0,24 g KH₂PO₄ ad 1000 ml H₂O, pH 7,4

PBST: 0,5 ml Tween-20 ad 1000 ml PBS

RIPA-Puffer: 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 0,1 % SDS, 1 % Igepal, 0,5 % Na-Desoxycholat ad 1000 ml H₂O

SDS-Probenpuffer (4x): 62,5 mM Tris-HCl, 2 % SDS, 20 % Glycerol, 100 mM DTT, 0,005 % Bromphenolblau ad 50 ml H₂O

Stripping-Puffer: 3,125 ml 1 M Tris-Lösung pH 6,8, 345 µl Mercaptoethanol, 2 % SDS ad 50 ml H₂O

TAE-Puffer: 40 mM Tris, 1 mM EDTA, 20 mM HOAc ad 1000 ml H₂O

TBS: 5 mM Tris, 15 mM NaCl ad 1000 ml H₂O, pH 7,4

TBST: 0,5 ml Tween-20 ad 1000 ml TBS

Transferpuffer: 3 g Tris, 11,25 g Glycin, 100 ml MeOH ad 1000 ml H₂O, pH 8,3

Triton-X 1%: 1 ml Triton-X ad 100 ml TBS

3.1.2 Antikörper

Bezeichnung	Herkunft	Verdünnung
mouse anti-human FAP- α , monoklonal	Abnova	1:2500
mouse anti-DPP4, monoklonal	OriGene	1:1000
mouse anti- β -Aktin, monoklonal	Abcam	1:5000
goat anti-human IgG	Jackson IR	1:5000
goat anti-mouse IgG ₁ -HRP, polyklonal	Santa Cruz Biotech	1:5000
rabbit anti-goat IgG-HRP, polyklonal	PromoKine	1:5000

Tabelle 3.1. Bezeichnung, Herkunft und Verdünnung der eingesetzten Antikörper

3.1.3 Zelllinien

Eine Übersicht der verwendeten Zelllinien ist in Tabelle 3.2 gegeben. Je nach Linie wurden die Zellkulturmedien Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) oder RPMI 1640 (jeweils mit GlutaMax und HEPES, High Glucose, Gibco, Thermo Scientific) unter Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (FBS, Gibco, Thermo Scientific) verwendet. Das Kulturmedium für die mit * gekennzeichneten, transfizierten Linien wurde zusätzlich mit 200 µg/ml des Selektionsantibiotikums Hygromycin supplementiert. Für die subkutane Inokulation von tumorigenen Zellen in immundefiziente Mäuse wurde OptiMEM (Gibco, Thermo Scientific) ohne Zusätze verwendet.

Zelllinie	Beschreibung und Herkunft	Medium
BxPC3	humanes Pankreaskarzinom (Sigma Aldrich, Steinheim)	RPMI
Capan-2	humanes Pankreaskarzinom (Sigma Aldrich, Steinheim)	RPMI
CHO-FAP	CHO-Zellen transfiziert mit humanem FAP (Biontech AG, Mainz)	RPMI*
CHO-muFAP	CHO-Zellen transfiziert mit murinem FAP (Biontech AG, Mainz)	RPMI*
CHO-mock	mock-transfizierte CHO-Zellen (Biontech AG, Mainz)	RPMI
CT26-wt	murines Kolonkarzinom (ATCC, Manassas, USA)	RPMI
CT26-FAP	murines Kolonkarzinom, transfiziert mit humanem FAP (Biontech AG, Mainz)	RPMI*
HEK-CD26	HEK-293-Zellen, transfiziert mit humanem CD26 (Stefan Bauer, NCT Heidelberg)	DMEM
HEK-muFAP	HEK-293-Zellen, transfiziert mit murinem FAP (Stefan Bauer, NCT Heidelberg)	DMEM
HT-1080-FAP	humanes Fibrosarkom, transfiziert mit humanem (FAP Stefan Bauer, NCT Heidelberg)	DMEM
MCF-7	humanes Mammakarzinom (Sigma Aldrich, Steinheim)	RPMI
SK-LMS-1	humanes Leiomyosarkom (ATCC Manassas, USA)	RPMI
U87MG	humanes Glioblastom (ATCC Manassas, USA)	DMEM

Tabelle 3.2. Ursprung, Herkunft und Kulturmedien der Zelllinien

3.1.4 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Agarosegelkammer PerfectBlue Gel System	VWR, Darmstadt
Autoklav Systec 5075 EL	Systec, Wettenberg
CO ₂ -Inkubator Forma Scientific 3860	Thermo Scientific, Darmstadt
Feinwaage XS105	Mettler-Toledo, Greifensee (CH)
Fluorometer Qubit 3.0	Thermo Scientific, Darmstadt
Gammacounter Berthold LB 951G	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Gammacounter Packard Cobra Autogamma	GMI, Anoka (USA)
Gammakamera Millenium Hawk-Eye	GE Healthcare, München
Geldokumentationsstation DP-001.FDC	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Ge-68/Ga-68-Generator	Themba Labs, Somerset West (ZA)
HPLC Agilent 1100	Agilent, Santa Clara (USA)
HPLC Agilent 1200	Agilent, Santa Clara (USA)
HPLC-MS Exactive	Thermo Scientific, Darmstadt
Kleintier-PET Inveon	Siemens, Erlangen
Kleintier-SPECT/CT	Biospace, Nesles la Valle (FR)
Laborwaage Kern PLJ	Kern & Sohn, Balingen
Laborwaage Mettler PM4800 Deltarange	Mettler-Toledo, Gießen
Millipore-Anlage Purelab Plus UV	USF Elga, Ransbach-Baumbach
LSM-Mikroskop Zeiss LSM 700	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Massenspektrometer Exactive	Thermo Scientific, Darmstadt
Narkosegasverdampfer Dräger Vapor 19.1	Drägerwerk AG, Lübeck
Peptid-Synthesizer Prelude PT	Gyros PT, Tucson (USA)
pH-Meter inolab pH 7110	WTW, Weilheim
Plattformschüttler Heidolph Titramax 101	Heidolph Instruments, Schwabach
Präparative HPLC LaPrep P110	VWR, Pennsylvania (USA)
Semi-Dry-Blotter Owl HEP-1	Thermo Scientific, Darmstadt
Schüttelinkubator SM-30	Edmund Bühler, Bodelshausen
Spektrophotometer Nanodrop Lite	Thermo Scientific, Darmstadt
Thermocycler BIO-RAD T100 Thermal Cycler	Bio-Rad, München
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg

Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
UV-Spektrophotometer Ultrospec 3100 pro	Amersham Biosciences, München
Vakuumanlage Rotavapor M	Büchi, Essen
Vortex Mixer	Neolab, Heidelberg
Wasserbad GFL	GFL, Burgwedel
Western Blot Gelkammer Mini Protean Tetra	Bio-Rad, München
Zellzähler Vi-CELL XR	Beckman Coulter, Krefeld
Zentrifuge Heraeus Multifuge 1 S-R	Thermo Scientific, Darmstadt
Zentrifuge Heraeus Fresco 17	Thermo Scientific, Darmstadt

Tabelle 3.3. Bezeichnung und Herkunft der eingesetzten Geräte

3.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden

3.2.1 Zellkultur

Eine genaue Übersicht der verwendeten Zelllinien und Zellkulturmedien ist in Tabelle 3.2 gegeben. Alle Zelllinien wurden im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Um eine Kontamination mit Mykoplasmen auszuschließen, wurden alle Zelllinien in regelmäßigen Abständen unter Verwendung eines PCR Mykoplasmen-Test-Kits überprüft (PCR Mycoplasma Test Kit I/C, PromoKine, Heidelberg). Das Passagieren der Zellen erfolgte bei ca. 80-90 % Konfluenz durch die Zugabe von Trypsin. Zur Kryokonservierung wurden jeweils zwei Millionen Zellen in Einfriermedium (jeweiliges Zellkulturmedium, 20 % FBS und 10 % DMSO) aufgenommen, in Kryoröhrchen überführt und kontinuierlich im Isopropanol-Bad abgekühlt. Die kurzzeitige Lagerung erfolgte bei -80 °C; bei Lagerungszeiten über acht Wochen wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff bei -196 °C aufbewahrt. Nach dem Auftauen der Zellen im Wasserbad bei 37 °C wurde das Einfriermedium durch Zentrifugation für 5 min bei 1100 rpm und Raumtemperatur vollständig entfernt. Die Zellen wurden mit 10 ml vorgewärmtem Zellkulturmedium gewaschen und in Zellkulturflaschen überführt. Um Intoxikationen der Zellen durch eventuell noch vorhandene Spuren von DMSO zu vermeiden, wurde nach 24 Stunden ein Medienwechsel vorgenommen. Für die Bestimmung der Zellzahl sowie der Zellvitalität nach der Trypanblau-Methode wurde ein automatischer Zellzähler verwendet.

3.2.2 Bestimmung der Proteinexpression

Gesamtproteinextraktion aus Zellen und SDS-PAGE

Zur qualitativen Bestimmung der Zielproteinexpression der verwendeten Zelllinien wurden in regelmäßigen Abständen von acht bis zwölf Wochen Proteinnachweise mittels SDS-PAGE und anschließender Western Blot-Analyse durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen in T175-Zellkulturflaschen ausgesät und im jeweiligen Wachstumsmedium bis zu einer Konfluenz von 80-90 % kultiviert. Die Zellen wurden drei Mal mit eiskaltem PBS gewaschen, mit einem Zellschaber vom Flaschenboden abgelöst und mit je 10 ml PBS in ein 15 ml-Falcon überführt. Nach Zentrifugation für fünf Minuten bei 4 °C mit 1200 rpm wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet mit 1 ml RIPA-Puffer unter Zusatz von Proteaseinhibitoren (Complete Mini, EDTA-free, Roche) resuspendiert. Nach Inkubation für zehn Minuten bei 4 °C wurde die Suspension 15 Minuten bei 4 °C mit 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand, der die gelösten Zellproteine enthält, wurde in ein 1,5 ml-Eppendorf-Tube überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Zur Denaturierung der nativen Proteine wurden je 75 µl der Proteinlösung mit 25 µl 4x SDS-Probenpuffer versetzt und 10 Minuten bei 95 °C aufgeköcht. Nach dem Abkühlen wurden je 20 µl der Probenlösung in separate Geltaschen eines Acrylamid-Gels aufgetragen. Die verwendeten Gele, bestehend aus Sammel- und Trenngel, wurden zuvor nach den in Tabelle 3.4 aufgeführten Angaben gegossen.

	Trenngel 8%	Trenngel 10%	Sammelgel
Trennbereich (kDa)	30-95	20-80	—
H ₂ O (ml)	7,0	5,9	3,4
1,5 M Tris pH 8,8 (ml)	3,8	3,8	—
1,5 M Tris pH 6,8 (ml)	—	—	0,63
30% Acrylamid (ml)	4,0	5,0	0,83
10% SDS (µl)	150	150	50
10% APS (µl)	150	150	50
TEMED (µl)	15	15	5

Tabelle 3.4. Zusammensetzung der SDS-Gele

Je nach Größe des zu detektierenden Proteins wurden 8 bzw. 10 %ige Trenngele verwendet. Um eine Größenabschätzung der aufgetrennten Proteine zu ermöglichen, wurden zusätzlich 8 µl eines Größenmarkers (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific) aufgetragen. Der Gellauf wurde in Elektrophoresepuffer 15 Minuten bei 90 V und ca. 90 Minuten bei 120 V in einer Gelkammer durchgeführt.

Western Blot und Immundetektion der Zielproteine

Nach der Auftrennung mittels SDS-PAGE wurden die Proteine mit Hilfe des Western Blot-Verfahrens auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) übertragen. Hierfür wurde die Membran ca. 30 Sekunden in Methanol getränkt und anschließend gründlich mit Transferpuffer benetzt. Das SDS-Gel wurde in einem Semi-Dry-Blotter auf ein mit Transferpuffer getränktes Blotpapier gelegt und blasenfrei mit der PVDF-Membran sowie einem weiteren, mit Transferpuffer vorbehandelten Blotpapier bedeckt. Die Apparatur wurde verschlossen und der Transferprozess bei Raumtemperatur und einer Stromstärke von 200 mA pro Gel für 45 Minuten durchgeführt.

Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran mit PBS gespült und für eine Stunde in einer Blockierlösung aus 5 % Milchprotein in TBST geschwenkt. Anschließend wurde der jeweilige Zielprotein-spezifische Primärantikörper (siehe Tabelle 3.1) zugegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Membran wurde drei Mal für je zehn Minuten mit TBST gewaschen und anschließend zwei Stunden bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper (in 5 % Milchprotein in TBST) inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TBST (drei Mal für je zehn Minuten) wurde die Entwicklerlösung, bestehend aus gleichen Teilen ECL (*Enhanced Chemoluminescence*)-Substrat und Oxidationslösung (Western Lightning Plus ECL, Perkin-Elmer, USA) zugegeben und eine Minute auf der Membran belassen. Die Proteindetektion erfolgte nach Beleuchtung eines Röntgenfilms (Amersham Hyperfilm, Sigma-Aldrich) für zehn bis 60 Sekunden in der Dunkelkammer.

Um eine erneute Antikörperfärbung der selben Membran zu ermöglichen, wurden die bereits gebundenen Antikörper durch das sogenannte Membran-Stripping entfernt. Hierfür wurde die PVDF-Membran unter leichtem Schütteln für 30 Minuten bei 50 °C in Stripping-Puffer inkubiert. Dabei wurde die Bindung der Antikörper an die auf die Membran transferrten Proteine durch den im Puffer enthaltenen Mercaptoethanol getrennt. Anschließend wurde die Membran mehrmals mit Wasser gespült, bis der Geruch nach Mercaptoethanol

vollständig verschwunden war. Nach einer erneuten Inkubation der Membran in Blockierlösung für eine Stunde konnte eine weitere Antikörperfärbung durchgeführt werden. Die eingesetzten Primär- und Sekundärantikörper sind in Tabelle 3.1 gelistet.

Coomassie-Färbung

Zum direkten Nachweis der aufgetrennten Proteine im SDS-Gel wurde das Gel eine Stunde bei Raumtemperatur in 10 ml einer Coomassie-Färbelösung inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung verworfen und das Gel bei Raumtemperatur unter mehrmaligem Wechsel der Lösung im Entfärber geschwenkt, bis die blaue Färbung nahezu vollständig verschwunden war.

3.2.3 Plasmidpräparation

Mini-Präparation

Für die Isolierung kleiner Plasmid-DNA-Mengen aus Bakterienkulturen kleiner 20 ml wurde die Plasmidpräparation nach dem Prinzip der alkalischen Lyse mit Hilfe des GeneJET Plasmid Miniprep Kits (Thermo Scientific, Darmstadt) nach Protokoll der Herstellers durchgeführt. Hierfür wurde die über Nacht amplifizierte Bakterienkultur zwei Minuten bei 4 °C und 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet gemäß den Herstellerangaben resuspendiert und lysiert. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung der Plasmid-DNA wurde diese mit Wasser (Aqua ad iniectabilia, B. Braun) eluiert.

Maxi-Präparation

Für die Isolierung größerer Plasmid-DNA-Mengen aus Bakterienkulturen größer 20 ml wurde die Plasmidpräparation nach dem Prinzip der alkalischen Lyse mit Hilfe des QIAGEN Plasmid Maxi Kits (QIAGEN, Hilden) nach Protokoll der Herstellers durchgeführt. Hierfür wurde die über Nacht amplifizierte Bakterienkultur 15 Minuten bei 4 °C und 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet gemäß den Herstellerangaben resuspendiert und lysiert. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung der Plasmid-DNA wurde diese mit Isopropanol ausgefällt, mit Ethanol gewaschen und in Wasser aufgenommen.

3.2.4 DNA-Reinigung mittels Agarose-Gelextraktion

Die Aufreinigung von PCR-Produkten oder Plasmid-DNA mit einer Größe zwischen 70 bp und 10 kb erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese und anschließender Gelextraktion. Für die Herstellung des Gels wurden 1,5 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer aufgenommen und in der Mikrowelle aufgeköcht bis die Agarose vollständig gelöst war. Nach Abkühlung der Lösung auf ca. 60 °C wurden 2 µl Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,2 µg/ml) zur Fluoreszenzfärbung der DNA zugegeben. Die Lösung wurde in einen Gelschlitten gegossen und das Gel nach dem vollständigen Aushärten mit den zu reinigenden DNA-Proben beladen. Je nach Größe der zu trennenden Fragmente wurde ein 50 bp- bzw. 1 kb-DNA-Marker (GeneRuler DNA Ladder) als Referenz verwendet. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 120 V für 30 bis 45 Minuten durchgeführt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der DNA wurde das benötigte Fragment mit einem Skalpell ausgeschnitten und unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kits (QIAGEN, Hilden) gemäß den Herstellerangaben gereinigt. Sofern nicht anders angegeben, erfolgte die Elution der DNA in Wasser.

3.2.5 DNA-Restriktion und Anlagerung von Sequenzierprimern

Die Analyse der im Phagen-Display angereicherten Peptidsequenzen erfolgte durch Sequenzierung der zugrundeliegenden DNA nach dem NGS-Verfahren (*Next Generation Sequencing*) durch die Firma GATC Biotech, Konstanz. Hierfür werden spezielle Sequenzierprimer benötigt, die mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) an den zu sequenzierenden DNA-Abschnitt angefügt werden. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Reaktionen mit der KOD Hot Start DNA-Polymerase unter Verwendung der beigegefügt Puffer und Reagenzien durchgeführt (Novagen KOD Hot Start DNA Polymerase Kit, Merck KGaA, Darmstadt).

Zunächst wurde die durch Maxi-Präparation isolierte Plasmid-DNA mit den Restriktionsenzymen EcoRI und NotI (Thermo Scientific FastDigest) enzymatisch verdaut, das resultierende DNA-Fragment nach Gelextraktion mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits gereinigt (QIAGEN, Hilden) und mit Wasser eluiert. Anschließend wurden die Sequenzierprimer mittels PCR angefügt und das entsprechende DNA-Fragment amplifiziert. Hierfür wurden je Ansatz 40 ng DNA verwendet. Die genauen Restriktionsbedingungen sowie die bei der PCR verwendeten Parameter sind in den Tabellen 3.5 und 3.6 angegeben.

DNA-Menge	1 µg	2 µg	30 µg
EcoRI	1 µl	2 µl	20 µl
NotI	1 µl	2 µl	2 µl
10x Green Buffer	2 µl	4 µl	40 µl
H ₂ O	ad 20 µl	ad 40 µl	ad 400 µl

Inkubation für 30 min bei 37 °C, Enzym-Inaktivierung für 5 min bei 80 °C

Tabelle 3.5. Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

	SFTI-8	Min-10
Template-DNA		je 40 ng
MgSO ₄ 25mM		je 3 µl
dNTPs (je 2mM)		je 5 µl
KOD Hot Start DNA Polymerase (1 U/µl)		je 0,5 µl
Forward Primer Ph/gpcf for 10 µM		je 1 µl
SFTI-Reverse Primer PhSfti/gpcf rev 10 µM	1 µl	—
Min-Reverse Primer PhMin/gpcf rev 10 µM	—	1 µl
10x Puffer für KOD-Polymerase		je 5 µl
H ₂ O		je ad 50 µl

Tabelle 3.6. Zusammensetzung der Sequenzierungs-PCR

3.3 Aufbau der Peptid-Bibliotheken für den Einsatz im Phagen-Display

Die im Phagen-Display verwendeten Peptidbibliotheken wurden basierend auf den Gerüststrukturen SFTI-1 und Min-23 hergestellt. Hierfür wurden aus den jeweiligen Basentriplets DNA-Oligonukleotide, sogenannte Bibliotheksprimer, generiert (ELLA Biotech, München). Diese enthalten die für die Peptidsequenz des zugrundeliegenden Scaffolds codierenden DNA-Abschnitte sowie eine Mischung der für die variable Sequenz codierenden Basentriplets. Hierbei steht für jede Aminosäure ein definiertes Basentriplett zur Verfügung. Nicht enthalten sind Stop-Codons sowie Tripletts, die für die Aminosäure Cy-

stein kodieren, um die Ausbildung einer zusätzlichen Disulfidbrücke zu vermeiden. Darüber hinaus enthalten die Bibliotheksprimer geeignete Schnittstellen für die Restriktionsenzyme NcoI und NotI (Thermo Scientific FastDigest), mit deren Hilfe das finale DNA-Konstrukt in den Phagemid-Vektor pSEX81 eingefügt werden kann. Nach Ligation der Forward- und Reverse-Primer wurde das resultierende DNA-Konstrukt mittels Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert. Aufgrund der längeren DNA-Sequenz wurde für den Aufbau der Min10-GP-Bibliothek ein zweiter Forward-Primer benötigt. Dieser wurde in einer zweiten PCR an das Fusionsprodukt aus der ersten PCR angefügt.

Aufbau der Min10.FAP-GP-Bibliothek

Die im Phagen-Display eingesetzte Min-Bibliothek basiert auf dem bityklischen Grundgerüst Min-23, einer verkleinerten Form des Trypsininhibitors EETI-II (*Ecballium elaterium trypsin inhibitor II*) und ist durch zwei Disulfidbrücken stabilisiert. In der ursprünglichen Bibliothek Min10 ist eine Teilsequenz des Originalpeptids Min-23 durch eine Schleife aus zehn variablen Aminosäuren ersetzt. Im Hinblick auf die Identifizierung FAP-spezifischer Liganden wurde dies in der Min10.GP-FAP-Bibliothek geringfügig modifiziert, indem die ersten drei Aminosäuren N-terminal (LMR) teilrandomisiert wurden. Zusätzlich wurde das GP-Motiv an den Positionen 7 und 8 in der Bindeschleife verankert (siehe Abschnitt 4.1). Die Bibliothek wurde ausgehend von den in Tabelle 3.10 angegebenen Bibliotheksprimern erstellt.

Um die optimale Temperatur für die Primerhybridisierung (Annealing) zu ermitteln, wurde zunächst eine PCR mit einem Temperaturgradienten von 60 bis 75 °C durchgeführt. Das resultierende DNA-Fragment (97 bp) wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese (2 % Agarose) gereinigt und analysiert. Da eine Annealing-Temperatur von 60 °C das beste Ergebnis mit der höchsten Produkt-Ausbeute erzielte, wurde diese Temperatur im Folgenden für die Primerhybridisierung beibehalten. Für die Herstellung des ersten Sequenzabschnittes wurden 26 Ansätze à 50 µl eingesetzt, nach erfolgter PCR auf einem Agarose-Gel analysiert und mittels QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) gereinigt. Das Produkt wurde mit insgesamt 200 µl Wasser eluiert und die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt (NanoDrop). Für die Anlagerung des zweiten Sequenzabschnitts wurde eine zweite PCR durchgeführt; hierfür wurden 30 Ansätze mit jeweils 40 ng DNA-Produkt aus der ersten Reaktion verwendet. Das resultierende DNA-Fragment (135 kb) wurde auf einem Agarose-Gel

(2 % Agarose) analysiert und mittels QIAquick Gel Extraction Kit gereinigt. Das Produkt wurde mit insgesamt 50 µl Wasser eluiert und die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt. Um die korrekte Zusammenlagerung der Bibliotheksprimer zu überprüfen wurde das finale DNA-Fragment nach Sanger sequenziert (GATC Biotech AG, Konstanz).

Ligation der Bibliothek mit pSEX81 und Transformation in E.coli XL1 blue

Um die Ligation der Bibliothek in den Phagemid-Vektor pSEX81 zu ermöglichen, wurden Vektor und Bibliothek mit den Restriktionsenzymen NcoI und NotI geschnitten. Um eine Religation des Vektors zu vermeiden, wurde dieser zusätzlich mit HindIII geschnitten. Nach Inkubation von 40 µg des Vektors mit NcoI, NotI und HindIII für 30 Minuten bei 37 °C, wurden die Enzyme für zehn Minuten bei 80 °C inaktiviert. Das Produkt wurde nach Gelextraktion (1,5 % Agarose) mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits gereinigt und in 100 µl Wasser aufgenommen. Um eine Religation des Vektors zu erschweren, wurde die gesamte DNA-Menge mit alkalischer Phosphatase (1 U/pmol DNA) umgesetzt und anschließend mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits (QIAGEN) gereinigt. Die Konzentrationsbestimmung des Produkts erfolgte fluorometrisch. Die genauen Parameter des Restriktionsverdau sind in Tabelle 3.7 zusammengefasst.

Um das optimale Ligationsverhältnis von Vektor zu Bibliotheks-DNA, dem sogenannten Insert, zu bestimmen, wurden Testligationen in verschiedenen Verhältnissen durchgeführt (siehe Tabelle 3.8).

	pSEX81	Min10.FAP-GP-Insert
NcoI (µl)	30	10
NotI (µl)	30	10
HindIII (µl)	10	—
10x Puffer (µl)	60	20
DNA (µg)	40	10
ad H ₂ O (µl)	600	200

Tabelle 3.7. Restriktionsverdau des Phagemid-Vektors und der Min10.FAP-GP-Bibliothek

	1:2	1:5	1:10	negativ
10x Puffer (μl)	3	6	3	3
Vektor pSEX81 (ng)	100	200	100	100
Min10.FAP-GP-Insert (ng)	5,6	28	28	—
T4 DNA-Ligase (μl)	1	2	1	1
ad H ₂ O (μl)	30	60	30	30

Tabelle 3.8. Ligationsansätze für die Herstellung der Min10.FAP-GP-Bibliothek

Die Ansätze wurden über Nacht bei 16 °C inkubiert und anschließend mittels Elektroporation in 0,1 cm-Küvetten in elektrokompente E.coli-Bakterien (Stamm XL1 blue) transfiziert (Elektroporation bei 1700 V für 5 ms). Unmittelbar nach der Transformation wurden die Bakterien in jeweils 1 ml vorgewärmtem SOC-Medium aufgenommen und für eine Stunde bei 37 °C im Schüttelinkubator amplifiziert. Anschließend wurden aus jedem Ansatz jeweils 1, 10, 100 und 300 μl der Kultur entnommen, ggf. mit SOC-Medium auf 300 μl aufgefüllt und auf LB-/Glu-/Amp-Platten ausplattiert. Nach Inkubation der Platten über Nacht bei 37 °C wurden die Bakterienkolonien gezählt. Dabei zeigte sich, dass ein Ligationsverhältnis von einem Teil Vektor zu zehn Teilen Insert die höchste Transformationseffizienz erzielte, so dass dieses Verhältnis für die nachfolgende Ligation beibehalten wurde. Es wurden 15 Ligationsansätze zu je 30 μl über Nacht bei 16 °C inkubiert und anschließend zehn Minuten auf 65 °C erhitzt, um die Ligase vollständig zu inaktivieren. Die Ansätze wurden gepoolt, mittels QIAquick PCR Purification Kit gereinigt und in 100 μl Wasser aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte fluorometrisch. Die Transformation in XL1 blue wurde in zwei Durchläufen mit jeweils 13 Ansätzen (je 35 ng DNA und 30 μl Bakteriensuspension) wie oben beschrieben durchgeführt. Unmittelbar nach der Transformation wurden die Bakterien in jeweils 1 ml vorgewärmtem SOC-Medium aufgenommen und für eine Stunde bei 37 °C im Schüttelinkubator amplifiziert. Zur Transformationskontrolle wurden aus jedem Ansatz jeweils 10 μl der Kultur entnommen, mit SOC-Medium auf 200 μl aufgefüllt und auf LB-/Glu-/Amp-Platten ausplattiert.

Alle Proben eines Durchlaufs wurden gepoolt und in 87 ml vorgewärmtem SOC-Medium auf ein Gesamtvolumen von 100 ml aufgenommen. Die Bakterienkultur wurde bei 37 °C im Schüttelinkubator amplifiziert bis eine optische Dichte (OD_{600}) von ca. 0,5 erreicht war. Zur Selektion der erfolgreich transfizierten Bakterien wurde Ampicillin in einer End-

konzentration von 100 µg/ml zugegeben und die Kultur für weitere 30 Minuten bei 37 °C geschüttelt. Nach Zentrifugation der Kultur (7 Minuten bei 4000 rpm, 4 °C) wurde das Bakterienpellet resuspendiert und in 50 ml frischem SOC-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin aufgenommen. Anschließend wurde 1 ml des Helferphagen M13K07 ($> 10^{11}$ pfu) zugegeben. Nach Inkubation der Kultur für eine Stunde bei 37 °C im Schüttelinkubator wurde Kanamycin in einer Endkonzentration von 75 µg/ml zugegeben und die infizierten Bakterien über Nacht bei 37 °C amplifiziert. Bei allen Ligationen und Transfektionen wurden entsprechende Negativ- und Positivkontrollen durchgeführt. Für die Ligationskontrolle wurde der geschnittene Vektor ohne Zugabe der Insert-DNA verwendet. Die Transfektionskontrolle erfolgte durch Transformation des geschnittenen Vektors ohne vorherige Ligation und des Negativ-Ligationsansatzes (Vektor ohne Insert) sowie der Transformation des Kontrollplasmides pUC18 gemäß Herstellerangaben (siehe Tabelle 3.9). Die Kontrolle des Bakterienwachstums erfolgte durch spektroskopische Messung der optischen Dichte bei 600 nm.

Ligationsansatz	XL1 blue (µl)	DNA (µl)
pUC18 1:10 (Positivkontrolle)	30	1
Negativligation	30	10
Negativtransformation (nur pSEX81)	30	1
Plasmid : Insert = 1:2	30	10
Plasmid : Insert = 1:10	30	10
Plasmid : Insert = 1:5	30	0,1/10/20
	50	0,1/1/10

Tabelle 3.9. Transformationsansätze für die Herstellung der Min10.FAP-GP-Bibliothek

Aufreinigung der Phagenbibliothek

Nach Inkubation der Bakterienkultur über Nacht wurden die amplifizierten Phagen mit Hilfe von Polyethylenglykol-8000 (PEG-8000) ausgefällt. Hierfür wurde die Bakterien-Phagen-Suspension 20 Minuten bei 4 °C mit 4000 rpm zentrifugiert und je 25 ml des Überstandes nach Zentrifugation zu je 5 ml vorgekühlter PEG-NaCl-Lösung gegeben. Die Präzipitation der Phagen erfolgte für zwei Stunden auf Eis. Anschließend wurde die Lösung für 30 Minuten bei 4 °C mit 4000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet

in 500 µl PBS aufgenommen. Nach Zugabe von je 100 µl PEG-NaCl-Lösung wurden die Phagen eine Stunde auf Eis nachgefällt. Die Lösung wurde für 15 Minuten bei 4 °C mit 13.000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 500 µl PBS resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation bei Raumtemperatur für 5 Minuten mit 13.000 rpm wurde der Überstand abgenommen und in 500 µl 50 %iger Glycerol-Lösung aufgenommen. Die Lagerung der Phagenbibliothek erfolgte bei -20 °C.

Zur Bestimmung des Phagentiters wurden 3 µl der Bibliothek in einem Gesamtvolumen von 300 µl PBS aufgenommen. Davon ausgehend wurde eine Verdünnungsreihe von 0 bis 10^{-11} angelegt, die jeweiligen Verdünnungen mit jeweils 250 µl Bakterienkultur versetzt und auf Agar-LB-Amp-Platten ausgestrichen. Nach Inkubation der Platten über Nacht bei 37 °C wurde nach Auszählung der Kolonien ein Phagentiter von 6×10^9 pfu/µl bestimmt.

Um den korrekten Aufbau sowie die Variabilität der fertigen Bibliothek zu überprüfen, wurde die Plasmid-DNA isoliert, an geeigneten Stellen enzymatisch geschnitten und nach Sanger sequenziert (GATC Biotech). Hierfür wurde ausgehend von 10 µl der Phagenbibliothek eine Maxi-Präparation gemäß Abschnitt 3.2.3 durchgeführt. Die gereinigte Plasmid-DNA wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI und NotI umgesetzt und das resultierende 200 bp-große DNA-Fragment nach Gelextraktion (1,5 % Agarose) mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits gereinigt. Das Produkt wurde mit insgesamt 100 µl Wasser eluiert und die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt. Die für die Sequenzierung erforderlichen Primer wurden mittels PCR, wie in Abschnitt 3.2.5 beschrieben, angefügt. Das PCR-Produkt wurde mittels QIAquick PCR Purification Kit gereinigt, in 50 µl Wasser aufgenommen und nach Sanger sequenziert (GATC Biotech).

Aufbau der SFTI8-Bibliothek

Die im Phagen-Display eingesetzte SFTI-Bibliothek besteht aus dem monozyklischen Grundgerüst des *Sunflower Trypsin Inhibitors 1* (SFTI-1) sowie einer acht Aminosäuren umfassenden variablen Schleife. Sie wurde ausgehend von den in Tabelle 3.10 angegebenen Bibliotheksprimern aufgebaut.

Um die optimale Temperatur für die Primerhybridisierung (Annealing) zu ermitteln, wurde zunächst eine PCR mit einem Temperaturgradienten von 56 bis 62 °C durchgeführt. Das resultierende DNA-Fragment (96 bp) wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese (2 %

Agarose) gereinigt und analysiert. Da eine Annealing-Temperatur von 62 °C das beste Ergebnis mit der höchsten Produkt-Ausbeute erzielte, wurde diese Temperatur im Folgenden für die Primerhybridisierung beibehalten. Es wurden 32 Ansätze à 25 µl verwendet, nach erfolgter PCR auf einem Agarose-Gel analysiert und mittels QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) gereinigt. Das Produkt wurde mit insgesamt 1336 µl Wasser eluiert und die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt. Die Ligation mit dem Phagemid-Vektor pSEX81, die Transformation in elektrokompente E.coli XL1 blue sowie die Aufreinigung der Phagenbibliothek erfolgte analog der Min10.FAP-GP-Bibliothek wie in den Abschnitten 3.3 und 3.3 angegeben.

Bezeichnung	Primersequenz
SFTI1-T8 for	5'TA CTC GCT CCA TGG GC GGC AGG TGT ACT XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX TGT TAT CCC GAT 3'
SFTI1 rev	5'ATA ATC TT GCGGCCGC ACC GCC ACC TGC TGC ATC GGG ATA ACA 3'
Min10Ph.FAP-GP01 forward	5'AGC GAT TGC CTG GCG GGC AGC GTG TGC XXX XXX XXX XXX XXX XXX XXX GGT CCG X01 TTC TGC GGC GCA GCA 3'
Min10Ph.FAP-GP02 forward	5'TTA CTC GCT CCA TGG GC X02 X03 X04 TGC AAA CAG GAT AGC GAT TGC CTG GCG GGC 3'
MinNot_shortrev	5'ATA ATC TT GCGGCCGC ACC GCC GCT TGC TGC GCC GCA GAA 3'
XXX: alle Codons außer TGC (Cys)	
X01: 30% GAC, 70% alle Codons außer GAC (Asp) und TGC (Cys)	
X02: 67% CTG, 33% alle Codons außer CTG (Leu) und TGC (Cys)	
X03: 67% ATG, 33% alle Codons außer ATG (Met) und TGC (Cys)	
X04: 67% CGT, 33% alle Codons außer CGT (Arg) und TGC (Cys)	

Tabelle 3.10. PCR-Primer für die Herstellung der SFTI8- und Min10.FAP-GP-Bibliothek

3.4 Durchführung des Biopannings

Zellbasiertes Screening

Für die zellbasierte Selektion von FAP-affinen Peptiden wurden die Zelllinien CHO-FAP und CT26-FAP verwendet. Vor der Inkubation der Phagenbibliothek mit den FAP-positiven Zellen erfolgte ein Negativpanning auf den entsprechenden FAP-negativen Zelllinien CHO mock bzw. CT26 wt. Alle Inkubationsschritte wurden bei 37 °C in T175-Zellkulturflaschen durchgeführt. Vor der Zugabe der Phagenbibliothek wurden die Zellen drei Mal mit jeweils 10 ml PBS gewaschen. Für die erste Panning-Runde wurden jeweils 10^{10} pfu der Phagenbibliothek in 20 ml RPMI ohne Zusätze gegeben und für eine Stunde mit den FAP-negativen Zellen inkubiert. Das Medium wurde abgenommen, auf die FAP-positiven Zellen gegeben und für eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Medium mit den ungebundenen Phagen abgenommen und verworfen. Die Zellen wurden drei Mal mit PBS und ein Mal mit PBST gewaschen, mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und in 10 ml PBS aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml-Falcon überführt und fünf Minuten mit 1200 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Zur Abtrennung der Phagenpartikel wurde das Zellpellet mit 1 ml Triton-X-Lösung (1 % in Wasser) versetzt und fünf Minuten mit 13.000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Lagerung der isolierten Phagenpartikel erfolgte bei -20 °C. Nach Bestimmung des Phagentiters (siehe Abschnitt 3.3) wurden für die weiteren Panning-Runden jeweils 10^9 Phagen eingesetzt und das Biopanning analog der ersten Runde durchgeführt.

Biopanning gegen rekombinantes Protein

Für die Selektion von affinen Peptiden gegen isoliertes humanes FAP wurde die rekombinant erzeugte Ektodomäne des Proteins mit C-terminalem His6-Tag verwendet. Dieses wurde von der Firma Biontech AG in rekombinanten CHO-Zellen hergestellt, mittels Nickel-Affinitätschromatographie und anschließender Gelfiltration aufgereinigt und die Proteinreinheit mittels reduzierter SDS-PAGE und Western Blot-Analyse überprüft. Zur Bestimmung der biologischen Aktivität des Proteins wurde unter Einsatz des fluoreszenten Substrates Z-Gly-Pro-AMC ein Enzymassay durchgeführt.

Für das Biopanning mit der SFTI-Bibliothek wurde das Protein über den His6-Tag mit Hilfe von magnetischen Beads (Dynabeads His-Tag Isolation & Pulldown, Novex, Life

Technologies) immobilisiert. Hierfür wurden 200 nM des rekombinanten Proteins in 500 µl PBS gelöst und eine Stunde mit 25 µl Beads bei 4 °C geschüttelt. Für das Negativpanning wurden 5 µl der SFTI8-Bibliothek (10^{10} pfu) in 500 µl PBS gelöst und eine Stunde mit 25 µl Beads bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und eine Stunde bei 4 °C mit den FAP-gebundenen Beads inkubiert. Die ungebundenen Phagen wurden abgenommen und die Beads zwei Mal mit TBST sowie ein Mal mit TBS gewaschen. Die Elution der gebundenen Phagenpartikel erfolgte durch Zugabe von 1 ml Glycin-HCl pH 2,2 für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Die dadurch gewonnene Phagenlösung wurde unter Zugabe von 100 µl Tris-HCl pH 9,1 neutralisiert und bei 4 °C gelagert.

Das Biopanning mit der Min10.FAP-GP-Bibliothek wurde mit humanem rekombinanten Protein an Maxisorp-Platten durchgeführt. Hierfür wurden je Well 100 nM des Proteins in 100 µl PBS gelöst und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Proteinlösung wurde abgenommen und die Wells zwei Mal mit je 200 µl PBS gewaschen. Anschließend wurden die freien Bindungsstellen der Maxisorp-Platten durch Zugabe von je 100 µl Blockierlösung gesättigt. Hierfür wurden drei verschiedene Ansätze gewählt: jeweils vier Wells wurden mit 2 % Milchprotein in PBST, 1 µM und 10 µM Blockierpeptid zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Bei dem Blockierpeptid handelt es sich um ein eigens synthetisiertes lineares Peptid aus 26 Aminosäuren (QSGYATGFAKGWAQSGYATGFAKGWD), welches aliphatische, aromatische, polare und hydrophobe Funktionalitäten beinhaltet und die Anreicherung unspezifischer Binder minimieren soll.

Nach Abnahme der überschüssigen Blockierlösung wurden die Wells zwei Mal mit je 200 µl PBS gewaschen. Für das Negativpanning wurden 3 µl der Phagenbibliothek (10^9 pfu) in 100 µl PBS gelöst und eine Stunde bei Raumtemperatur in den vorgeblockten, Protein-freien Wells geschüttelt. Anschließend wurde die Phagenlösung in die vorgeblockten, Protein-haltigen Wells überführt und eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Phagenlösung wurde verworfen und die Wells drei Mal mit je 200 µl PBST sowie zwei Mal mit je 200 µl PBS gewaschen. Die Elution der gebundenen Phagen erfolgte durch Zugabe von 200 µl Triton-X 1 %.

Amplifikation und Reinigung der angereicherten Phagen mittels PEG-Präzipitation

Für die Amplifikation der isolierten Phagen wurden 3 ml LB-Medium mit dem E.coli-Stamm XL1-blue angeimpft und ca. drei Stunden bei 37 °C und 2500 rpm geschüttelt. Nach Zugabe von je 950 µl der Phagenlösung aus dem zellbasierten Panning bzw. 700 µl der Phagenlösung aus dem Protein-basierten Panning wurde die Kultur für eine weitere Stunde bei 37 °C und 2500 rpm inkubiert und anschließend in eine Lösung aus 20 ml LB-Medium mit 2 % Glucose und 100 µg/ml Ampicillin gegeben. Nach Inkubation für eine Stunde bei 37 °C und 2500 rpm wurden 25 µl des Helferphagen M13K07 (entspricht ca. 10⁸ pfu) hinzugefügt und eine weitere Stunde bei 37 °C mit 2500 rpm geschüttelt. Anschließend wurden 70 µg/ml Kanamycin zugegeben und die Kultur über Nacht bei 37 °C und 2500 rpm inkubiert. Die Isolierung der amplifizierten Phagenpartikel erfolgte nach Zentrifugation der Kultur mittels PEG-Präzipitation wie in Abschnitt 3.3 beschrieben.

Zur Bestimmung des Phagentiters wurden 3 µl der Bibliothek in einem Gesamtvolumen von 300 µl PBS aufgenommen. Davon ausgehend wurde eine Verdünnungsreihe von 0 bis 10⁻¹¹ angelegt, die jeweiligen Verdünnungen mit jeweils 250 µl Bakterienkultur versetzt und auf Agar-LB-Amp-Platten ausgestrichen. Nach Inkubation der Platten über Nacht bei 37 °C wurde der Phagentiter durch Auszählung der Kolonien bestimmt.

3.5 Sequenzierung und Datenauswertung

Um die Sequenzanalyse der angereicherten Peptide zu ermöglichen, wurde die DNA der amplifizierten Phagen mittels Plasmidpräparation gemäß Abschnitt 3.2.3 isoliert und gereinigt. Das gewünschte DNA-Fragment wurde durch EcoRI- und NotI-Restriktion des Plasmids isoliert und die für die Sequenzierung benötigten Primer mittels PCR angefügt (siehe Kapitel 3.2.5). Nach Sequenzierung der DNA-Fragmente durch die Firma GATC Biotech (Konstanz) wurden die Ergebnisse mit Hilfe der Programme PeptideDisplayAnalysis und PepEnrich ausgewertet. Die Programme wurden von der zentralen Einheit Bioinformatik des Deutschen Krebsforschungszentrums (HUSAR, Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources) speziell für die Auswertung von Scaffold-basierten Peptidsequenzen entwickelt. Bei PeptideDisplayAnalysis handelt es sich um eine Anwendung, die die aus der Sequenzierung erhaltenen FASTQ-Dateien paarweise zusammenlagert, die resultieren-

den DNA-Abschnitte in die entsprechenden Peptidsequenzen translatiert und nach Angabe der flankierenden Aminosäuren nach den variablen Regionen innerhalb der ursprünglich gewählten Scaffold-Strukturen sucht. Die variablen Bereiche werden nach ihrer Häufigkeit sortiert und ermöglichen so einen Rückschluss auf die Anzahl der unterschiedlichen Peptide in jeder einzelne Runde des Phagen-Displays. Mit Hilfe des Programmes PepEnrich können die identifizierten Sequenzen aus den unterschiedlichen Panning-Runden miteinander verglichen werden und erlauben so eine Beurteilung des Anreicherungsverhaltens der jeweiligen Peptide.

3.6 Festphasensynthese der Phagen-Display-Peptide

Alle Peptide wurden durch automatisierte Festphasen-Peptidsynthese an einem Peptid-Synthesizer nach der Fmoc/tBu-Strategie hergestellt. Hierbei wurden zunächst die linearen Peptide an einem Tentagel S RAM-Harz vom C- zum N-Terminus aufgebaut. Als Lösungsmittel wurde NMP verwendet; die Aktivierung der Kopplungsreaktion erfolgte durch Zugabe von 0,45 M HBTU in DMF. Nach erfolgter Kopplung wurde die Fmoc-Schutzgruppe mit Hilfe von 20 % Piperidin in NMP entfernt, das Zwischenprodukt mit NMP gewaschen und die nächste aktivierte Aminosäure angefügt. Bei Peptiden, die mehrere Disulfidbrücken ausbilden, wurden für den kleineren Ringschluss Acm-geschützte Cysteingruppen verwendet. Nach Abschluss der linearen Synthese wurde das Rohpeptid für die nachfolgende Zyklisierungsreaktion vom Harz abgespalten. Hierfür wurden ca. 100 mg des getrockneten Produktharzes mit 1,5 ml 2,5 % Wasser sowie 2,5 % TIS in TFA eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Das entschützte Peptid wurde mit Diethylether ausgefällt, gewaschen und getrocknet.

Oxidation freier Thiole bei einfach disulfidverbrückten Peptiden

Die Zyklisierung einfach disulfidverbrückter Peptide erfolgte durch Oxidation der freien Cystein-Thiole in Lösung. Hierfür wurden 25 mg des linearen Rohpeptids in 1,5 ml 50 % Acetonitril in Wasser gelöst. Zu dieser Mischung wurden ca. 100-150 µl einer Iod-Lösung (20 mg/ml Iod in Essigsäure) pipettiert bis sich eine leichte Gelbfärbung einstellte. Das überschüssige Iod wurde durch Zugabe von ca. 5 µl 20 %iger Ascorbinsäure reduziert. Die Reinigung des oxidierten Peptids erfolgte mittels präparativer HPLC mit einem Laufmittelgradienten von 15 bis 55 % Acetonitril/Wasser in 15 Minuten.

Oxidation freier und Acm-geschützter Thiole bei zweifach disulfidverbrückten Peptiden

Die Zyklisierung zweifach disulfidverbrückter Peptide erfolgte durch sequentielle Oxidation der freien sowie der Acm-geschützten Cystein-Thiole in Lösung. Hierfür wurden 25 mg des linearen Rohpeptids in 15 ml 80 % Essigsäure gelöst und zu einer Mischung aus zehn Äquivalenten unvollständig gelöstem Iod in Eisessig (ca. 25 mg) gegeben. Anschließend wurden ca. 40 ml Wasser, 0,5 % konz. HCl sowie 2 % Anisol hinzugefügt und vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständiger Umsetzung wurde das überschüssige Iod durch Zugabe von ca. 200 µl gesättigter Ascorbinsäure-Lösung reduziert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum auf ein Restvolumen von 10-20 % eingeeengt, das Produkt in Ether gefällt und im Vakuum getrocknet. Nach Aufnahme des getrockneten Peptids in 50 % Acetonitril in Wasser erfolgte die Reinigung mittels präparativer HPLC mit einem Laufmittelgradienten von 15 bis 55 % Acetonitril/Wasser in 15 Minuten. Die präparative HPLC wurde an einem Agilent 1100 HPLC-System unter Verwendung der Säule ChromolithR Performance RP-18e, 100-3 mm mit einem Fluss von 2 ml/min durchgeführt. Die Charakterisierung der synthetisierten Verbindungen erfolgte massenspektrometrisch (Thermo Scientific Exactive Massenspektrometer, Agilent 1200-System) bei 60 °C auf einer Hypersil-Säule (Waters Hypersil GOLD aQ 200 x 2.1 mm, Thermo Scientific) bei einer Flussrate von 200 µl/min in 30 Minuten.

3.7 Radiomarkierung der Peptide

Die Radiomarkierung der Peptide erfolgte durch Radioiodierung einer Tyrosin-haltigen Seitenkette oder durch Komplexbildung von Radiometallen mit Hilfe des Chelators DOTA (1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure). Die verwendeten Radionuklide wurden von folgenden Herstellern bezogen:

Indium-111 (In-111): Mallinckrodt Pharmaceuticals, Maryland Heights (USA)

Iod-125 (I-125): Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig

Iod-131 (I-131): Perkin Elmer, Waltham (USA)

Lutetium-177 (Lu-177): ITG, Garching

Yttrium-90 (Y-90): Yttriga, Eckert & Ziegler Radiopharma GmbH, Berlin

Gallium-68 (^{68}Ga) wurde als $^{68}\text{Ga}[\text{GaCl}_3]$ in 0,6 M HCl unmittelbar vor der Markierung von einem $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generator eluiert.

Für die Radioiodierung von Tyrosinseitenketten wurden 10 μl einer 1 mM wässrigen Lösung des Peptids mit 30 μl 0,05 M Phosphatpuffer (pH 7,4) versetzt und die gewünschte Menge I-125 bzw. I-131 zugegeben. Das Gemisch wurde mit 10 μl einer 10 mM Chloramin-T-Lösung versetzt und die Oxidationsreaktion nach 30 Sekunden durch Zugabe von 20 μl einer gesättigten Methioninlösung beendet. Die Aufreinigung erfolgte mittels präparativer HPLC auf einer RP-18-Säule (Chromolith Performance RP-18 endcapped 100-3, Merck) mit gleichzeitiger UV- und Gamma-Detektion bei einem Laufmittelgradienten von 10-65 % Acetonitril/Wasser in zehn Minuten. Für die Testung der radiomarkierten Peptide im Zellbindungsassay wurde die Lösung ohne weitere Verarbeitung eingesetzt. Für den Einsatz in Tierversuchen wurde das Lösungsmittel unter Vakuum abrotiert und das Produkt in 0,9 % Kochsalzlösung (B. Braun, Melsungen) aufgenommen.

Für die Komplexierung von Indium-111 (^{111}In) und Lutetium-177 (^{177}Lu) mit DOTA-(MC-FA-012)₃ wurden 2,5 nmol des Peptids mit 1 μl einer 20 %igen Ascorbinsäurelösung gemischt und in 100 μl 0,1 M Natriumacetatpuffer pH 5,0 aufgenommen. Nach Zugabe der gewünschten Aktivitätsmenge wurde die Mischung zehn Minuten bei 95 °C inkubiert. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels analytischer HPLC auf einer RP-18-Säule mit einem Laufmittelgradienten von 0 bis 100 % Acetonitril in fünf Minuten. Da die Komplexierung vollständig verlief und nach Reaktionsende keine freie Aktivität vorlag, war eine Aufreinigung der Peptidlösung nicht notwendig.

Für die Komplexierung von Gallium-68 (^{68}Ga) wurden 2,5 nmol des Peptids mit 5 μl einer 20 %igen Ascorbinsäurelösung gemischt und in 120 μl 2,5 M Natriumacetatpuffer aufgenommen. Die Peptidlösung wurde mit 440 μl des Gallium-Eluats bis zu einem pH-Wert von 3,3 versetzt und zehn Minuten bei 95 °C inkubiert. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels analytischer HPLC auf einer RP-18-Säule mit einem Laufmittelgradienten von 0 bis 100 % Acetonitril in fünf Minuten. Die Abtrennung der freien Radioaktivität erfolgte mittels Festphasenextraktion über eine SPE-Kartusche (Agilent Varian Bond Elut Plexa). Hierfür wurde das Reaktionsgemisch in 1 ml PBS aufgenommen und auf die mit Ethanol konditionierte Kartusche gegeben. Nach Waschen der Kartusche mit 2 ml PBS wurde das Produkt mit 1 ml 50 % Ethanol eluiert und das Lösungsmittel unter Vakuum abrotiert. Das gereinigte Radiopeptid wurde in 0,9 % Kochsalzlösung aufgenommen.

3.8 Synthese der FAP-Inhibitoren

Ausgehend von der Grundstruktur eines bekannten FAP-Inhibitors^[88] wurden die Verbindungen FAPI-01 bis -15 zur Verwendung als Radiotracer sowie das fluoreszente FAPI-Derivat FAPI-02-Atto488 von Thomas Lindner hergestellt^[34,89]. Für die Synthese von nicht-radioaktivem FAPI-01 (**1**) wurde ausgehend von 5-Bromchinolin-4-carbonsäure (**3**) ein Lithium-Halogen-Austausch mit n-Butyllithium durchgeführt. Nach der Umsetzung des Intermediats mit elementarem Iod erfolgte eine Kopplung des Gly-Pro-CN-Fragments durch HBTU/HOBt-Aktivierung. Eine Übersicht der Reaktion ist in Abbildung 3.1 gezeigt. Die Herstellung von radioaktivem FAPI-01 (**1***) erfolgte durch Palladium-katalysierte Stannylierung des bromierten Chinolins **5** und anschließender Iodoxidation des zinnorganischen Intermediats **6** mit radioaktivem Iod (Abbildung 3.2).

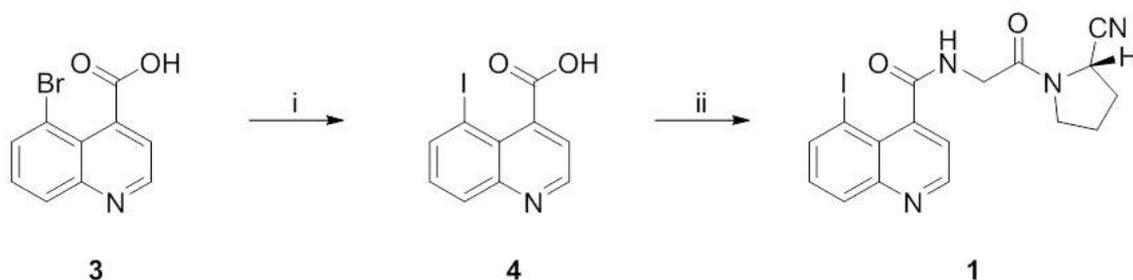


Abbildung 3.1. Synthese von nicht-radioaktivem FAPI-01. i) nBuLi, danach I₂, THF; ii) HBTU/HOBt, DIPEA, H-Gly-Pro-CN, DMF.

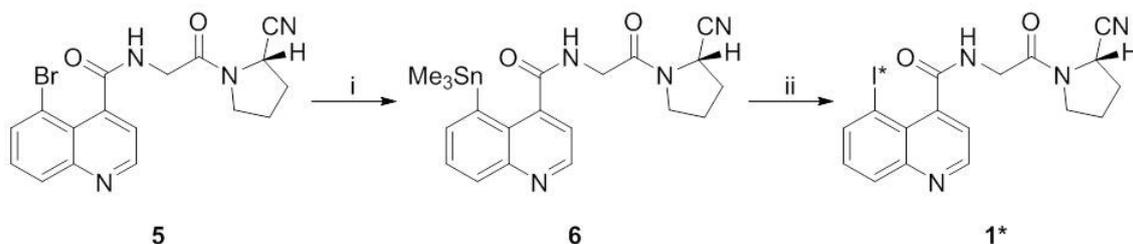


Abbildung 3.2. Synthese von radioaktivem FAPI-01. i) (Me₃Sn)₂; (PPh₃)₂PdCl₂; Dioxan 80 °C; ii) I-125 oder I-131; AcOOH; 1 M HCl; MeOH.

Um die Verwendung von Radiometallen zu ermöglichen, wurden die Verbindungen FAPI-02 bis -15 mit dem Chelator DOTA (1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure) versehen. Hierfür wurde das hydroxylierte Chinolin **8** mit einem bifunktionellen Linker verknüpft und in drei weiteren Schritten zum Endprodukt **2** umgesetzt. Ein Reaktionsschema für die Synthese der DOTA-Derivate ist in Abbildung 3.3 exemplarisch für FAPI-02 gezeigt.

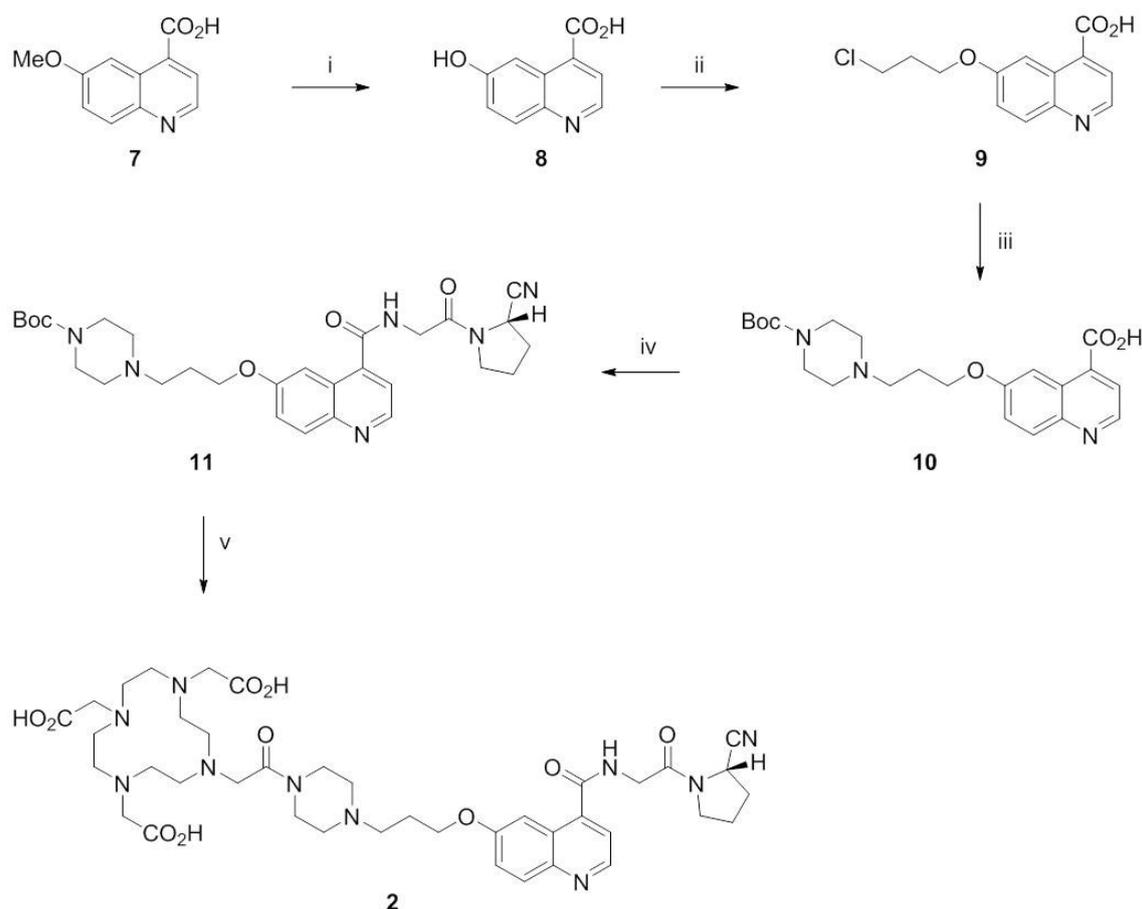


Abbildung 3.3. Synthese von FAPI-02. aq. HBr 48 %, 130 °C; ii) 1-Brom-3-Chlorpropan, Cs₂CO₃, DMF danach 6 M NaOH; iii) 1-Boc-Piperazin, KI, DMF; iv) HBTU/HOBt, DIPEA, H-Gly-Pro-CN, DMF; v) TosOH, MeCN, danach DOTA-PNP, DIPEA, DMF.

3.9 Radiomarkierung der FAP-Inhibitoren

Die Radiomarkierung von FAPI-01 erfolgte durch oxidative Umsetzung einer zinnorganischen Vorstufe mit Iod-125. Hierfür wurden 10 µl der Vorstufe (1 mM in EtOH) mit 10 µl 1 M HCl und 10 µl Wasser verdünnt und mit 1-20 MBq Iod-125 in 0,05 M NaOH versetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 µl einer frisch angesetzten Peressigsäure-Lösung (1,9% in Eisessig) gestartet. Nach Inkubation für 60 Sekunden wurden 15 µl einer 1 M NaOH-Lösung zugegeben und für weitere 30 Sekunden geschüttelt, bevor die Reaktion durch Zugabe von 5 µl einer 5 %igen Ascorbinsäure-Lösung beendet wurde. Die Aufreinigung des markierten Inhibitors erfolgte mittels präparativer HPLC auf einer RP-18-Säule mit gleichzeitiger UV- und Gamma-Detektion bei einem Laufmittelgradienten von 0-30 % Acetonitril/Wasser in zehn Minuten.

Die Radiomarkierung der FAPI-Derivate -02 bis -15 erfolgte durch die Komplexierung der Radiometalle Lutetium-177 und Gallium-68 mit Hilfe des Chelators DOTA. Für die Komplexierung von Lutetium-177 wurden jeweils 5 MBq Lutetiumchlorid mit 100 μ l einer Lösung des entsprechenden Inhibitors (10 μ M in 0,1 M Natriumacetatpuffer pH 5) gemischt. Nach Zugabe von 1 μ l einer 20 %igen Ascorbinsäure-Lösung wurde der Ansatz zehn Minuten bei 95 °C inkubiert. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels analytischer HPLC auf einer RP-18-Säule mit einem Laufmittelgradienten von 0 bis 100 % Acetonitril in fünf Minuten. Für eine Testung der Inhibitoren im zellbasierten Assay wurde die Markierlösung unverdünnt eingesetzt, für eine Charakterisierung im Tierversuch mit 0,9 % Kochsalzlösung auf das benötigte Endvolumen verdünnt.

Die Radiomarkierung mit Gallium-68 erfolgte durch Inkubation von 255 μ l Gallium-Eluat (0,6 M HCl, ca. 230 MBq) mit einer Mischung aus 1 nmol des Inhibitors in 72 μ l 2,5 M Natriumacetatpuffer und 1 μ l 20 %iger Ascorbinsäure-Lösung bei 95 °C für zehn Minuten. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels analytischer HPLC auf einer RP-18-Säule mit einem Laufmittelgradienten von 0 bis 100 % Acetonitril in fünf Minuten. Die Abtrennung der freien Radioaktivität erfolgte mittels Festphasenextraktion über eine SPE-Kartusche (Sep-Pak light C-18, Waters). Hierfür wurde das Reaktionsgemisch in 2 ml Wasser aufgenommen und auf die mit Ethanol konditionierte Kartusche gegeben. Nach Waschen der Kartusche mit 2 ml Wasser wurde das Produkt mit 1 ml 50 % Ethanol eluiert und das Lösungsmittel unter Vakuum abrotiert.

3.10 Bestimmung der Serumstabilität

Zur Bestimmung der Serumstabilität wurden die FAP-Inhibitoren mit Iod-125 bzw. Lutetium-177 radiomarkiert, das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand in 300 μ l humanem Serum (Sigma-Aldrich) aufgenommen. Nach Inkubation für zehn Minuten bis 24 Stunden bei 37 °C wurden jeweils 20 μ l entnommen, zur Ausfällung der Serumproteine mit je 40 μ l Acetonitril versetzt und anschließend zehn Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels analytischer HPLC auf einer RP-18-Säule mit einem Laufmittelgradienten von 0 bis 100 % Acetonitril in zehn Minuten analysiert.

3.11 Fluoreszenzfärbung und Mikroskopie

Für die Charakterisierung der Internalisierung des Inhibitors wurden Bindungsstudien mit fluoreszenzmarkiertem FAPI-02 (FAPI-02-Atto488) auf HT-1080-FAP-, HEK-muFAP und HEK-CD26-Zellen durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen in 24-Well-Platten auf unbeschichteten Deckgläsern ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80-90 % wachsen gelassen. Das Kulturmedium wurde entfernt und die Zellen zwei Mal mit 0,5 ml PBS gewaschen. FAPI-02-Atto488 (20 μ M in DMEM) wurde zugegeben und für zwei Stunden bei 37 °C auf den Zellen inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit Paraformaldehyd (2 % in PBS) fixiert. Die bewachsenen Deckgläser wurden mit je einem Tropfen DAPI-haltigem Eindeckmedium (Fluoroshield, Sigma-Aldrich) versetzt und auf Objektträger aufgebracht. Die mikroskopische Betrachtung der Proben erfolgte mit einem konfokalen Laserrastermikroskop unter Verwendung eines Immersionsobjektivs (Zeiss Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC III). Die Bildrekonstruktion erfolgte mit Hilfe der ZEN 2008-Software unter Einstellung der folgende Parameter: xy Pixel-Einstellung 0,009 x 0,009 μ m, 1 AU Pinhole für beide Fluorophore (488 nm für FAPI-02-Atto488, 405 nm für DAPI).

3.12 In vitro-Charakterisierung der FAP-Liganden im Zellbindungsassay

Zur Charakterisierung der Affinität und Spezifität wurden die radiomarkierten Substanzen in zellbasierten Assays im Hinblick auf Rezeptorbindung, Internalisierung sowie Kompetition durch unmarkiertes Peptid untersucht. Hierfür wurden die Zellen zwei Tage vor Durchführung des Experiments in 6-Well-Platten ausgesät. Bei einer Konfluenz der Zellen von 80-90 % wurde das Zellkulturmedium abgenommen und die radiomarkierte Substanz in Zellkulturmedium ohne Zusätze zugegeben. Nach Inkubation für eine Stunde bei 37 °C wurde das Medium abgenommen, die Zellen zwei Mal mit je 1 ml PBS gewaschen und mit insgesamt 1,4 ml Lysepuffer abgelöst. Das Lysat wurde in Messröhrchen überführt und die gebundene Radioaktivität im Gamma-Counter bestimmt. Für die Kompetitionstudien wurden neben der radiomarkierten Substanz steigende Konzentration der jeweiligen unmarkierten Substanz zugesetzt, für eine Stunde auf den Zellen belassen und anschließend abgenommen. Für die Bestimmung der zeitabhängigen Ausscheidung der Substanzen

aus den Zellen wurden Efflux-Experimente durchgeführt. Hierfür wurde das Medium mit der radiomarkierten Substanz eine Stunde auf den Zellen belassen, anschließend abgenommen und durch frisches, nicht-radioaktives Medium ersetzt. Nach Inkubation für 1, 2, 4, 6 und 24 Stunden bei 37 °C wurde das Medium abgenommen und in Messröhrchen überführt. Bei allen Experimenten erfolgten die Waschschriffe sowie die Zellyse wie oben beschrieben. Für die Internalisierungsstudien wurden die Zellen 10 und 30 Minuten sowie 1, 2, 4 und 24 Stunden mit der radiomarkierten Substanz inkubiert und nach dem Waschen für zehn Minuten mit je 1 ml Glycin-HCl pH 2,2 behandelt. Die dadurch abgelöste extrazellulär gebundene Substanzfraktion wurde abgenommen und in Messröhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen erneut je zwei Mal mit 1 ml PBS gewaschen und wie oben beschrieben lysiert. Sofern nicht anders angegeben wurden alle Experimente bei 37 °C durchgeführt. Für die Internalisierungsstudien wurden alle Bindungswerte parallel bei 4 °C ermittelt. Die Bestimmung der unspezifischen Bindung erfolgte durch einstündige Inkubation der radiomarkierten Verbindungen in zellfreien 6-Well-Platten, die zuvor über 48 Stunden mit FBS-haltigem Zellkulturmedium inkubiert worden sind.

3.13 In vivo-Charakterisierung der FAP-Liganden in tumortragenden Mäusen

Zur *in vivo*-Charakterisierung der FAPI-Liganden wurden die pharmakokinetischen Eigenschaften der Substanzen in Bildgebungs- und Organverteilungsstudien untersucht. Hierfür wurden weibliche, acht bis zehn Wochen alte immundefiziente Nacktmäuse (Balb/c nude/nude, Charles River) verwendet. Diese wurden in Gruppen zu maximal fünf Tieren unter sterilen Bedingungen in IVC-Käfigsystemen unter standardisierten Bedingungen (22±2 °C Raumtemperatur, 50±10 % relative Luftfeuchtigkeit, 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus) gehalten. Alle Tierexperimente entsprachen den deutschen tierschutzrechtlichen Bestimmungen sowie der europäischen Richtlinie zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere. Die Tierversuche wurden unter der Registriernummer 35-9185.81/G-158/15 beim Regierungspräsidium Karlsruhe geführt. Die Anästhesie der Mäuse erfolgte durch Inhalation von 2 % Isofluran mit Hilfe eines Narkosegas-Verdampfers. Pro Maus wurden jeweils drei bis fünf Millionen Zellen der entsprechenden tumorigenen Zelllinie in je 100 µl OptiMEM suspendiert und subkutan in die rechte Flanke des Tieres injiziert. Für die Testung der FAPI-Derivate wurden FAP-positive HT-1080-FAP- und U87MG-Zellen sowie

die FAP-negativen Zellen Capan-2, MCF-7 und SK-LMS-1 verwendet. Die Charakterisierung von DOTA-(MC-FA-012)₃ erfolgte an den FAP-positiven Tumormodellen CT26-FAP und U87MG. Bei einigen Tieren wurden als Kontrolle zusätzlich jeweils fünf Millionen Zellen der FAP-negativen Kontrollzelllinie CT26 wt in die linke Flanke inokuliert. Sobald die Tumore eine Größe von ca. 1 cm³ erreicht hatten, wurden die Mäuse anästhesiert und die radiomarkierte Substanz intravenös über die Schwanzvene verabreicht.

Für die Experimente zur Nephroprotektion wurden neben radiomarkiertem DOTA-(MC-FA-012)₃ zusätzlich Substanzen verabreicht, die die renale Anreicherung des Tracers reduzieren sollen. Hierzu zählt der bereits in der PRRT eingesetzte Nephroprotektor Gelafundin, ein modifiziertes Gelatinderivat, sowie eine Mischung der Aminosäuren Arginin und Lysin in hoher Konzentration. Darüber hinaus wurden zwei strukturell mit MC-FA-012 verwandte Miniproteine verwendet, die bekannt dafür sind unspezifisch in den Nieren zu akkumulieren. Die genauen Applikationsbedingungen sind in Tabelle 3.11 aufgeführt.

Substanz	Menge	Injektionszeitpunkt und -art
MC-Myc-010	135 nmol	15 min vor Tracer-Gabe i.p.
DOTA-(MC-FA-0116) ₃	8 nmol	15 min vor Tracer-Gabe i.p.
Arginin/Lysin	jeweils 3 mg	10 min vor Tracer-Gabe i.p.
Gelafundin	4 mg	10 min vor Tracer-Gabe i.p.
DOTA-(MC-FA-0116) ₃	50, 100, 400 µg	zeitgleich mit Tracer-Gabe i.v.

Tabelle 3.11. Ansätze zur Reduktion der Nierenakkumulation von DOTA-(MC-FA-012)₃

3.13.1 Positronen-Emissions-Tomographie

Das PET-Imaging wurde mit Hilfe eines Kleintier-PET-Scanners durchgeführt. Nach einem 15-minütigen Transmissionsscan wurde den Mäusen 2,5 nmol ⁶⁸Ga-DOTA-(MC-FA-012)₃ bzw. 4 nmol des entsprechenden FAPI-Derivates injiziert (jeweils 10 MBq). Während der ersten 60 Minuten wurde eine dynamische Aufnahme durchgeführt, gefolgt von einem statischen Scan 120 bis 140 Minuten nach Injektion des Tracers. Die Aufnahmen wurden iterativ nach der 3D-OSEM+MAP-Methode rekonstruiert und in SUV-Bilder konvertiert.

SUV steht für *Standardized Uptake Value* und ermöglicht eine Quantifizierung der PET-Aufnahmen. Der Wert beschreibt das Verhältnis der regionalen Radioaktivitätsmenge in der gewählten Region (*Region Of Interest, ROI*) zur injizierten Aktivität und berechnet sich wie folgt^[90,91]:

$$\text{SUV (g/ml)} = \frac{\text{durchschnittliche Aktivität in ROI (Bq/ml)} \cdot \text{Tiergewicht (g)}}{\text{applizierte Aktivität (Bq)}}$$

3.13.2 Organverteilungsstudien

Zur Untersuchung der Bioverteilung der Liganden wurde die Anreicherung der radiomarkierten Tracer im Blut sowie in ausgewählten Organen 30 Minuten bis 24 Stunden nach Injektion *ex vivo* bestimmt. Dabei wurden pro Messzeitpunkt jeweils drei Mäuse verwendet. Nach intravenöser Injektion von je 1 MBq ¹⁷⁷Lu-DOTA-(MC-FA-012)₃ bzw. FAPI-Ligand wurden die Mäuse anästhesiert und durch Genickdislokation getötet. Die Organe sowie ca. 500 µl Blut wurden entnommen, das Gewicht bestimmt und die Radioaktivität im Gamma-Counter (Cobra Autogamma, Packard) vermessen. Für eine vergleichende Betrachtung der Werte wurden die gemessene Radioaktivität auf das Organgewicht normalisiert und im Verhältnis zur verabreichten Gesamtaktivität ausgedrückt (*percentage of injected dose/g; %ID/g*).

3.14 Klinische Evaluierung der FAP-Liganden

3.14.1 Radiomarkierung von DOTA-(MC-FA-012)₃

Für die PET/CT-Bildgebung mit DOTA-(MC-FA-012)₃ wurden 2,5 nmol der Substanz in 280 µl 2,5 M Natriumacetatpuffer pH 8 aufgenommen und mit 10 µl einer 20 %igen Ascorbinsäurelösung gemischt. Die Lösung wurde mit 1 ml ⁶⁸Ga-Eluat bis zu einem pH-Wert von 3,5 verdünnt und 15 Minuten bei 95 °C inkubiert. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels analytischer HPLC auf einer RP-18-Säule mit einem Laufmittelgradienten von 0 bis 100 % Acetonitril in fünf Minuten. Die Aufreinigung des radiomarkierten Peptids erfolgte mittels Festphasenextraktion über eine SPE-Kartusche (Agilent Varian Bond Elut Plexa). Hierfür wurde das Reaktionsgemisch in 2 ml 0,9 % Kochsalzlösung aufgenommen und auf die mit Ethanol konditionierte Kartusche gegeben. Nach Waschen der Kartusche mit 2 ml 0,9 % Kochsalzlösung wurde das Produkt mit 0,5 ml 50 % Ethanol eluiert. Die Kartusche wur-

de mit 200 µl Phosphatpuffer (Natriumphosphat Braun, Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung) und 5 ml 0,9 % Kochsalzlösung nachgespült. Die Fraktionen wurden vereinigt und steril filtriert (Millex-GV 0,22 µm, Millipore). Der pH-Wert der Lösung wurde mit Hilfe eines Indikatorpapiers (MColorpHast 2,5-4,5, Merck) überprüft und bei Bedarf auf pH 6-7 eingestellt. Die Qualitätskontrolle des Produktes erfolgte mittels präparativer Radio-HPLC auf einer RP-18-Säule mit einem Laufmittelgradienten von 0-100 % Acetonitril in fünf Minuten. Zur Prüfung auf Endotoxinfreiheit wurde der Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test (LAL-Test; Endosafe PTS, Charles River) durchgeführt.

Für die therapeutische Anwendung von DOTA-(MC-FA-012)₃ wurden 15 nmol der Substanz in 100 µl 0,4 M Natriumacetatpuffer pH 5 aufgenommen und mit 10 µl einer 20 %igen Ascorbinsäurelösung gemischt. Die Lösung wurde mit 2,5 GBq einer ¹⁷⁷LuCl₃-Lösung gemischt, 15 Minuten bei 95 °C inkubiert und mit 0,9 %iger Kochsalzlösung auf ein Gesamtvolumen von 5 ml verdünnt. Die Kontrolle der radiochemischen Reinheit erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie (ITLC-SG) mit einer 0,5 M Natriumcitratlösung pH 5 mit und ohne 10 % Methanol sowie mittels analytischer HPLC auf einer RP-18-Säule mit einem Laufmittelgradienten von 0 bis 100 % Acetonitril in fünf Minuten.

3.14.2 Radiomarkierung von FAPI-02 und FAPI-04

Für die PET/CT-Bildgebung mit FAPI-02 bzw. FAPI-04 wurden je 20 nmol der Substanzen in 280 µl 2,5 M Natriumacetatpuffer pH 8 aufgenommen und mit 10 µl einer 20 %igen Ascorbinsäurelösung gemischt. Die Lösung wurde mit 1 ml ⁶⁸Ga-Eluat bis zu einem pH-Wert von 3,5 verdünnt und 20 Minuten bei 90 °C inkubiert. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels analytischer HPLC auf einer RP-18-Säule mit einem Laufmittelgradienten von 0 bis 15 % Acetonitril in fünf Minuten. Die Aufreinigung der radiomarkierten Liganden erfolgte mittels Festphasenextraktion über eine SPE-Kartusche (Sep-pak light C18, Waters). Hierfür wurde das Reaktionsgemisch in 2 ml 0,9 % Kochsalzlösung aufgenommen und auf die mit Ethanol konditionierte Kartusche gegeben. Nach Waschen der Kartusche mit 2 ml 0,9 % Kochsalzlösung wurde das Produkt mit 1 ml 70% Ethanol eluiert. Die Kartusche wurde mit 200 µl Phosphatpuffer (Natriumphosphat Braun, Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung) und 5 ml 0,9 % Kochsalzlösung nachgespült. Die Fraktionen wurden vereinigt und steril filtriert. Der pH-Wert der Lösung wurde mit Hilfe eines Indikatorpapiers (MColorpHast 2,5-4,5, Merck) überprüft und bei Bedarf auf pH 6-8 eingestellt.

Die Qualitätskontrolle des Produktes erfolgte mittels präparativer Radio-HPLC auf einer RP-18-Säule mit einem Laufmittelgradienten von 0-15 % Acetonitril in fünf Minuten. Zur Prüfung auf Endotoxinfreiheit wurde der LAL-Test durchgeführt.

Für einen ersten Therapieversuch mit FAPI-04 wurden 50 µl einer 1 mM Lösung der Substanz in 400 µl 0,4 M Natriumacetatpuffer pH 5 aufgenommen und mit 10 µl einer 20 %igen Ascorbinsäurelösung versetzt. Die Lösung wurde mit 2,9 GBq einer $^{90}\text{YCl}_3$ -Lösung gemischt, 20 Minuten bei 95 °C inkubiert und mit 0,9 %iger Kochsalzlösung auf ein Gesamtvolumen von 2 ml verdünnt. Die Kontrolle der radiochemischen Reinheit erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie (ITLC-SG) mit einer 0,5 M Natriumcitratlösung pH 5 sowie mittels analytischer HPLC auf einer RP-18-Säule mit einem Laufmittelgradienten von 0 bis 100 % Acetonitril in fünf Minuten.

3.14.3 Diagnostische Bildgebung mittels PET/CT

Nach Zustimmung der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Heidelberg (Nr. S-016/2018) wurden die diagnostischen Untersuchungen an erwachsenen Patienten mit metastasierten epithelialen oder neuroendokrinen Tumoren gemäß §37 der Deklaration von Helsinki ("Nicht nachgewiesene Maßnahmen in der klinischen Praxis") und in Übereinstimmung mit §13 (2b) des deutschen Arzneimittelgesetzes durchgeführt. Alle Patienten hatten vor Einschluss in die Untersuchung eine geeignete antitumorale Therapie erhalten, die die weitere Tumorprogression oder -metastasierung jedoch nicht verhindern konnte.

Die PET/CT-Untersuchungen wurden in der Abteilung Nuklearmedizin der Radiologischen Klinik des Universitätsklinikums Heidelberg mit dem PET/CT-Scanner Biograph-mCT Flow (Siemens, Erlangen) mit den folgenden Parametern durchgeführt: Schichtdicke 5 mm, Inkrement 2-4 mm, Rekonstruktionskernel für weiche Gewebe (*soft-tissue reconstruction kernel*), Care Dose. Jeweils eine Stunde nach intravenöser Gabe der mit Gallium markierten Tracer wurden statische Ganzkörperaufnahmen mit CT-basierter Schwächungskorrektur akquiriert; in einigen Fällen erfolgte die Bildgebung zehn Minuten, eine und drei Stunden nach Injektion. Unmittelbar nach dem CT-Scan wurden mittels PET 3D-Ganzkörperaufnahmen angefertigt (Matrix 200x200, in FlowMotion™ mit 0,7 cm/min). Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von Gallium-68 sowie der variablen Elutionseffizienz des Gallium-Generators, variierten die den Patienten verabreichten Aktivitäten zwischen

222 und 312 MBq. Die Emissionsdaten wurden auf zufällige Koinzidenzen, Streuung und Zerfallszeit korrigiert. Die Rekonstruktion der erhaltenen PET-Datensätze erfolgte mit Hilfe des *Ordered Subset Expectation Maximization* (OSEM)-Algorithmus mit zwei Iterationen je 21 Subsets und Gauss-Filterung auf eine transaxiale Auflösung von 5 mm bei Halbwertsbreite (*Full Width Half Maximum*, FWHM). Die Verzögerungskorrektur wurde mit Hilfe der Low-Dose non-enhanced CT-Daten durchgeführt. Für eine quantitative Beurteilung der Traceraufnahmen wurden die Datensätze in *Standardized Uptake Value* (SUV)-Bilder konvertiert.

3.14.4 Therapeutische Anwendung der FAP-Liganden

Eine therapeutische Anwendung von DOTA-(MC-FA-012)₃ erfolgte nach Markierung mit Lutetium-177 in einem Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom. Dabei wurde die Bremsstrahlung zwei, 24 und 46 Stunden nach intravenöser Injektion des Tracers mit Hilfe einer Gamma-Kamera (GE Hawkeye SPECT/CT System) aufgenommen.

Zur therapeutischen Anwendung von FAPI-04 wurde der mit Yttrium-90 radiomarkierte Tracer einer Patientin mit metastasiertem Mammakarzinom verabreicht. Die intravenöse Applikation erfolgte über ein steriles Filtersystem (Filtropur S 0.2, Sarstedt, Nümbrecht). Die intratherapeutische Kontrolle der Tracerverteilung erfolgte drei und 24 Stunden nach Injektion durch szintigraphische Detektion der Gamma-Strahlung (GE Hawkeye SPECT/CT System).

3.15 Datenauswertung und statistische Analyse

Die graphische Darstellung und die statistische Auswertung der Daten aus den Zellbindungsassays sowie den Organverteilungsstudien erfolgten mit Hilfe von GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, USA) sowie Corel DRAW Graphics Suite 2018 (Corel GmbH, München). Sofern nicht anders angegeben, sind alle deskriptiven statistischen Werte als Mittelwert \pm Standardabweichung aufgeführt. Die Berechnung der IC₅₀-Werte erfolgte nach sigmoidaler Kurvenanpassung aus den Messreihen der Konkurrenzexperimente. Die biologischen Halbwertszeiten wurden nach exponentieller Kurvenanpassung aus den Daten der Efflux-Experimente ermittelt. Für die Beurteilung der statistischen Signifikanz wurde der Mittelwert zweier zu vergleichender Gruppen mithilfe des t-Tests berechnet. Je nach Signifikanzniveau sind die Überschreitungswahrscheinlichkeiten mit

maximal drei Asterisken gekennzeichnet (*: $0,01 \leq p \leq 0,05$; **: $0,001 \leq p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$). Die Nachbearbeitung der mikroskopischen Aufnahmen erfolgte mit Hilfe der Graphik-Software ImageJ. Die in der Einleitung gezeigten Abbildungen wurden mit Corel DRAW Graphics Suite 2018 (Corel GmbH, München) erstellt. Für die Darstellung der Strukturformeln wurde ChemBioDraw Ultra 14.0 (Perkin Elmer) verwendet; die 3D-Strukturen der Peptid-Scaffolds wurden ausgehend von den entsprechenden Einträgen in der RCSB-Proteindatenbank mit Hilfe von Pymol erzeugt.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Identifizierung FAP-affiner Binder mittels

Phagen-Display

Zur Identifizierung neuer FAP-Liganden mit Hilfe der Phagen-Display-Technologie wurden zwei unterschiedliche Peptidbibliotheken eingesetzt. Die SFTI8-Bibliothek basiert auf dem zyklischen Grundgerüst des *Sunflower Trypsin Inhibitors-1* (SFTI-1), welches durch eine Disulfidbrücke stabilisiert wird, und enthält einen variablen Bereich aus acht randomisierten Aminosäuren. Die Min10.GP-FAP-Bibliothek beruht auf einer verkürzten Form eines cyclotidischen Trypsininhibitors und ist durch zwei Disulfidbrücken stabilisiert, was in einer geringeren konformativen Flexibilität des Grundgerüsts resultiert. In der ursprünglichen Bibliothek Min10 ist eine Teilsequenz des Originalpeptids Min-23 durch eine Schleife aus zehn variablen Aminosäuren ersetzt. In der Min10.GP-FAP-Bibliothek wurde dies im Hinblick auf die Identifizierung FAP-spezifischer Liganden geringfügig modifiziert. Da der N-terminale Loop des Min-23 wahrscheinlich eine Rolle bei der Bindung an humanes FAP spielt, wurde die Originalsequenz LMR teilweise randomisiert. Dies ermöglicht die Anreicherung von Peptiden mit alternativen Bindungsmotiven, die unter Umständen eine höhere FAP-Affinität aufweisen. Aus früheren Studien ist bekannt, dass die Aminosäuren G und P in den bislang bekannten FAP-Substraten für die Bindung an das Membranprotein maßgeblich sind^[92]. Aus diesem Grund wurde innerhalb der variablen Schleife an den Positionen 7 und 8 das GP-Motiv fest in der Bindeschleife des Peptids verankert.

4.1.1 Biopanning gegen rekombinantes FAP mit der SFTI8-Bibliothek

Das Biopanning mit der SFTI8-Phagenbibliothek wurde gegen rekombinantes humanes FAP durchgeführt, welches über einen His6-Tag an magnetischen Beads immobilisiert worden war. Nach vier Panning-Runden erfolgte die Identifizierung der gebundenen Peptide mit Hilfe der Illumina Next Generation Sequenzierung. Die am häufigsten angereicherten

Peptidsequenzen sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst. Die identifizierten Peptide wurden mittels Festphasensynthese hergestellt, mit Iod-125 radiomarkiert und zur Charakterisierung hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften an FAP-positiven und FAP-negativen CHO-Zellen getestet. Die Ergebnisse der Zellbindungsversuche sind in Abbildung 4.1 zusammengefasst.

Bezeichnung	Sequenz
Ph.SF8-FAP1	GRCT H PT H KMPWCYPD
Ph.SF8-FAP2	GRCT G I H GWAFLCYPD
Ph.SF8-FAP3	GRCT E W W FGSSRCYPD
Ph.SF8-FAP4	GRCT K W K TLGWHCYPD
Ph.SF8-FAP5	GRCT L W K VIHNHCYPD
Ph.SF8-FAP6	GRCT H K S YFWTHCYPD

Tabelle 4.1. Übersicht der im Biopanning am häufigsten angereicherten SFT18-Peptide. Die variablen Aminosäure sind in Fettschrift hervorgehoben.

Mit Ausnahme von Ph.SF8-FAP1 und Ph.SF8-FAP3 zeigen alle Peptide eine Bindung an FAP-positive Zellen von mehr als 5 % nach zehn Minuten. Allerdings ist die unspezifische Bindung bei allen Peptiden vergleichsweise hoch und auch die Affinität zu den FAP-negativen CHO-mock-Zellen deutlich höher als erwartet (Abb. 4.1). Um die Ursache für die mangelnde Spezifität der Substanzen zum Zielprotein herauszufinden, wurden die Bindungsexperimente mit zwei der sechs Verbindungen an rekombinantem FAP wiederholt. Hierfür wurde das Zielprotein an magnetische Beads gebunden, wobei alle Inkubationsparameter, wie Inkubationszeit und -temperatur sowie Proteinkonzentration, analog den Panning-Bedingungen gewählt wurden. Zur internen Validierung des Assays wurde das Cyclotid MC-FA-012 mit bekannten Bindungseigenschaften verwendet. Dieses erreicht in Bindungsstudien an humanem FAP eine Bindung von 8 bis 10 %ID bei gleichzeitig sehr geringer unspezifischer Bindung. Die Ergebnisse der Testung sind in Abbildung 4.2 dargestellt.

Beide Peptide zeigen eine starke Bindung an FAP-positive Beads mit Bindungswerten von $85 \pm 7,98 \%$ bzw. $95 \pm 11,03 \%$ nach einstündiger Inkubation. Allerdings ist die Bindung der Peptide an FAP-negative Beads ähnlich hoch wie an humanes FAP ($90 \pm 12,38 \%$ bzw. $99 \pm 1,72 \%$ ID). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die im Biopanning angereicherten Peptide keine spezifischen Binder von humanem FAP sind, sondern vielmehr eine

hohe Affinität zu den verwendeten magnetischen Beads besitzen. Diese enthalten zur Immobilisierung von His6-getaggten Proteinen zweiwertiges Cobalt (Co^{2+}), welches aufgrund der positiven Ladung einen idealen Bindungspartner für elektronenreiche Aminosäuren darstellt.

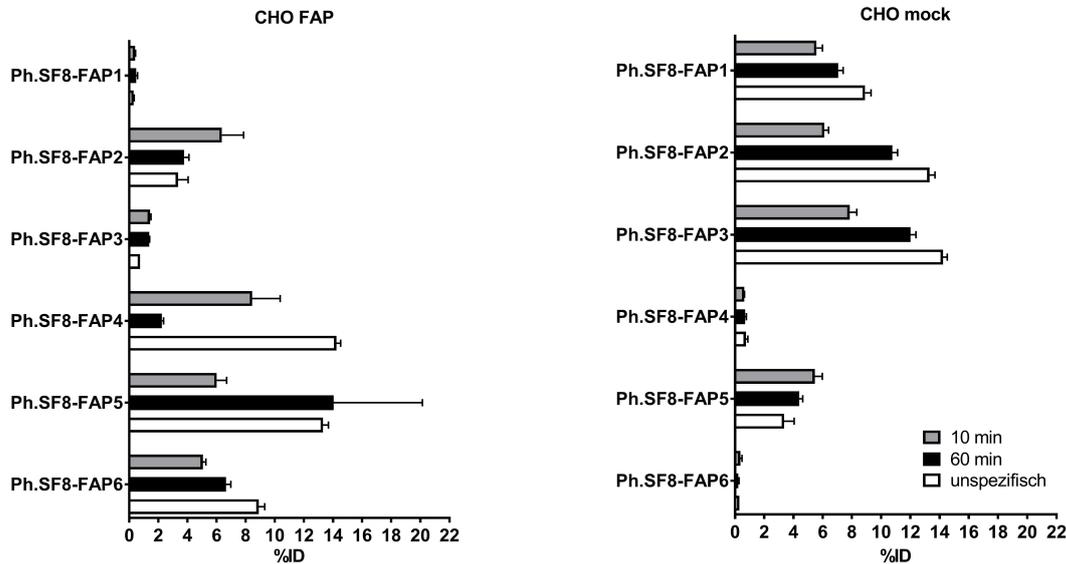


Abbildung 4.1. Zellbindung der radioiodierten SFTI8-Peptide an CHO-FAP- und CHO-mock-Zellen nach Inkubation für zehn und 60 Minuten sowie unspezifische Bindung nach Inkubation für 60 Minuten bei 37 °C; n=3.

Im Falle einer nicht vollständigen Sättigung der Beads mit dem Zielprotein während des Biopannings werden somit offensichtlich Binder gegen das kationische Cobalt generiert. Betrachtet man die Sequenzen der angereicherten Peptide, so fällt auf, dass mit Ausnahme von Ph.SF8-FAP3 alle Verbindungen mindestens ein Histidin enthalten. Dies erklärt die starke Bindung der entsprechenden Peptide an die Co^{2+} -Beads, welche naturgemäß eine hohe Selektivität für Histidiningruppen besitzen. Um eine Anreicherung FAP-spezifischer Liganden nach Immobilisierung des Proteins an Co^{2+} -Beads zu ermöglichen, muss folglich sichergestellt werden, dass die Beads über die gesamte Inkubationsdauer vollständig mit Protein gesättigt sind. Da es sich bei FAP um ein relativ großes, sterisch anspruchsvolles Molekül handelt, kann eine lückenlose Bindung an die Beads über den vergleichsweise kleinen His6-Tag allerdings nicht gewährleistet werden.

Aus diesem Grund wurde die Panning-Strategie mit rekombinantem Protein an magnetischen Beads nicht weiter verfolgt. Stattdessen wurden für die nachfolgenden Panning-Runden FAP-exprimierende Zellen verwendet, die zudem den Vorteil besitzen, dass das

Zielprotein hier in seiner nativen Form vorliegt. Bedingt durch Wechselwirkungen mit anderen Oberflächenproteinen ist es denkbar, dass es zu Konformationsänderungen des Zielproteins kommt, die die Bindung potentieller Liganden beeinflussen. Anders als beim Einsatz von rekombinantem Protein können diese Effekte im physiologischen Zellsystem berücksichtigt werden und ermöglichen so eine bessere Selektion geeigneter Liganden.

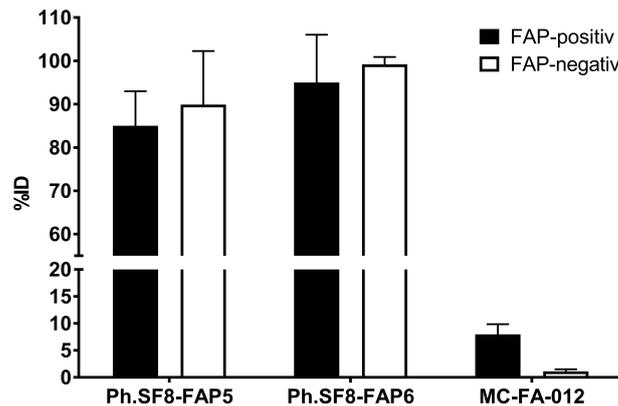


Abbildung 4.2. Bindung von Ph.SF8-FAP5 und -6 sowie MC-FA-012 an FAP-positive und FAP-negative magnetische Beads nach Inkubation für 60 Minuten bei 37 °C; n=2.

4.1.2 Biopanning gegen FAP-exprimierende Zellen mit der Min10.GP-FAP-Bibliothek

Basierend auf theoretischen Überlegungen sowie Vorarbeiten bezüglich der Struktur-Wirkungsbeziehungen zwischen bekannten FAP-Liganden und ihrem Zielprotein wurde die eingeschränkte Phagenbibliothek Min10.GP-FAP hergestellt (siehe Abschnitt 3.3). Mit dieser wurde ein Biopanning alternierend gegen FAP-negative und FAP-positive CHO- bzw. CT26-Zellen durchgeführt. Nach vier Panning-Runden erfolgte die Identifizierung der gebundenen Peptide mit Hilfe der Illumina Next Generation Sequenzierung. Die am häufigsten angereicherten Peptidsequenzen sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

Die identifizierten Peptide wurden mittels Festphasensynthese hergestellt, mit Iod-125 radiomarkiert und zur Charakterisierung hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften an FAP-positiven CHO-Zellen getestet (Abb. 4.3).

Bezeichnung	Sequenz
GP-01	WMRCKQSDCLAGSVCSFHQWPPGPKYCG
GP-02	LFRCKQSDCLAGSVCDWHGWFDGPDYCG
GP-03	LMQCKQSDCLAGSVCPIAKHLMGPVYCG
GP-04	LHRCKQSDCLAGSVCVRFMHMYGPWYCG
GP-05	LWHCKQSDCLAGSVCGFSPQHIGPDYCG
GP-06	LLRCKQSDCLAGSVCTTRMEYHGPKYCG
GP-07	LFRCKQSDCLAGSVCDWNDGQFGPFYCG
GP-08	LMRCKQSDCLAGSVCFMYGSHWGPVYCG
GP-09	HMGCKQSDCLAGSVCIWMAVYGPVYCG
GP-10	LMRCKQSDCLAGSVCWTDATSYGPDYCG
GP-11	IMRCKQSDCLAGSVCLTYQDTWGPTYCG
GP-12	LMRCKQSDCLAGSVC DYKGRAFGPSYCG
GP-13	LMRCKQSDCLAGSVC GKFQVFLGPVYCG
GP-14	LFNCKQSDCLAGSVC EARDQVMGPVYCG
GP-15	LARCKQSDCLAGSVC DRSFHKPGPAYCG
GP-16	LMVCKQSDCLAGSVC MVWLDKQGPTYCG
GP-17	LMRCKQSDCLAGSVC ILKDIYDGPVYCG
GP-18	LMRCKQSDCLAGSVC PFYDLWFGPDYCG
GP-19	LMRCKQSDCLAGSVC ISWQPHQGPVYCG
GP-20	LMRCKQSDCLAGSVC FTDLHEPGPKYCG
GP-21	LMRCKQSDCLAGSVC TLESILEGPDYCG
GP-22	LMECKQSDCLAGSVC NHPKVYGPVYCG
GP-23	LMRCKQSDCLAGSVC TDDWAVSGPNYCG
GP-24	LMRCKQSDCLAGSVC TDLWKTLPVYCG
GP-25	LMRCKQSDCLAGSVC WVRVNILGPDYCG
GP-26	LMRCKQSDCLAGSVC STFLRYDGPMYCG
GP-27	LMECKQSDCLAGSVC NHPKVYGPVYCG
GP-28	LMHCKQSDCLAGSVC MRRENTIGPRYCG
GP-29	LMRCKQSDCLAGSVC IFQIANNGPMYCG
GP-30	LMRCKQSDCLAGSVC FTSLVFLGPRYCG
GP-31	LMRCKQSDCLAGSVC IDLMWSEGPMYCG

GP-32	LMRCKQSDSDCLAGSVCRVGFRRPGGPDYCG
GP-33	LMACKQSDSDCLAGSVCGWQSNFRGPNYCG
GP-34	LMLCKQSDSDCLAGSVCTDTMEHAGPVYCG
GP-35	DMDCKQSDSDCLAGSVCVTYGHLEGPMYCG
GP-36	LMVCKQSDSDCLAGSVCRAWQGVYGPPTYCG
GP-37	LMRCKQSDSDCLAGSVCKLIKLSDGPDYCG
GP-38	LMRCKQSDSDCLAGSVCLDAYSNMGPNYCG
GP-39	LMECKQSDSDCLAGSVCRENGHPMGPDYCG
GP-40	LMSCKQSDSDCLAGSVCDSEWERAHGPDYCG
GP-41	LMRCKQSDSDCLAGSVCSTFLRYDGPYCG
GP-42	LMRCKQSDSDCLAGSVCLEATGWDGPDYCG

Tabelle 4.2. Übersicht der im Biopanning am häufigsten angereicherten Ph.Min10-GP-FAP-Peptide. Die variablen Aminosäure sind in Fettschrift hervorgehoben.

Alle getesteten Peptide zeigen eine äußerst geringe Bindung an humanes FAP, mit maximalen Bindungswerten von $1,74 \pm 0,21\%$ ID nach zehn Minuten bzw. $1,41 \pm 0,06\%$ ID nach einer Stunde. Mit Ausnahme der Verbindungen GP-13 und GP-30 ist die unspezifische Bindung der Peptide deutlich geringer als die FAP-Bindung, so dass der Panning-Prozess grundsätzlich zu einer Anreicherung FAP-selektiver Binder geführt hat. Allerdings scheint die Affinität der selektierten FAP-Binder zu gering zu sein, um eine ausreichend hohe Bindung an das Zielprotein zu ermöglichen.

Eine andere Ursache für die geringen Bindungswerte könnte durch eine unzureichende Stabilität der Liganden nach Bindung an ihre Zielstruktur zu erklären sein. Aufgrund der enzymatischen Funktion des Membranproteins wäre es denkbar, dass die Peptide nach initialer Bindung rasch hydrolysiert werden, noch bevor sie ins Zellinnere gelangen. Das GP-Motiv, welches in allen bekannten natürlichen Liganden von FAP vorliegt, scheint zwar für die optimale Bindung an die Zielstruktur von Bedeutung zu sein, stellt aber gleichzeitig auch ein ideales Substrat des Enzyms dar. Dabei werden die Liganden durch das Grundgerüst des Min-23-Scaffolds offenbar nicht ausreichend stabilisiert. Dieses Problem könnte durch den Einsatz eines alternativen Scaffolds umgangen werden, welches nicht enzymatisch gespalten wird bzw. auch nach hydrolytischer Spaltung des GP-Motivs eine ausreichend hohe Internalisierung des Liganden in die Zelle ermöglicht.

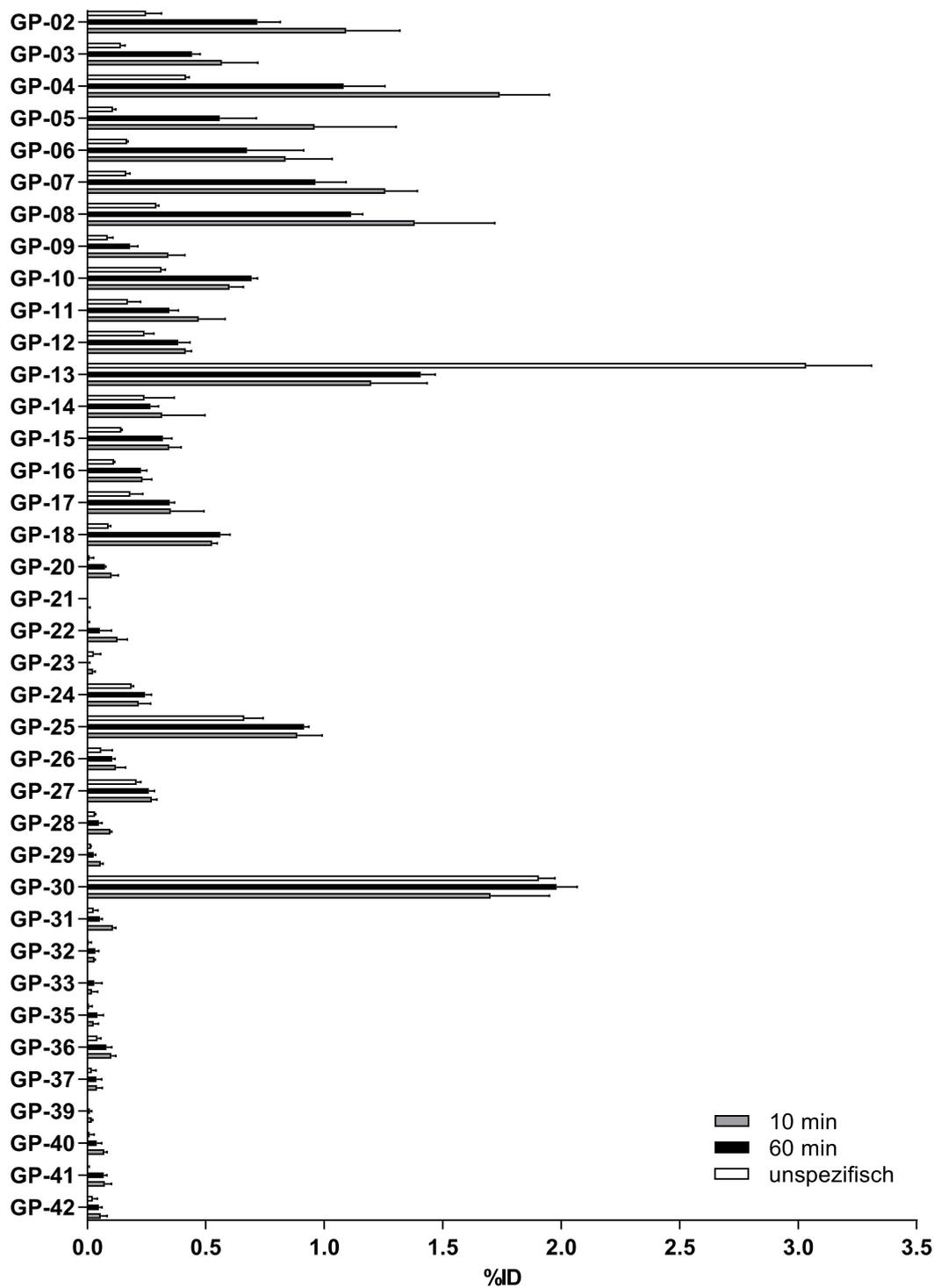


Abbildung 4.3. Bindung der Ph.Min10-GP-FAP-Peptide GP-02 bis -42 an FAP-positive CHO-Zellen nach Inkubation für zehn und 60 Minuten sowie unspezifische Bindung nach Inkubation für 60 Minuten bei 37 °C; n=3.

Eine alternative Lösung wäre die Wahl eines Bindungsmotives, welches nicht von der enzymatischen Funktion des FAPs gespalten werden kann, z.B. durch den Einbau von D-Aminosäuren. Allerdings kann bei dieser Strategie durch die veränderte Konformation der Aminosäuren eine veränderte Affinität der Peptide zum Zielprotein nicht ausgeschlossen werden. Es ist vielmehr davon auszugehen, dass der Einbau von isomeren Aminosäuren zu einem Bindungsverlust führt, so dass dieser Ansatz bei den ohnehin sehr geringen Bindungswerten der Min10-Peptide nicht sonderlich erfolgversprechend scheint.

Eine weitere Möglichkeit, die Hydrolyse potentieller FAP-spezifischer Binder zu umgehen, liegt in der Anreicherung von Liganden, die FAP allosterisch, also außerhalb des katalytischen Zentrums, binden. Dies kann durch eine Blockade des aktiven Zentrums, z.B. durch Zugabe eines Enzymsubstrats, während des Biopannings erreicht werden. Allerdings müsste hierbei gewährleistet sein, dass das Substrat während der gesamten Inkubationsdauer am aktiven Zentrum verbleibt und nicht gleichermaßen enzymatisch gespalten wird. Weiterhin sollte die Bindung des Substrats an das aktive Zentrum ausreichend hoch sein, um einer Verdrängung durch Peptide mit einer höheren Affinität entgegen zu wirken.

4.2 Charakterisierung der FAP-Binder MC-FA-012 und DOTA-(MC-FA-012)₃

4.2.1 Zellbasierte Bestimmung der Bindungsaffinität und -spezifität

Mit Hilfe der Phagen-Display-Technologie und anschließender Affinitätsreifung gelang es der Firma BionTech AG, den spezifischen FAP-Liganden MC-FA-012 zu identifizieren. Die für das Phagen-Display verwendete Bibliothek basiert auf dem Grundgerüst des Cyclotids MCoTI-II, einem ursprünglich aus dem Kürbisgewächs *Momordica chochinensis* isolierten Molekül, das aufgrund von drei Disulfidbrücken eine außergewöhnliche Stabilität gegenüber chemischem und enzymatischem Abbau besitzt. Darüber hinaus toleriert es den Einbau verschiedener Aminosäuresequenzen ohne negativen Einfluss auf die räumliche Konformation des knotenähnlichen Gerüsts^[74]. Um den Einfluss des Cyclotid-Grundgerüsts auf die FAP-Bindung zu untersuchen, wurde das Miniprotein MC-Myc-010 hergestellt, welches auf der identischen Gerüststruktur basiert, anstelle der FAP-spezifischen Bindesequenz jedoch das Myc-Motiv EQKLISEEDL enthält.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten die FAP-Bindungseigenschaften von MC-FA-012 und seiner trimerisierten Variante DOTA-(MC-FA-012)₃ *in vitro* und *in vivo* durch nuklearmedizinische Techniken verifiziert und dadurch das klinische Potential des Moleküls evaluiert werden. Beide Verbindungen wurden radiomarkiert und im Zellbindungsassay im Hinblick auf Affinität und Spezifität zum Zielprotein untersucht. Abbildung 4.4 A zeigt die Bindung von MC-FA-012 sowie MC-Myc-010 an CHO-FAP-Zellen; die Bindung von MC-FA-012 an humanes und murines FAP sowie an FAP-negative CHO-mock-Zellen ist in Abbildung 4.4 B zusammengefasst. Die Spezifität der Bindung von MC-FA-012 wurde in einem Konkurrenzexperiment bestimmt. Hierfür wurde das radioiodierte Peptid für 60 Minuten mit steigenden Konzentrationen an unmarkiertem Peptid inkubiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.5 dargestellt.

MC-FA-012 zeigt eine spezifische Bindung an humanes FAP, hat mit einem IC₅₀-Wert von 1,176 µM jedoch keine besonders hohe Affinität zum Zielprotein, die für die Entwicklung eines Radiotracers, sowohl für diagnostische, als auch für therapeutische Zwecke, jedoch von großer Bedeutung ist.

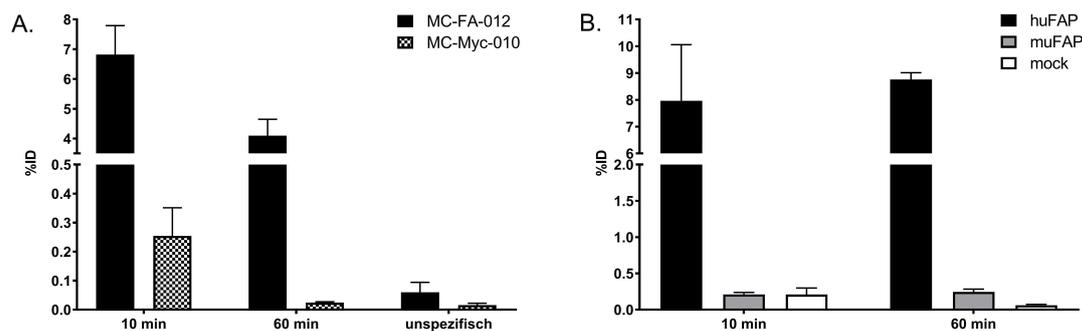


Abbildung 4.4. A. Bindung von MC-FA-012 und MC-Myc-010 an CHO-FAP-Zellen nach Inkubation für zehn und 60 Minuten sowie unspezifische Bindung nach Inkubation für 60 Minuten; n=3. B. Bindung von MC-FA-012 an humanes und murines FAP sowie FAP-negative CHO-Zellen (mock) nach Inkubation für zehn und 60 Minuten; n=3.

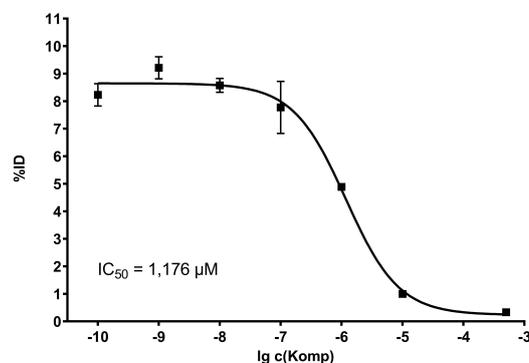


Abbildung 4.5. Konkurrenz von radioiodiertem MC-FA-012 durch steigende Konzentrationen an unmarkiertem MC-FA-012 an CHO-FAP-Zellen nach Inkubation für 60 Minuten; n=3.

Eine ausreichend starke Bindung des Liganden an seine Zielstruktur ist die Voraussetzung für eine zuverlässige und rasche Aufnahme in die Zelle. Dies gewährleistet ein starkes Signal im Tumorgewebe und einen niedrigen Untergrund bei der Bildgebung sowie eine hohe intratumorale therapeutische Dosis und eine geringe Strahlenbelastung von gesundem Gewebe im Falle einer Endoradiotherapie.

Um die Zellbindung zu erhöhen, wurden deshalb drei MC-FA-012-Einheiten über einen chemischen Linker zu einem Trimer zusammengeslossen und mit dem Chelator DOTA (1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure) fusioniert. Dieser ist in der Lage, zwei- und dreiwertige Metall-Kationen zu komplexieren und eignet sich somit optimal für die Beladung mit nuklearmedizinisch relevanten Radionukliden wie Gallium-68 oder Lutetium-177. Die Präsenz von drei FAP-Liganden pro Molekül erhöht die Avidität der resultierenden Verbindung und damit auch die sogenannte scheinbare Affinität (*apparent*

affinity) gegenüber der Zielstruktur. Abbildung 4.6 zeigt die Bindung des Trimers DOTA-(MC-FA-012)₃ im Vergleich zum Monomer MC-FA-012 an humanes und murines FAP sowie an FAP-negative CHO-mock-Zellen nach Inkubation für 60 Minuten.

Im Vergleich zum monomeren Peptid ($8,8 \pm 0,25$ %ID) wird die Bindung an humanes FAP durch Trimerisierung auf das nahezu Siebenfache erhöht ($59,4 \pm 3,87$ %ID). Dies wird durch den im Wettbewerbsexperiment ermittelten IC₅₀-Wert des Trimers von 200,5 nM bestätigt (Abb. 4.7 B). Die Affinität zu murinem FAP sowie die unspezifische Bindung an FAP-negative Zellen unterscheiden sich dabei nicht signifikant von den Bindungswerten des Monomers.

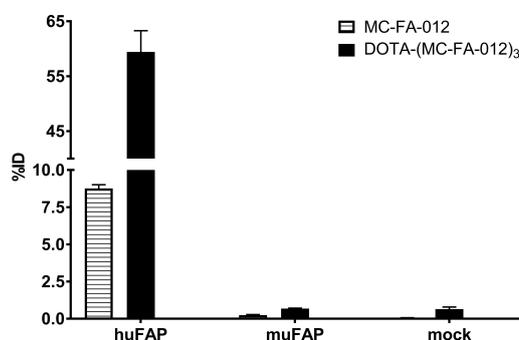


Abbildung 4.6. Bindung von MC-FA-012 und DOTA-(MC-FA-012)₃ an FAP-positive und FAP-negative CHO-Zellen nach Inkubation für 60 Minuten; n=3.

Neben der Affinität und Spezifität zum Zielprotein spielt die Internalisierungsrate des Tracers eine wesentliche Rolle für die effiziente Aufnahme in die Zelle. Aus diesem Grund wurde der Anteil der internalisierten Fraktion im Verhältnis zur Gesamtbindung des Tracers nach Inkubation für bis zu vier Stunden untersucht (Abb. 4.7 A). Bereits nach zehn Minuten können ca. 33 % der gesamten Tracer-Menge innerhalb der Zelle nachgewiesen werden, wobei der internalisierte Anteil im Verlauf von einer Stunde kontinuierlich ansteigt. Die höchste Internalisierungsrate zeigt sich nach zwei Stunden, wobei ca. 50 % der gesamten Tracer-Menge innerhalb der Zelle anzufinden sind. Dabei scheint die Internalisierung temperaturabhängig zu verlaufen, da eine Senkung der Temperatur auf 4 °C zu einer deutlichen Reduktion der aufgenommenen Tracermenge führt (ca. 33 % der Gesamtaktivität nach zwei Stunden). Darüber hinaus zeichnet sich DOTA-(MC-FA-012)₃ durch eine lange Verweildauer in der Zelle nach erfolgter Internalisierung aus. Efflux-Experimente zeigen, dass selbst 20 Stunden nach Inkubation noch 95 % der Ausgangsaktivität in FAP-positiven Zellen nachweisbar sind (Abb. 4.7 C) und nur geringe Mengen an das Zellkulturmedium

abgegeben werden (Abb. 4.7 D). Dies ist für einen potentiellen Einsatz des Tracers in Kombination mit therapeutischen Nukliden von besonderem Vorteil, da eine ausreichend lange Strahlenexposition der malignen Läsionen maßgeblich für einen Therapieerfolg ist.

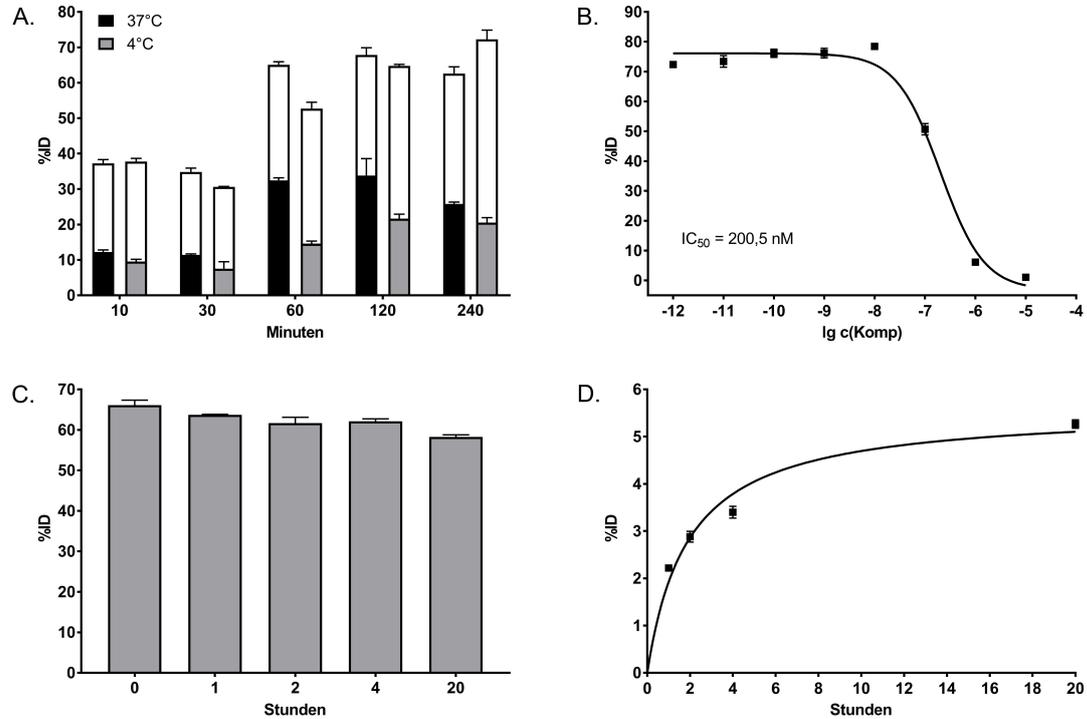


Abbildung 4.7. Charakterisierung von DOTA-(MC-FA-012)₃ an FAP-positiven CHO-Zellen; n=3 für jedes Experiment. A. Internalisierung des Trimers nach Inkubation für bis zu vier Stunden bei 4 und 37 °C. B. Konkurrenz von radiomarkiertem Trimer durch steigende Konzentrationen an unmarkierter Substanz nach Inkubation für 60 Minuten. C, D. Zeitabhängige Retention und Efflux des Trimers nach Inkubation für eine Stunde bei 37 °C.

4.2.2 Charakterisierung der Pharmakokinetik im Tiermodell

Zur Charakterisierung der Pharmakokinetik von DOTA-(MC-FA-012)₃ in CT26-FAP-tumortragenden Nacktmäusen wurde das mit Gallium-68 markierte Trimer intravenös verabreicht und die Organverteilung im Kleintier-PET untersucht. Zusätzlich wurden Bioverteilungsstudien mit Lutetium-177-markiertem Trimer durchgeführt. Hierfür wurde die radiomarkierte Substanz intravenös verabreicht und deren Anreicherung im Blut sowie in ausgewählten Organen *ex vivo* im Gamma-Counter bestimmt.

Bildgebungsstudien mit DOTA-(MC-FA-012)₃

Abbildung 4.8 zeigt die Maximumintensitätsprojektionen (MIP) bis zu 140 Minuten nach Injektion von 10 MBq ⁶⁸Ga-DOTA-(MC-FA-012)₃. Bereits nach 20 Minuten ist eine deutliche Anreicherung des Radiotracers im FAP-positiven CT26-Tumor (roter Pfeil; SUV 0,8), nicht aber im FAP-negativen CT26-wt-Tumor (weißer Pfeil; SUV 0,2) zu erkennen. Zudem ist eine starke Retention des Trimers in den Nieren sichtbar (SUV 13,4 nach 60 Minuten), die auch nach zwei Stunden nicht merklich abnimmt. Die unspezifische Aktivität im Blut sowie in gesunden Geweben ist sehr schwach, was zu einem guten Bildkontrast mit sehr geringem Hintergrund führt. Im Gegensatz hierzu ist nach Injektion des unspezifischen Kontrollcyclotids DOTA-(MC-FA-0116)₃ keine Tumoranreicherung zu erkennen (SUV 0,2 nach 20 Minuten). Jedoch ist auch hier das Nierensignal mit einem mittleren SUV-Wert von 7,1 auch nach zwei Stunden noch sehr hoch. Dies deutet darauf hin, dass das Cyclotid-Grundgerüst für die starke Nierenretention verantwortlich ist. Die Zeit-Aktivitätskurven sind in Abb. 4.9 zusammengefasst; eine Übersicht der gemessenen SUV-Werte befindet sich im Anhang in den Tabellen 5.17 und 5.18.

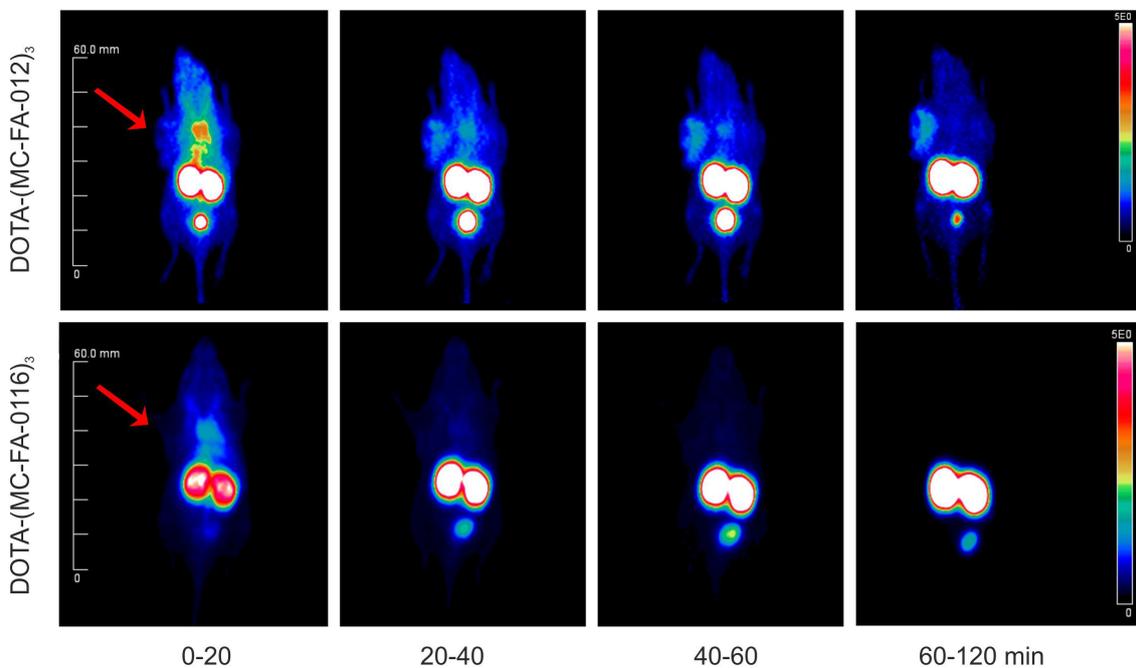


Abbildung 4.8. MIP bis zu 140 Minuten nach intravenöser Injektion von DOTA-(MC-FA-012)₃ bzw. DOTA-(MC-FA-0116)₃ in tumortragenden Nacktmäusen. Roter Pfeil: CT26-FAP-Tumor, weißer Pfeil: CT26-wt-Tumor.

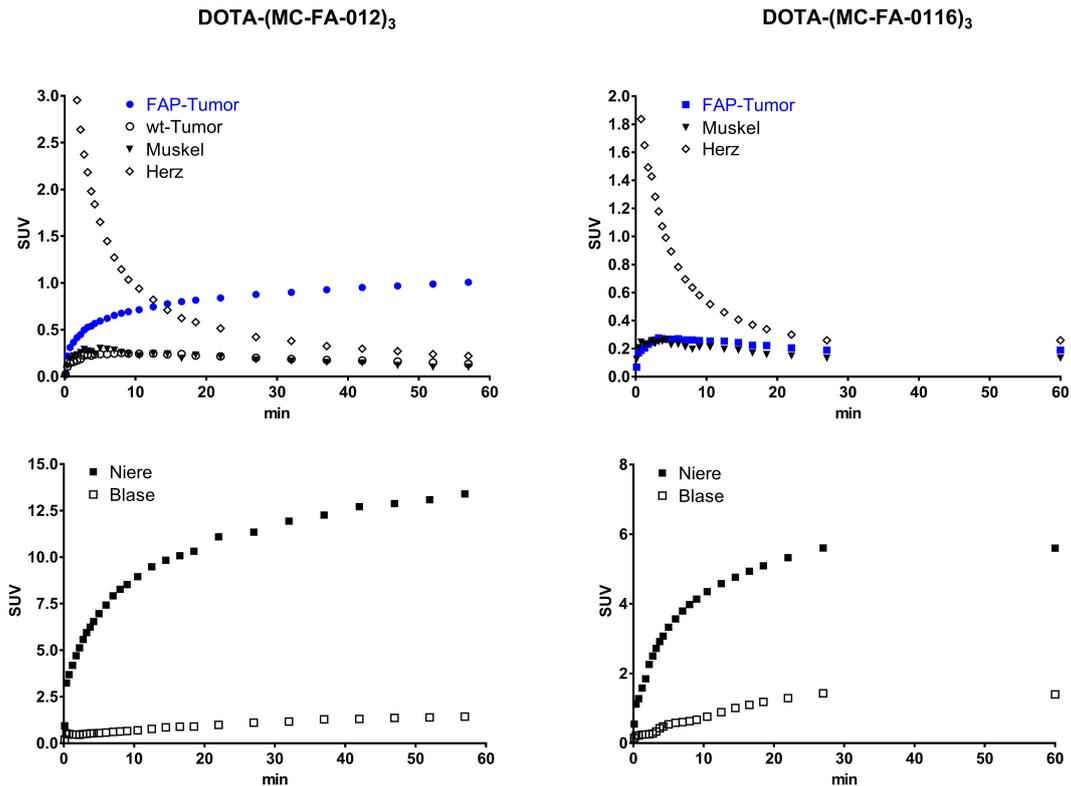


Abbildung 4.9. Zeit-Aktivitätskurven nach intravenöser Injektion von DOTA-(MC-FA-012)₃ bzw. DOTA-(MC-FA-0116)₃ in CT26-FAP-tumortragenden Nacktmäusen; n=1.

Bei dem hier verwendeten CT26-FAP-Tumormodell handelt es sich um eine transfizierte Zelllinie, die das Zielprotein in großer Menge exprimiert. Diese Zelllinie ist aufgrund ihres schnellen Wachstums in Nacktmäusen optimal für eine initiale Testung potentieller FAP-Liganden geeignet, reflektiert die physiologische Situation jedoch nur unzureichend. Da FAP nicht von Tumorzellen selbst, sondern von aktivierten Fibroblasten in der Mikroumgebung des Tumors gebildet wird, ist die Expression stark vom Stromaanteil der entsprechenden Tumorart abhängig. Aus diesem Grund wurde die Pharmakokinetik von DOTA-(MC-FA-012)₃ zusätzlich in einem weiteren Tumormodell untersucht. Hierfür wurden U87MG-Zellen verwendet, die ursprünglich aus einem humanen Glioblastom etabliert worden sind. Im Gegensatz zu CT26-FAP-Zellen zeigen diese selbst nur eine geringe FAP-Expression und erlauben somit eine realitätsnähere Charakterisierung des Radiotracers.

Abbildung 4.10 zeigt die Maximumintensitätsprojektionen bis zu 140 Minuten nach Injektion von 10 MBq ⁶⁸Ga-DOTA-(MC-FA-012)₃ in U87MG-tumortragenden Nacktmäusen. Auch in diesem Tumormodell ist bereits nach 20 Minuten eine Anreicherung des Tracers im Tumor zu sehen (SUV 0,57), die bis zu 140 Minuten nach Injektion erhalten bleibt. Im

Vergleich zum CT26-FAP-Modell ist die Tumoranreicherung des Tracers deutlich schwächer, was auf die geringere FAP-Expression zurückzuführen ist. Die Zeit-Aktivitätskurven des Tracers in beiden Tumormodellen sind in Abb. 4.11 zusammengefasst. Eine Übersicht der gemessenen SUV-Werte befindet sich im Anhang in Tabelle 5.19.

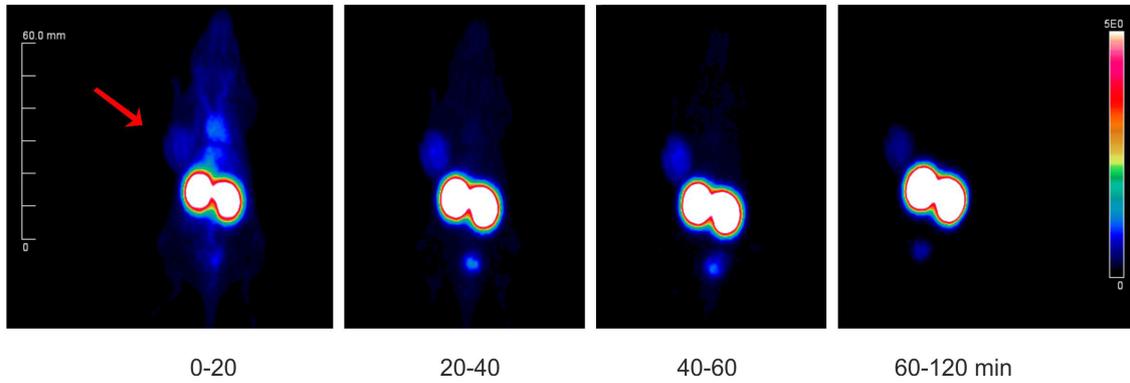


Abbildung 4.10. MIP bis zu 140 Minuten nach intravenöser Injektion von DOTA-(MC-FA-012)₃ in tumortragenden Nacktmäusen. Roter Pfeil: U87MG-Tumor.

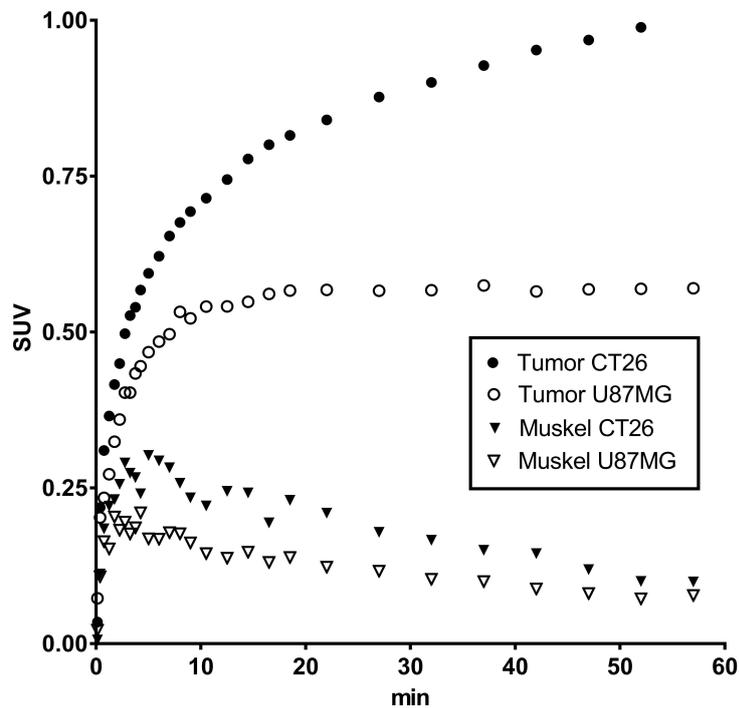


Abbildung 4.11. Zeit-Aktivitätskurven nach intravenöser Injektion von DOTA-(MC-FA-012)₃ in CT26-FAP- bzw. U87MG-tumortragenden Nacktmäusen; n=1.

Bioverteilungstudien mit DOTA-(MC-FA-012)₃

Zur quantitativen Beurteilung der Bioverteilung *in vivo* wurde DOTA-(MC-FA-012)₃ mit Lutetium-177 radiomarkiert und in tumortragenden Nacktmäusen untersucht. Hierzu wurden die zu untersuchenden Organe bis zu 24 Stunden nach Injektion des Tracers entnommen und die Aktivitäten im Gamma-Counter bestimmt. Die Ergebnisse der Bioverteilungsstudie sind in den Abbildungen 4.12 und 4.13 zusammengefasst. Entsprechend den Ergebnissen aus der Bildgebung ist bereits nach 30 Minuten in beiden Tumormodellen eine starke Anreicherung des Tracers im Tumor zu sehen ($9,9 \pm 1,75$ bzw. $6,4 \pm 1,20$ %ID für CT26-FAP bzw. U87MG). Im CT26-FAP-Tumormodell können nach 24 Stunden noch 59 % der ursprünglichen Aktivität im Tumor nachgewiesen werden ($5,85 \pm 0,10$ %ID).

Anders verhält es sich im U87MG-Modell: Hier sind nach 24 Stunden nur noch 16 % der ursprünglichen Aktivität im Tumor vorhanden ($1,0 \pm 0,19$ %ID). Erneut sind die gemessenen Aktivitäten im Blut sowie in allen untersuchten Organen, mit Ausnahme der Niere, in beiden Tumormodellen äußerst gering (siehe Anhang, Tabellen 5.20 und 5.21).

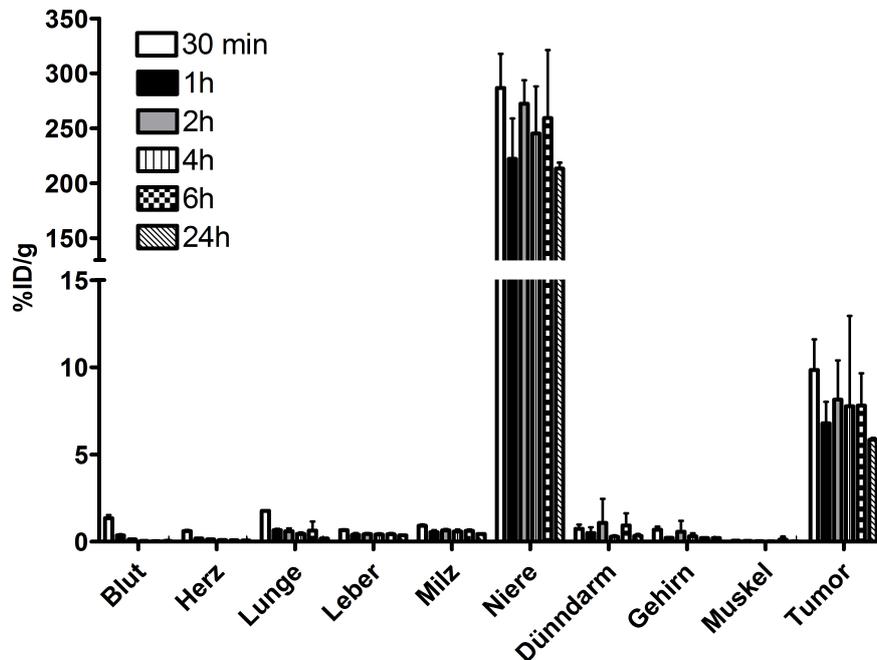


Abbildung 4.12. Bioverteilung 30 Minuten bis 24 Stunden nach Injektion von DOTA-(MC-FA-012)₃ in CT26-FAP-tumortragenden Nacktmäusen; n=3 für jeden Zeitpunkt.

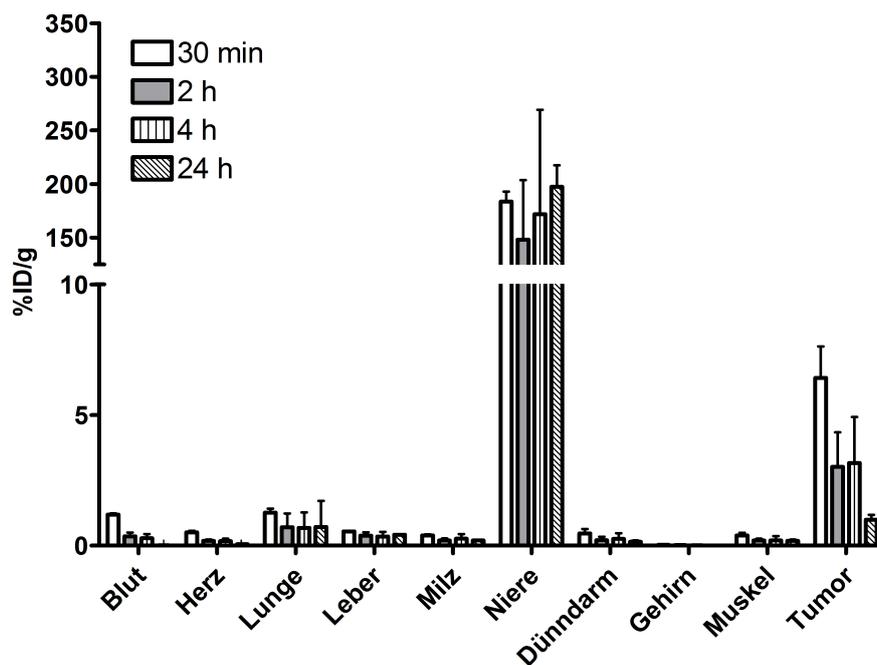


Abbildung 4.13. Bioverteilung 30 Minuten bis 24 Stunden nach Injektion von DOTA-(MC-FA-012)₃ in U87MG-tumortragenden Nacktmäusen; n=3 für jeden Zeitpunkt.

4.2.3 Klinische Testung von DOTA-(MC-FA-012)₃

Aufgrund der vielversprechenden Daten aus den präklinischen Untersuchungen wurde die Bioverteilung von ⁶⁸Ga-DOTA-(MC-FA-012)₃ bei acht Patienten mit metastasiertem, therapierefraktärem Pankreaskarzinom jeweils eine und bis zu fünf Stunden nach Injektion mittels PET/CT untersucht. Bei allen Patienten ist bereits nach einer Stunde eine deutliche Akkumulation von DOTA-(MC-FA-012)₃ mit maximalen SUV-Werten von bis zu 11,9 im Tumorstroma zu erkennen. Abbildung 4.14 zeigt die Maximumintensitätsprojektionen eine, drei und fünf Stunden nach Injektion des Tracers bei einem Patienten mit einer großen nekrotischen Lebermetastase. Zirkulär um den nekrotischen Bereich ist deutlich abgegrenzt eine starke Anreicherung des Tracers im malignen Gewebe zu erkennen, die im Verlauf von fünf Stunden nur geringfügig abnimmt, wobei einzelne Bereiche stärker speichern als nach einer Stunde (SUV_{max} 4,5 nach einer Stunde, 6,6 nach fünf Stunden).

Auch bei zwei weiteren Patienten sind die wesentlich kleineren Lebermetastasen deutlich zu erkennen und zeigen eine robuste Speicherung des Radiotracers bis zu drei Stunden nach Injektion (Abb. 4.15). Bei allen untersuchten Patienten ist die Anreicherung im gesunden Gewebe minimal, was in einem geringen Hintergrundsignal und einem hohen Bildkontrast resultiert.

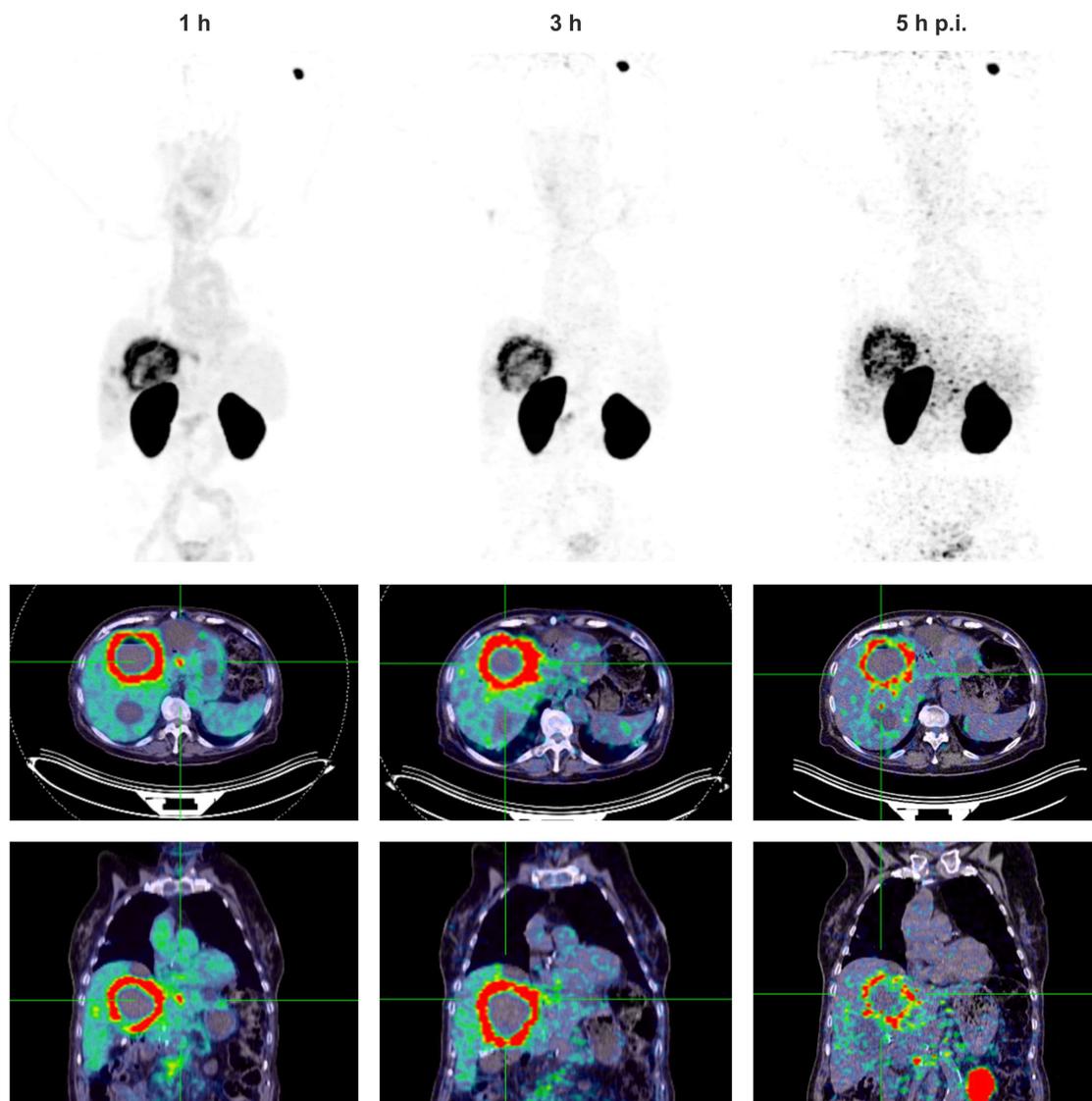


Abbildung 4.14. Ganzkörper-PET/CT (MIP) und transaxiale sowie koronare Ansicht eine, drei und fünf Stunden nach intravenöser Injektion von ^{68}Ga -DOTA-(MC-FA-012) $_3$ in einem Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom. Zirkulär um die nekrotische Lebermetastase ist deutlich abgegrenzt eine starke Anreicherung des Tracers im malignen Gewebe zu erkennen.

Wie bereits aus den Tierversuchen zu erwarten war, ist die Nierenretention des Tracers allerdings sehr hoch (maximale SUV-Werte bis zu 111 nach einer Stunde). Abbildung 4.16 zeigt exemplarisch die gemessenen Aktivitäten von ^{68}Ga -DOTA-(MC-FA-012) $_3$ in den Tumorkläsionen sowie in der Aorta und in den Nieren bis zu fünf Stunden nach Injektion. Hierbei ist deutlich zu sehen, dass der Tracer kontinuierlich aus dem Blut aufgenommen wird und in den Metastasen anreichert. Gleichzeitig steigt die gemessene Aktivität in den Nieren stetig an und erreicht nach fünf Stunden ein Maximum von 149. Dies spricht für eine starke Akkumulation der Substanz in der Niere mit nur geringer renaler Elimination.

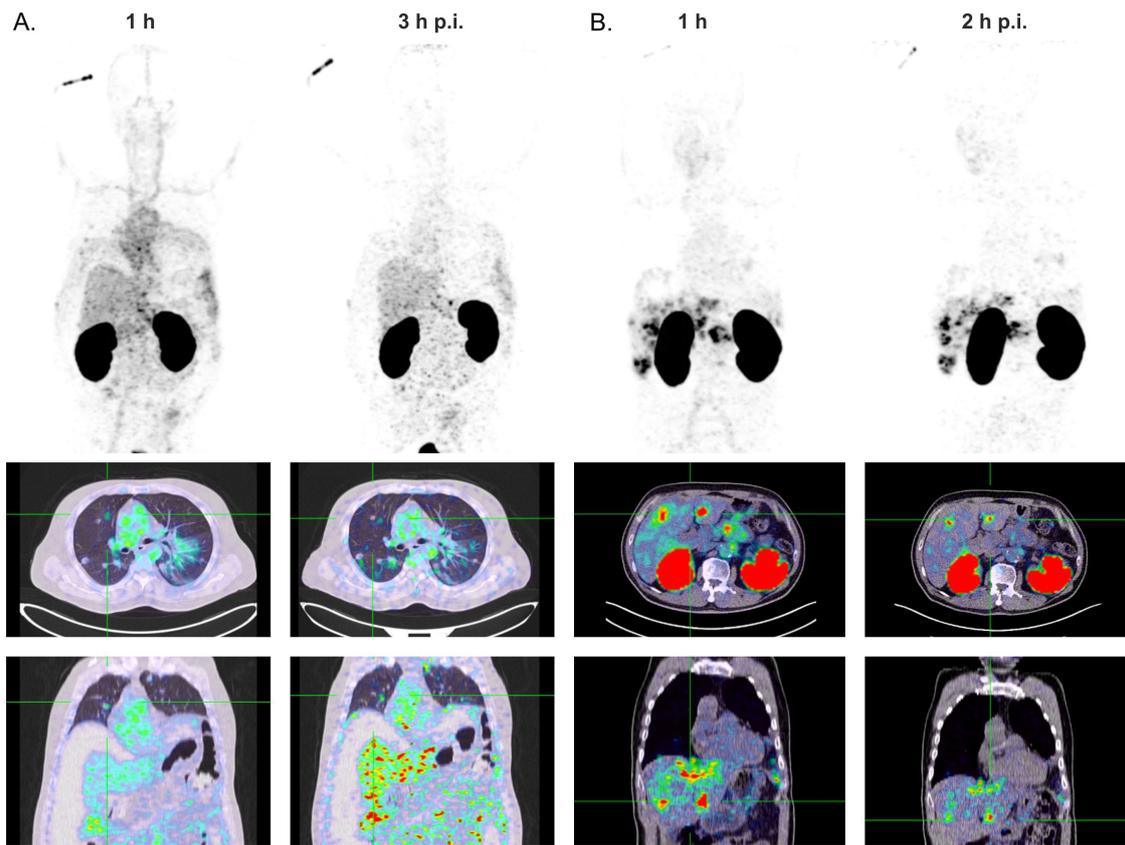


Abbildung 4.15. Ganzkörper-PET/CT (MIP) und transaxiale sowie koronare Ansicht bis zu drei Stunden nach intravenöser Injektion von ^{68}Ga -DOTA-(MC-FA-012) $_3$ in zwei unterschiedlichen Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom.

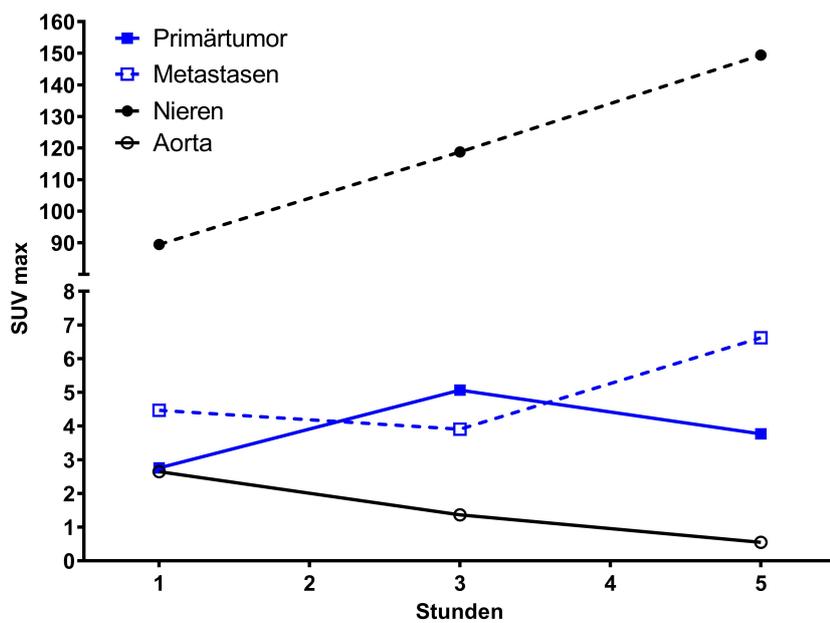


Abbildung 4.16. Maximale SUV-Werte eine bis fünf Stunden nach Injektion von ^{68}Ga -DOTA-(MC-FA-012) $_3$ in einem Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom.

Bereits eine Stunde nach Injektion sind die gemessenen Aktivitäten in den untersuchten Organen, mit Ausnahme der Niere, in allen acht Patienten deutlich geringer als in den malignen Läsionen (Abb. 4.17). Die relativ große Streuung der ermittelten SUV-Werte in den Primärtumoren sowie in den Metastasen verdeutlicht die unterschiedliche Anreicherung des Tracers in Abhängigkeit von der Anzahl der im Tumorstroma vorhandenen FAP-Moleküle. Je mehr Zielprotein exprimiert wird, desto stärker ist die Anreicherung des Tracers im jeweiligen Gewebe. DOTA-(MC-FA-012)₃ eignet sich somit insbesondere für die Detektion stromareicher Tumorentitäten wie des Pankreaskarzinoms.

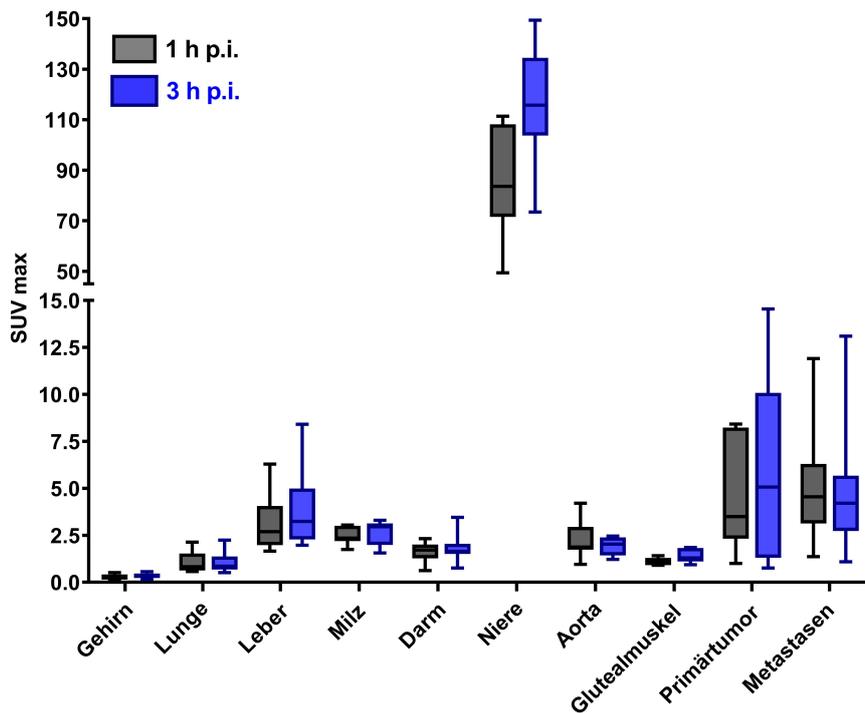


Abbildung 4.17. Durchschnittliche Organaktivitäten (SUV max) eine und drei Stunden nach Injektion von ⁶⁸Ga-DOTA-(MC-FA-012)₃; n(Organe)=8; n(Primärtumor)=7; n(Metastasen)=41.

Nachdem die Bildgebungsstudien bei allen Patienten eine hohe Tumoranreicherung von DOTA-(MC-FA-012)₃ sowie einen niedrigen Bildhintergrund gezeigt hatten, wurde die Substanz erstmalig therapeutisch eingesetzt. Hierfür wurden einem Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom 2,5 GBq ¹⁷⁷Lu-DOTA-(MC-FA-012)₃ verabreicht und die Tracerverteilung intratherapeutisch mittels Szintigraphie überprüft (Abb. 4.18). Hierbei zeigte sich bis zu 46 Stunden nach Injektion noch eine starke Anreicherung des Trimers in den malignen Läsionen. Allerdings nahm auch die Aktivität in der Niere bis zu 46 Stunden nach Gabe des Tracers nicht merklich ab und stellt damit die größte Limitation einer potentiellen therapeutischen Anwendung des Tracers dar.

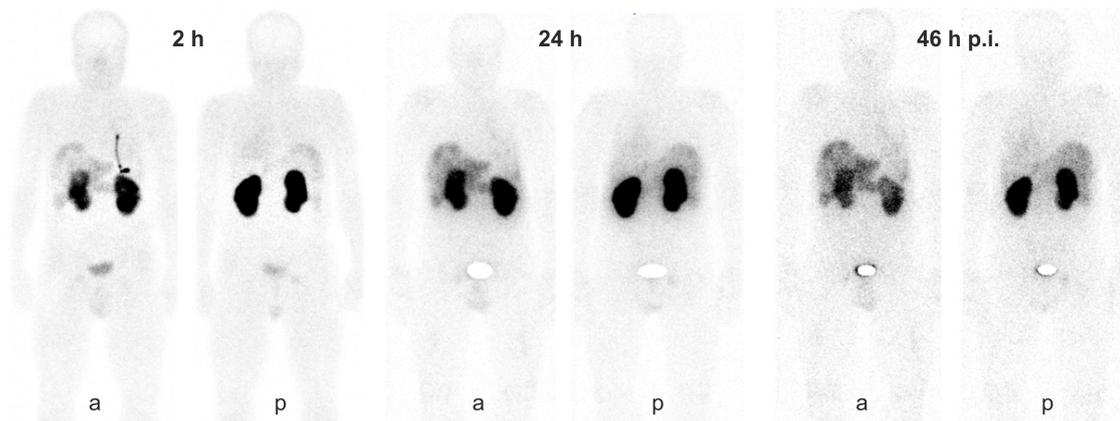


Abbildung 4.18. Szintigraphie zwei, 24 und 46 Stunden nach Injektion von ^{177}Lu -DOTA-(MC-FA-012)₃ zur Endoradiotherapie eines metastasierten Pankreaskarzinoms, jeweils in ventraler (a, anterior) und dorsaler (p, posterior) Ansicht.

4.2.4 Experimente zur Reduktion der Nierenanreicherung von DOTA-(MC-FA-012)₃

Da die persistente Nierenretention einen limitierenden Faktor für einen möglichen therapeutischen Einsatz von DOTA-(MC-FA-012)₃ darstellt, wurden unterschiedliche Strategien zur Reduktion der Nierenanreicherung in Erwägung gezogen. Eine erhöhte Nierenakkumulation ist bei einer Reihe von klinisch relevanten Radiotracer, wie z.B. radiomarkierten Antikörperfragmenten sowie einigen Somatostatin- oder Gastrinanaloga, ein bekanntes Problem^[93].

Nach intravenöser Gabe werden Peptide und Proteine mit einem Molekulargewicht bis zu 12 kDa rasch aus dem Blutplasma in die Glomeruli der Niere filtriert und gelangen mit dem Ultrafiltrat in das Lumen des proximalen Tubulus, wo eine Reabsorption ins Blutplasma stattfindet. Hierfür gibt es unterschiedliche Transportmechanismen: Oligopeptide werden am Bürstensaum der proximalen Tubuluszellen hydrolysiert und die resultierenden Fragmente von Aminosäuretransportern in die Zelle zurückbefördert. Größere Peptide und Proteine hingegen werden nach Bindung an bestimmte Rezeptoren über endozytotische Vesikel internalisiert und in Lysosomen hydrolytisch in kleinere Peptide und Aminosäuren abgebaut. Diese werden anschließend ins Zytoplasma freigesetzt und über entsprechende Aminosäuretransporter aus der Zelle ausgeschleust. Dies gilt z.B. auch für Monoiodtyrosin, dem primären Abbauprodukt von radioiodierten Proteinen, welches rasch aus den Lysosomen freigesetzt wird. Indessen gibt es eine Reihe von radiomarkierten Verbindungen, die

die lysosomale Membran nicht ohne Weiteres passieren können und als sogenannte *residualizing radiolabels* über längere Zeit in den lysosomalen Vesikeln verbleiben. Dazu gehören auch Lysin-Chelator-Konjugate sowie Chelator-Konjugate mit N-terminalen Aminosäuren. Sowohl für die Bildgebung als auch für die peptidvermittelte Radiorezeptorthherapie (PRRT) ist der lysosomale Einschluss der Peptide in der Zielzelle ein angestrebtes Ziel, um die Verweildauer der Nuklide zu erhöhen. Allerdings ist dieser Effekt auch maßgeblich für die hohe Nierenakkumulation der Substanzen verantwortlich. Eine weitere Ursache für die erhöhte Nierenretention von radiomarkierten Peptiden liegt in der Bindung an renale Transportproteine und -rezeptoren, die in einer starken Anreicherung der Tracer in den Tubuluszellen resultiert. Einer dieser Rezeptoren ist der Megalin-Rezeptor, welcher in großer Anzahl in der apikalen Membran der proximalen Tubuluszellen exprimiert wird und eine wichtige Rolle für die Reabsorption vieler Stoffe spielt. Megalin ist für die Aufnahme zahlreicher strukturell verschiedener Proteine, u.a. Albumin und Hämoglobin, verantwortlich und kann durch das Aminoglykosid Gentamicin inhibiert werden^[94,95].

Bereits seit den 1970er-Jahren ist bekannt, dass die peptidvermittelte Inhibition bestimmter Transportproteine durch die gleichzeitige Gabe von positiv geladenen Aminosäuren kompetitierbar ist. Bis heute ist die Co-Administration einer hochkonzentrierten Mischung aus Arginin und Lysin die Standardmethode zur Nephroprotektion bei der PRRT mit Somatostatin-Analoga^[93,96]. Auch anionische Gelatinderivate, wie z.B. Gelafundin, eignen sich für eine unspezifische Verdrängung der Radiotracers von den Transportproteinen und führen in vielen Fällen zu einer starken Reduktion der Nierenakkumulation peptidischer Substanzen.

Mit dem Ziel, die Nierenretention von DOTA-(MC-FA-012)₃ zu reduzieren, wurden Versuche mit den Nephroprotektoren Arginin/Lysin, Gelafundin sowie dem Megalin-Antagonisten Gentamicin durchgeführt. Um den grundsätzlichen Einfluss der Substanzen auf die Bindung von DOTA-(MC-FA-012)₃ zu untersuchen, wurden zunächst Zellversuche an CHO-FAP und Caki-Zellen durchgeführt. Caki-1 und Caki-2 sind humane Nierenkarzinomlinien, die Megalin in großer Menge exprimieren. Abbildung 4.19 zeigt die Zellbindung und Internalisierung des Trimers nach Inkubation mit CHO-FAP- und Caki-Zellen für 60 Minuten. Während der Radiotracer mit hoher Affinität an die FAP-positiven Zellen bindet (59 %ID), ist die Bindung an die Nierenkarzinomlinien mit unter 1 %ID vernachlässigbar klein. DOTA-(MC-FA-012)₃ scheint somit keine hohe Affinität zum Megalinrezeptor zu

besitzen. Auch die gleichzeitige Inkubation des Trimers mit Arginin/Lysin, Gelafundin oder Gentamicin hat keinen Einfluss auf die Bindung und Internalisierung des Tracers in CHO-FAP-Zellen (Abb. 4.20), so dass kein negativer Einfluss der Kompetitoren auf die Tumoranreicherung *in vivo* zu erwarten ist.

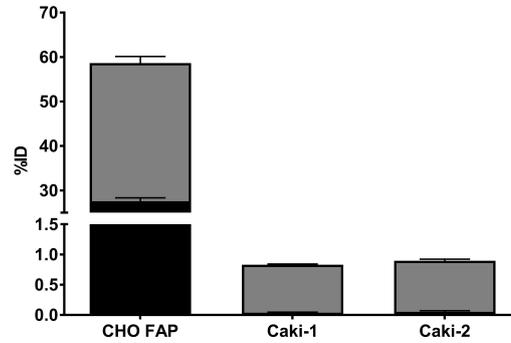


Abbildung 4.19. Bindung und Internalisierung von DOTA-(MC-FA-012)₃ an CHO-FAP-Zellen sowie den Nierenkarzinomlinien Caki-1 und Caki-2 nach Inkubation für 60 Minuten; n=3.

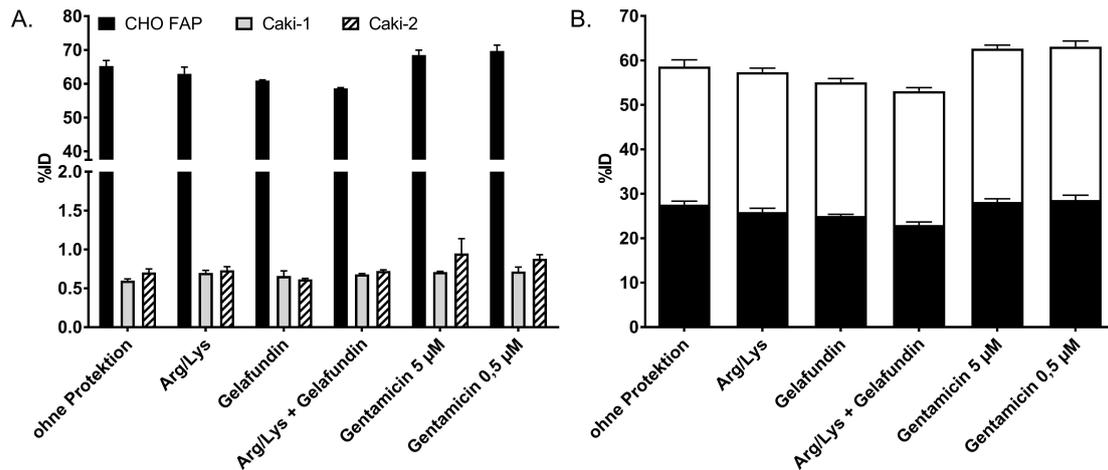


Abbildung 4.20. Einfluss nephroprotektiver Substanzen auf die Zellbindung von DOTA-(MC-FA-012)₃ *in vitro*. A. Bindung des Trimers an CHO-FAP-Zellen sowie die Nierenkarzinomlinien Caki-1 und Caki-2 bei gleichzeitiger Inkubation mit unterschiedlichen Nephroprotektoren sowie Gentamicin nach Inkubation für 60 Minuten; n=3. B. Internalisierungsrate des Trimers in CHO-FAP-Zellen bei gleichzeitiger Inkubation mit unterschiedlichen Nephroprotektoren sowie Gentamicin nach Inkubation für 60 Minuten; n=3.

Um eine mögliche Nephroprotektion durch die Gabe von Arginin/Lysin oder Gelafundin in tumortragenden Mäusen zu untersuchen, wurden die Substanzen jeweils zehn Minuten vor Tracergabe intraperitoneal verabreicht. Nach einer Stunde wurden die Tiere euthanisiert, Blut und Organe entnommen und die Aktivität im Gamma-Counter bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.21 zusammengefasst.

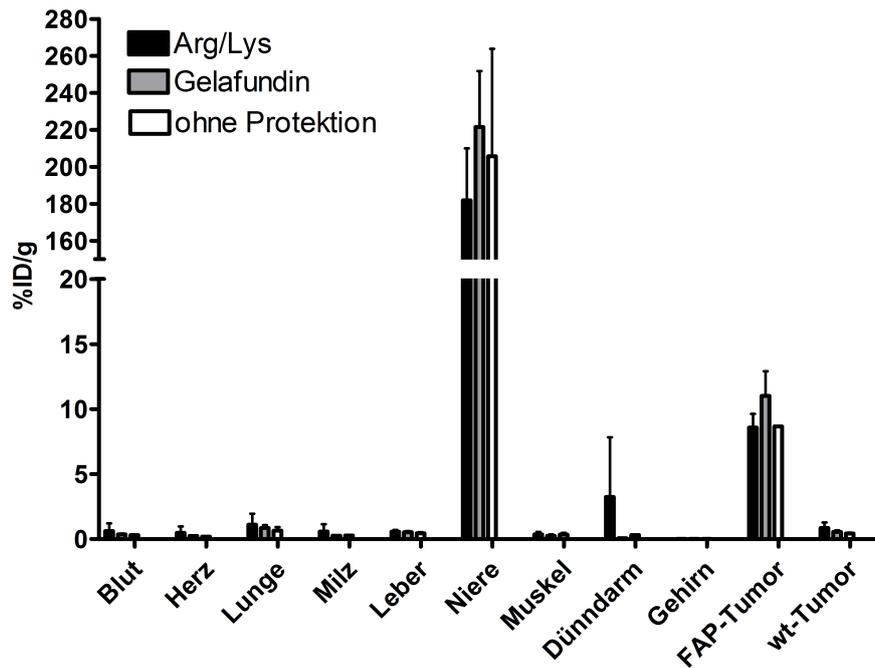


Abbildung 4.21. Bioverteilung von DOTA-(MC-FA-012)₃ in CT26-FAP-tumortragenden Nacktmäusen eine Stunde nach intravenöser Injektion des Tracers. Zehn Minuten vor Gabe der radioaktiven Substanz wurden je 3 mg Arginin/Lysin bzw. 4 mg Gelafundin zur Nephroprotektion intraperitoneal verabreicht; n=3.

Wie aus den Zellexperimenten zu erwarten war, zeigen beide Nephroprotektoren keinen negativen Einfluss auf die Tumoranreicherung des Trimers. Allerdings konnte auch die Tracerakkumulation in der Niere durch die Gabe der Kompetitoren nicht reduziert werden. Dies könnte an einer hohen Affinität von DOTA-(MC-FA-012)₃ zu den entsprechenden Transportproteinen in den Tubuluszellen liegen, was in einer kompetitiven Verdrängung der eingesetzten Substanzen resultiert. Da eine Dosiserhöhung der Kompetitoren aufgrund von zunehmenden Nebenwirkungen, wie starker Übelkeit und Verschiebungen des Elektrolyt- und insbesondere des Kaliumspiegels, nicht angeraten ist, eignen sich Arginin/Lysin und Gelafundin nicht für eine ausreichende intratherapeutische Nephroprotektion.

Nachdem die Kompetition von DOTA-(MC-FA-012)₃ durch Arginin/Lysin und Gelafundin nicht erfolgreich war, wurde eine mögliche Verdrängung durch Substanzen mit höherer Affinität zum entsprechenden Transportprotein in den Tubuluszellen untersucht. Hierfür wurden die FAP-unspezifischen Miniproteine MC-Myc-010 und DOTA-(MC-FA-0116)₃ jeweils 15 Minuten vor Injektion des Radiotracers intraperitoneal in tumortragende Nacktmäuse verabreicht. Die Ergebnisse des Experimentes sind in Abbildung 4.22 zusammengefasst.

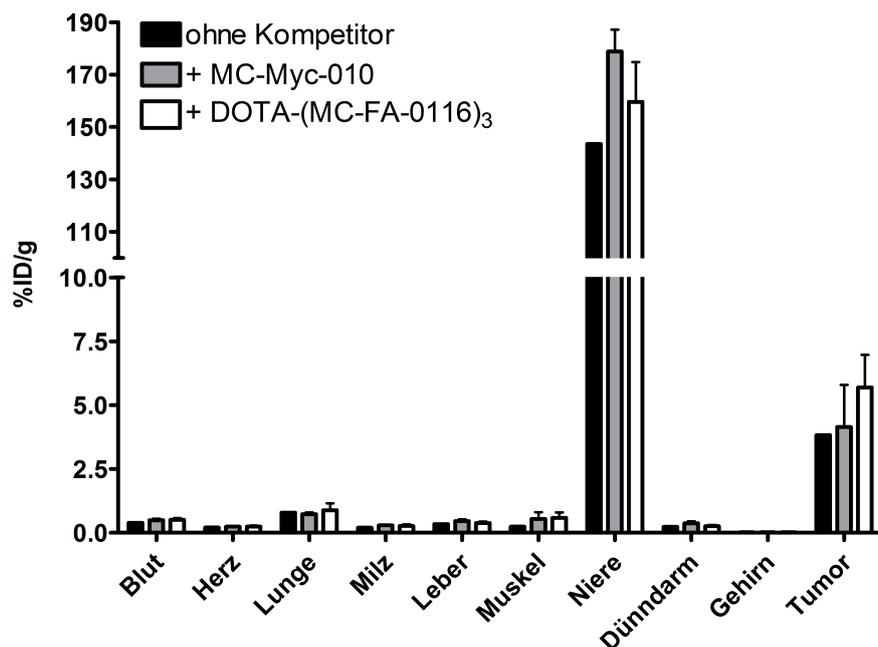


Abbildung 4.22. Bioverteilung von DOTA-(MC-FA-012)₃ in CT26-FAP-tumortragenden Nacktmäusen eine Stunde nach intravenöser Injektion des Tracers. 15 Minuten vor Gabe der radioaktiven Substanz wurden 135 nmol MC-Myc-010 bzw. 8 nmol DOTA-(MC-FA-0116)₃ zur Nephroprotektion intraperitoneal verabreicht; n=3 mit Kompetitor, n=1 ohne Kompetitor.

Beide Cyclotide haben keinen negativen Einfluss auf die Tumoranreicherung von DOTA-(MC-FA-012)₃, sind jedoch auch nicht in der Lage, die Nierenretention des Trimers signifikant zu reduzieren. Da die verabreichte Menge der FAP-unspezifischen Cyclotide u.U. zu gering war, um eine ausreichend starke Konkurrenz von DOTA-(MC-FA-012)₃ in der Niere zu erzielen, wurde ein weiteres Verdrängungsexperiment durchgeführt. Dabei wurden bis zu 400 µg DOTA-(MC-FA-0116)₃ zeitgleich mit dem radiomarkierten FAP-spezifischen Trimer verabreicht und die Verteilung des Liganden mittels Kleintier-PET analysiert. Wie in Abbildung 4.23 dargestellt ist, kann auch mit einer deutlich höheren Konzentration an unspezifischem Kompetitor keine Reduktion der Nierenakkumulation von DOTA-(MC-FA-012)₃ erreicht werden.

Offenbar ist die erhöhte Nierenretention von DOTA-(MC-FA-012)₃ nicht auf die Bindung an bestimmte Transporterproteine zurückzuführen, sondern hängt mit dem lysosomalen Einschluss des Peptid-Chelator-Komplexes in den proximalen Tubuluszellen zusammen. Dies würde bei einer Anwendung des Tracers in der Endoradiotherapie zu einer hohen renalen Strahlenexposition, insbesondere der strahlensensitiven Glomeruli, führen.

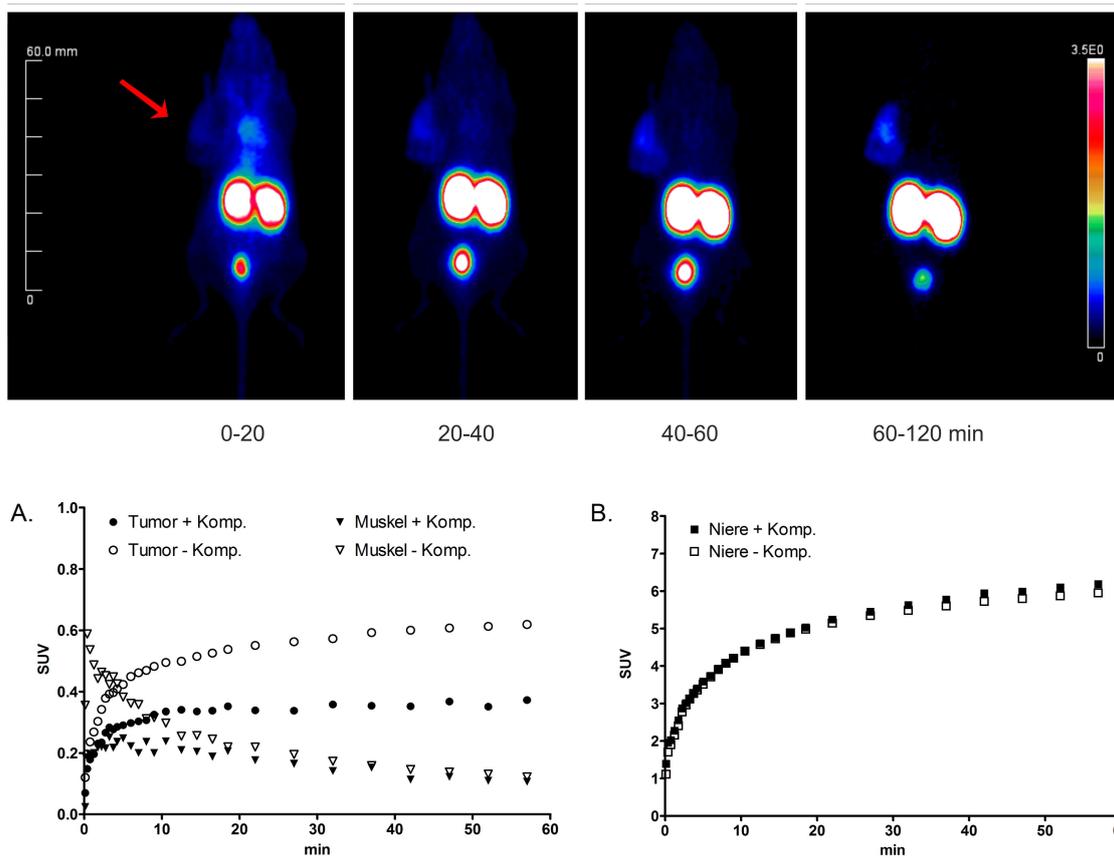


Abbildung 4.23. MIP und SUV-Werte bis zu 140 Minuten nach intravenöser Injektion von DOTA-(MC-FA-012)₃ und 400 µg DOTA-(MC-FA-0116)₃ in tumortragenden Nacktmäusen. Roter Pfeil: CT26-FAP-Tumor.

Auch bei prätherapeutisch normaler Nierenfunktion kann sich nach mehreren PRRT-Zyklen bei bis zu 5 % aller Patienten eine schwere Nierenfunktionsstörung entwickeln. Ist die Nierenfunktion vor Beginn der Therapie schon vermindert, ist eine deutlich höhere Rate anzunehmen. Dies ist aus der Anwendung von mit Yttrium-90 radiomarkierten Somatostatin-Analoga, wie z.B. DOTATOC, für die Endoradiotherapie bereits bekannt^[97-99]. Aus diesem Grund sollten im Hinblick auf einen therapeutischer Einsatz von DOTA-(MC-FA-012)₃ im Rahmen der PRRT weitere Experimente zur Reduktion der Nierenretention durchgeführt werden.

4.3 Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehungen von MC-FA-012

Mit dem Ziel, die Affinität von MC-FA-012 zu seinem Zielprotein FAP zu erhöhen und die Nierenakkumulation durch eine veränderte Pharmakokinetik zu reduzieren, wurden durch gezielte strukturelle Modifikation neun verschiedene Derivate hergestellt. Zum einen wurde das ursprüngliche Bindungsmotiv unverändert in die alternativen Scaffolds SFTI, Min-23 und EETI-II transferiert (*Molecular Grafting*); zum anderen wurde das Bindungsmotiv selbst minimal durch Addition, Subtraktion oder Austausch einer Aminosäure verändert. Die Strukturen der synthetisierten Derivate sind in Tabelle 4.3 zusammengefasst.

Bezeichnung	Sequenz
MC-FA-012	GSGAC PYSNWTPGRGPD CRRDSDCPGRCICRGNGYCG
SF-MCFA012-Y	GRCT PYSNWTPGRGPD CYPD
SF-MCFA012-F	GRCT PFSNWTPGRGPD CYPD
Min-MCFA012-F	L-Nle-RCKQSDCLAGSVCP PFSNWTPGRGPD YCG
EETI-MCFA012	G PYSNWTPGRGPD CKQSDCLAGCVCGPNGFC
MC-FA-012-NH ₂	GSGAC PYSNWTPGRGPD CRRDSDCPGRCICRGNGYCG-NH ₂
MC-FA-012-G	GSGAC PYSNWTPGRGPD CRRDSDCPGRCICRGNGYCGG
MC-FA-012-D	GSGAC PYSNWTPGRGPD CRRDSDCPGRCICRGNGYCD
MC-FA-012-C	GSGAC PYSNWTPGRGPD CRRDSDCPGRCICRGNGYC
MC-FA-012-F7	GSGAC PFSNWTPGRGPD CRRDSDCPGRCICRGNGYCG

Tabelle 4.3. Übersicht der MC-FA-012-Derivate. Das ursprüngliche FAP-spezifische Bindemotiv und die vorgenommenen Modifikationen sind in Fettschrift hervorgehoben.

Die synthetisierten MC-FA-012-Derivate wurden mit Iod-125 radiomarkiert und im Zellbindungsassay hinsichtlich ihrer Bindung an CHO-FAP-Zellen untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.3 dargestellt. Im Gegensatz zur Ausgangsverbindung MC-FA-012, die eine Zellbindung von 5 bis 9%ID nach 60 Minuten zeigt, besitzen die Derivate eine sehr geringe Affinität zum Zielprotein. Obwohl die FAP-Bindesequenz identisch ist, nimmt die Zellbindung bei Integration in ein alternatives Peptidgerüst erheblich ab. Dies gilt sowohl für die kleineren, sterisch weniger anspruchsvollen Scaffolds SFTI und Min-23, als auch für das strukturell stark mit MCoTI-II verwandte Cyclotid EETI-II. Der Einbau der

FAP-spezifischen Peptidsequenz in das EETI-Gerüst resultiert dabei in einem nahezu vollständigen Bindungsverlust (0,3 % ID). Darüber hinaus toleriert auch die FAP-Bindesequenz keine strukturellen Modifikationen; selbst eine minimale Veränderung des FAP-spezifischen Abschnittes resultiert in einem starken Bindungsverlust. So führt allein die Deletion der neutralen Aminosäure Glycin am C-Terminus zu einer Reduktion der Bindung auf 0,9 % ID (MC-FA-012-C). Auch die Substitution der aromatischen Aminosäure Tyrosin durch die strukturell sehr ähnliche Aminosäure Phenylalanin innerhalb der Bindesequenz führt zu einem massiven Einbruch der FAP-Bindung auf 1,5 % (MC-FA-012-F7). Eine wichtige Rolle für die optimale Target-Bindung des Peptids spielt offensichtlich auch die freie Säurefunktion am C-Terminus. Wird diese durch eine Amidfunktion ersetzt, führt dies zu einer deutlich verminderten Bindung von 1,0 % ID (MC-FA-012-NH₂).

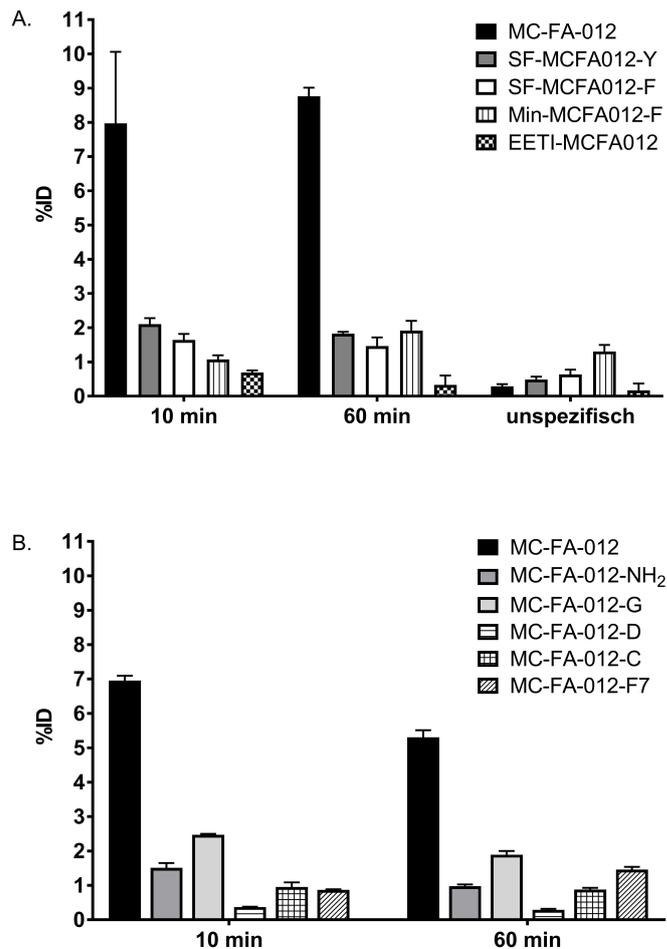


Abbildung 4.24. Bindung der MC-FA-012-Derivate an CHO-FAP-Zellen nach Inkubation für zehn und 60 Minuten bei 37 °C; n=3.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass eine Strukturvariation des FAP-Liganden MC-FA-012 ohne erhebliche Bindungsverluste nicht ohne Weiteres möglich ist. Sowohl das Scaffold als auch die FAP-spezifische Bindesequenz sind für eine ausreichend hohe Zielproteinbindung verantwortlich. Darüberhinaus sind bestimmte funktionelle Gruppen innerhalb der FAP-Bindesequenz essentiell für die Affinität zum Target-Protein. Dazu gehört die freie Säuregruppe am C-Terminus des Moleküls sowie ein unsubstituierter Aromat an siebter Position des Peptids. Selbst eine minimale Veränderung der Konformation des Moleküls resultiert in einem nahezu vollständigen Bindungsverlust.

4.4 Entwicklung neuer FAP-Liganden durch chemische Modifikation eines FAP-Enzyminhibitors

4.4.1 In vitro-Charakterisierung der Leitstrukturen FAPI-01 und -02

Ausgehend von einem hochaffinen, FAP-spezifischen Enzyminhibitor wurde durch gezielte chemische Modifikation der FAP-Ligand FAPI-01 synthetisiert, radioiodiert und im Hinblick auf Affinität und Spezifität zum Zielprotein im Zellbindungsassay charakterisiert. Abbildung 4.25 A zeigt die Bindung der Substanz an unterschiedlichen Zelllinien nach Inkubation für 60 Minuten bei 37 °C.

Während FAPI-01 mit hoher Affinität an humanes FAP bindet ($24,3 \pm 0,86 \%$), ist keine wesentliche Bindung an humanes CD26 erkennbar ($0,05 \pm 0,01 \%$). Auch die Bindung an die FAP-negativen Tumorzelllinien BxPC3, Capan-2, MCF-7 und SK-LMS-1 ist vernachlässigbar klein. Besonders hervorzuheben ist die hohe Internalisierungsrate der Substanz in HT-1080-FAP-Zellen. Bereits zehn Minuten nach Inkubation befinden sich 93 % der gesamten Aktivität innerhalb der Zelle (Abb. 4.25 C). Dies ist für die Entwicklung eines Radiotracers von großem Vorteil, da eine schnelle und effiziente Aufnahme in die Zielzelle bei gleichzeitig geringer unspezifischer Bindung zu einer schnellen Tumoranreicherung und einem geringen Hintergrund führt. Dies resultiert in einem optimalen Bildkontrast, der eine zuverlässige Diagnostik erleichtert und die Strahlenbelastung von gesundem Gewebe minimiert. Auch im Hinblick auf eine mögliche Therapie ist die hohe Internalisierungsrate ein wichtiger Faktor und erlaubt einen schnellen Transport des Therapeutikums in das Zielgewebe, wobei unerwünschte Nebenwirkungen durch eine geringe Bindung an gesundes Gewebe reduziert werden.

Wie in Abbildung 4.25 C dargestellt ist, nimmt die Zellbindung von FAPI-01 bei 37 °C im Verlauf von 24 Stunden kontinuierlich ab. Diese Beobachtung ist auf eine enzymatische Deiodierung des Moleküls bei physiologischer Temperatur zurückzuführen, welche bei radioiodierten Verbindungen häufig auftritt. Die Inkubation des Tracers bei 4 °C resultiert in einer deutlichen Erhöhung der gemessenen Aktivität, die im Verlauf der Zeit weiter ansteigt.

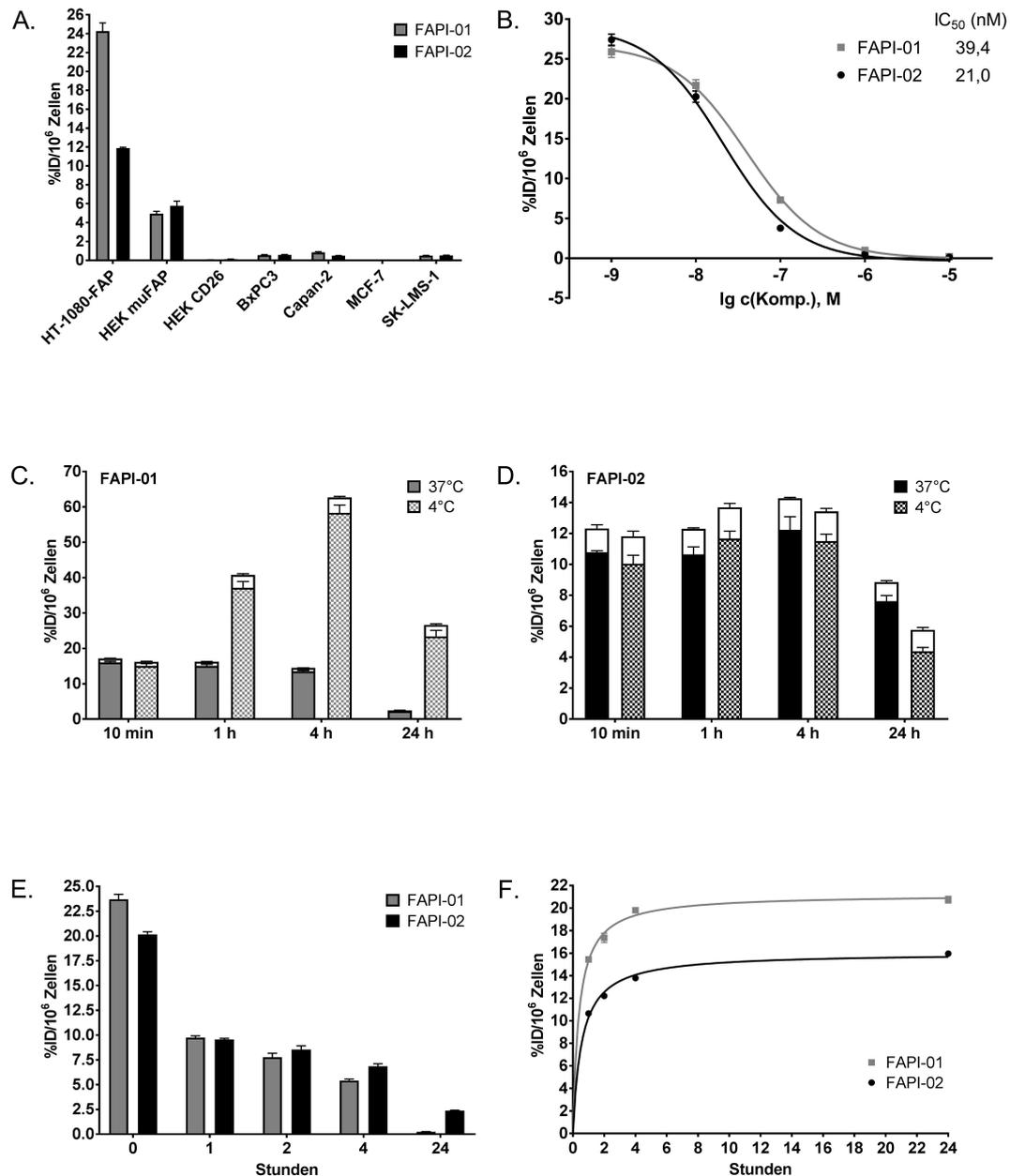


Abbildung 4.25. In vitro-Charakterisierung von FAPI-01 und -02. A. Bindung von FAPI-01 und -02 an verschiedene Zelllinien nach Inkubation für 60 Minuten bei 37°C. B. Konkurrenz der Bindung von radiomarkiertem FAPI-01 und -02 durch steigende Konzentrationen an unmarkierter Substanz an HT-1080-FAP-Zellen. C, D. Internalisierung von FAPI-01 und -02 in HT-1080-FAP-Zellen nach Inkubation für zehn Minuten bis 24 Stunden bei 4 und 37°C; E, F. Zeitabhängige Retention und Efflux von FAPI-01 und -02 aus FAP-positiven HT-1080-Zellen nach Inkubation für 60 Minuten bei 37°C; n=3 für alle Experimente.

Aus diesem Grund wurde das Iod-freie Derivat FAPI-02 entwickelt, bei dem die FAP-affine Chinolin-Grundstruktur mit dem Chelator DOTA fusioniert wurde. Dies ermöglicht die Beladung mit unterschiedlichen Radionukliden und erlaubt je nach Auswahl der Nuklide einen Einsatz als Diagnostikum oder Therapeutikum. Analog zu FAPI-01 besitzt FAPI-02 eine hohe Affinität zu humanem und murinem FAP, bindet jedoch nicht an humanes CD26 oder FAP-negative Tumorzelllinien (Abb. 4.25 A). Aus Konkurrenzexperimenten mit steigenden Konzentrationen an unmarkiertem Ligand lässt sich ein IC_{50} -Wert von 39,4 nM für FAPI-01 und 21,0 nM für FAPI-02 errechnen (Abb. 4.25 B).

FAPI-02 zeigt eine hohe Internalisierungsrate von 88 % nach zehn Minuten und verbleibt deutlich länger in der Zelle als FAPI-01 (Abb. 4.25 D). So sind nach Inkubation für 24 Stunden noch 72 % der nach zehn Minuten gemessenen Aktivität nachweisbar. Die langsamere Elimination von FAPI-02 aus der Zielzelle wird auch in Efflux-Experimenten deutlich sichtbar. Abbildung 4.25 E zeigt die Abnahme der Aktivität beider Liganden im Verlauf von 24 Stunden. Während FAPI-01 nach 24 Stunden bereits nahezu vollständig aus der Zelle eliminiert wurde ($0,25 \pm 0,02 \%$), sind noch 12 % der ursprünglichen Aktivität von FAPI-02 detektierbar.

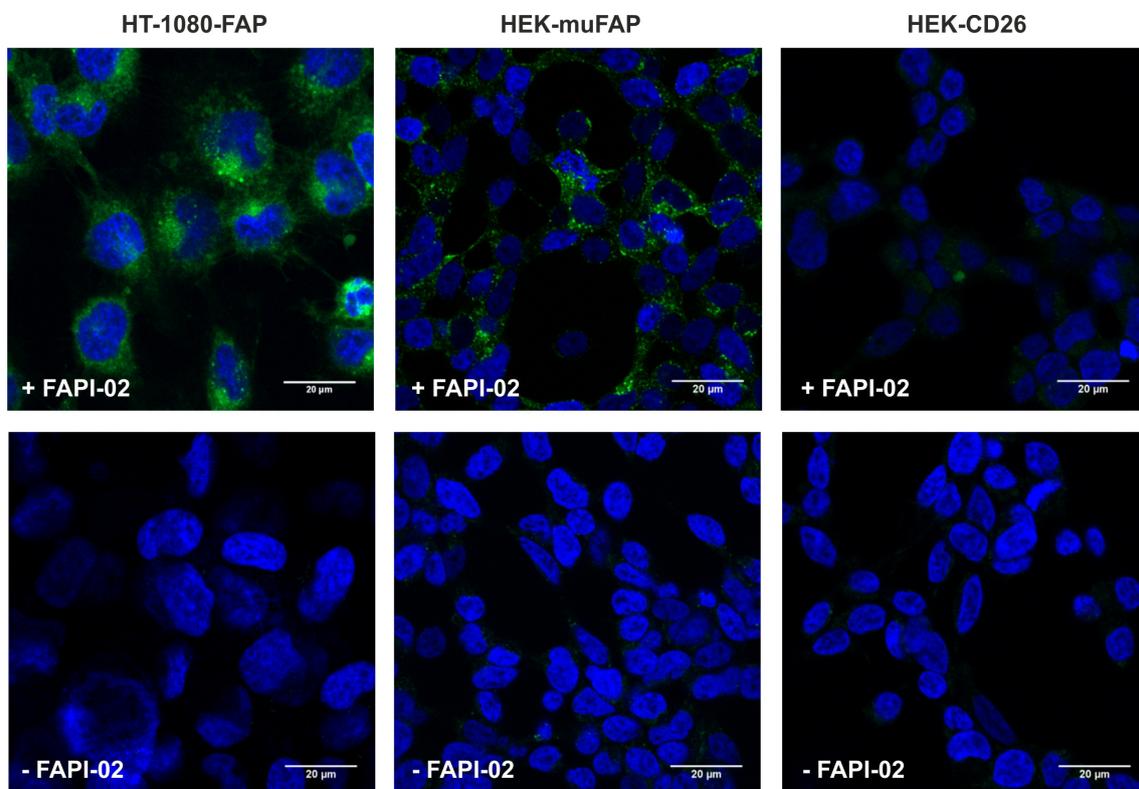


Abbildung 4.26. Internalisierung von FAPI-02 in HT-1080-FAP-, HEK-muFAP und HEK-CD26-Zellen nach Inkubation für 120 Minuten bei 37 °C. Blau: DAPI, grün: FAPI-02-Atto488.

Die nahezu vollständige Internalisierung von FAPI-02 in FAP-exprimierenden Zellen konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie bestätigt werden. Hierfür wurden FAP-positive sowie FAP-negative Zellen zwei Stunden mit dem fluoreszenzmarkierten Derivat FAPI-02-Atto488 inkubiert, anschließend fixiert und mit einem Laser-Scanning-Mikroskop betrachtet. Wie in Abbildung 4.26 zu sehen ist, internalisiert die Substanz nahezu vollständig in Zellen, die humanes oder murines FAP exprimieren. In FAP-negativen CD26-Zellen ist hingegen keine Aufnahme des Tracers erkennbar.

4.4.2 Charakterisierung von FAPI-02 in tumortragenden Nacktmäusen

Bildgebungsstudien mit FAPI-02

Zur Charakterisierung der Pharmakokinetik von FAPI-02 wurde die Substanz mit Gallium-68 radiomarkiert und die Organverteilung mittels Kleintier-PET in tumortragenden Nacktmäusen untersucht. Da die Tumoranreicherung des FAP-spezifischen Liganden stark von der Expression des Zielproteins in der Mikroumgebung des Tumors abhängt, wurden für eine möglichst aussagekräftige Beurteilung des Tracers unterschiedliche Tumormodelle gewählt. Beim HT-1080-FAP-Tumormodell handelt es sich um eine humane Fibrosarkomlinie, die mit humanem FAP transfiziert wurde und das Zielprotein in hoher Menge exprimiert. Im Gegensatz dazu zeigt die humane Glioblastomlinie U87MG selbst nur eine sehr geringe FAP-Expression. Bei den Linien Capan-2 und BxPC3 handelt es sich um humane Pankreaskarzinomlinien, die das Zielprotein nicht exprimieren.

Abbildung 4.27 zeigt die Maximumintensitätsprojektionen sowie die ermittelten durchschnittlichen SUV-Werte bis zu 140 Minuten nach intravenöser Gabe des Tracers in unterschiedlichen Tumormodellen. Bereits nach 20 Minuten ist im FAP-positiven HT-1080-Tumor eine starke Anreicherung des Radiotracer zu sehen, die im weiteren Zeitverlauf stetig zunimmt (SUV 0,51 nach einer Stunde). Ähnlich verhält es sich im U87MG-Modell, bei dem eine kontinuierliche Tumoraufnahme des Tracers mit einem mittleren SUV-Wert von 0,67 nach einer Stunde zu beobachten ist. Auch im FAP-negativen Capan-2-Tumor erfolgt eine rasche Traceranreicherung, die ihr Maximum jedoch nach 15 Minuten erreicht (SUV 0,46) und anschließend leicht abnimmt (SUV 0,38 nach einer Stunde). Eine andere Pharmakokinetik ist im BxPC3-Modell zu sehen. Hier erfolgt eine schnelle Tumoranreicherung mit einem durchschnittlichen SUV-Wert von 0,34 nach zwei Minuten, die im weiteren Zeitverlauf kontinuierlich abnimmt (SUV 0,16 nach einer Stunde).

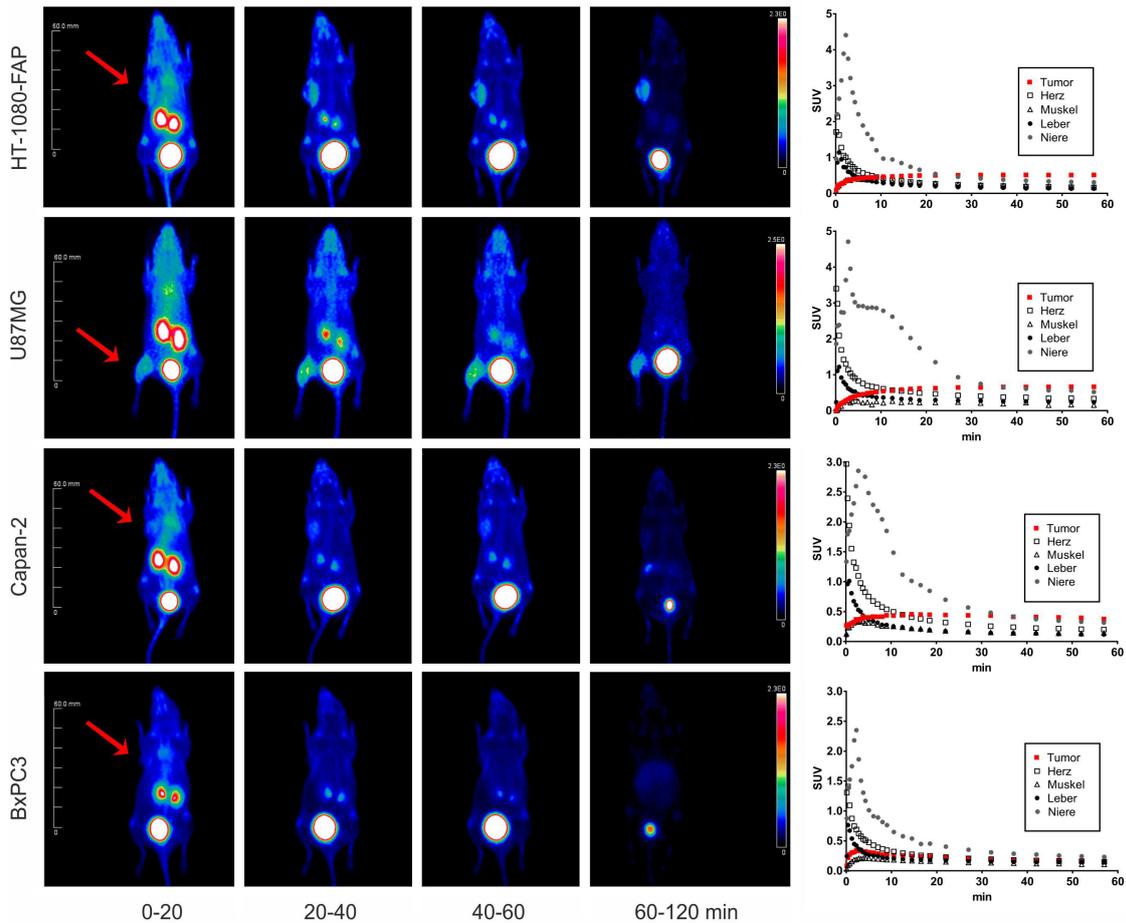


Abbildung 4.27. Maximumintensitätsprojektionen und SUV-Werte nach intravenöser Gabe von ^{68}Ga -FAPI-02 und Analyse mittels Kleintier-PET. Es wurden die FAP-positiven Tumormodelle HT-1080-FAP und U87MG, sowie die FAP-negativen Tumormodelle Capan-2 und BxPC3 verwendet; $n=1$. Der Tumor ist mit einem roten Pfeil gekennzeichnet.

Generell wurden in allen vier Tumormodellen nur sehr geringe Aktivitäten in den Organen gemessen. Die Ausscheidung von FAPI-02 aus dem Organismus erfolgt sehr schnell und primär renal. Dabei ist die gemessene Aktivität in der Niere innerhalb der ersten zehn Minuten nach Injektion am höchsten und nimmt im weiteren Zeitverlauf stark ab. So zeigt sich in HT-1080-FAP xenotransplantierten Mäusen die höchste Nierenaktivität bereits nach zwei Minuten (SUV 4,4) und beträgt nach 12 Minuten nur noch etwa ein Fünftel (SUV 0,9). Nach einer Stunde ist nahezu keine renale Aktivität mehr nachweisbar (SUV 0,3). Gleichzeitig nimmt die gemessene Aktivität in der Blase kontinuierlich zu. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass das stark hydrophile Molekül nach rascher glomerulärer Filtration im Tubulus kaum rückresorbiert wird. Die schnelle Clearance aus dem Blut lässt darauf schließen, dass FAPI-02 eine sehr geringe Bindung an Plasmaproteine, wie z.B. Albumin, besitzt. Eine weitere Ursache für die schnelle renale Elimination könnte in einer aktiven

tubulären Sekretion des Tracers liegen, ähnlich wie es z.B. bei der Elimination von Penicillinen der Fall ist^[100,101]. Die SUV-Werte für alle vier Tumormodelle sind im Anhang in den Tabellen 5.24, 5.25, 5.26 und 5.27 aufgeführt.

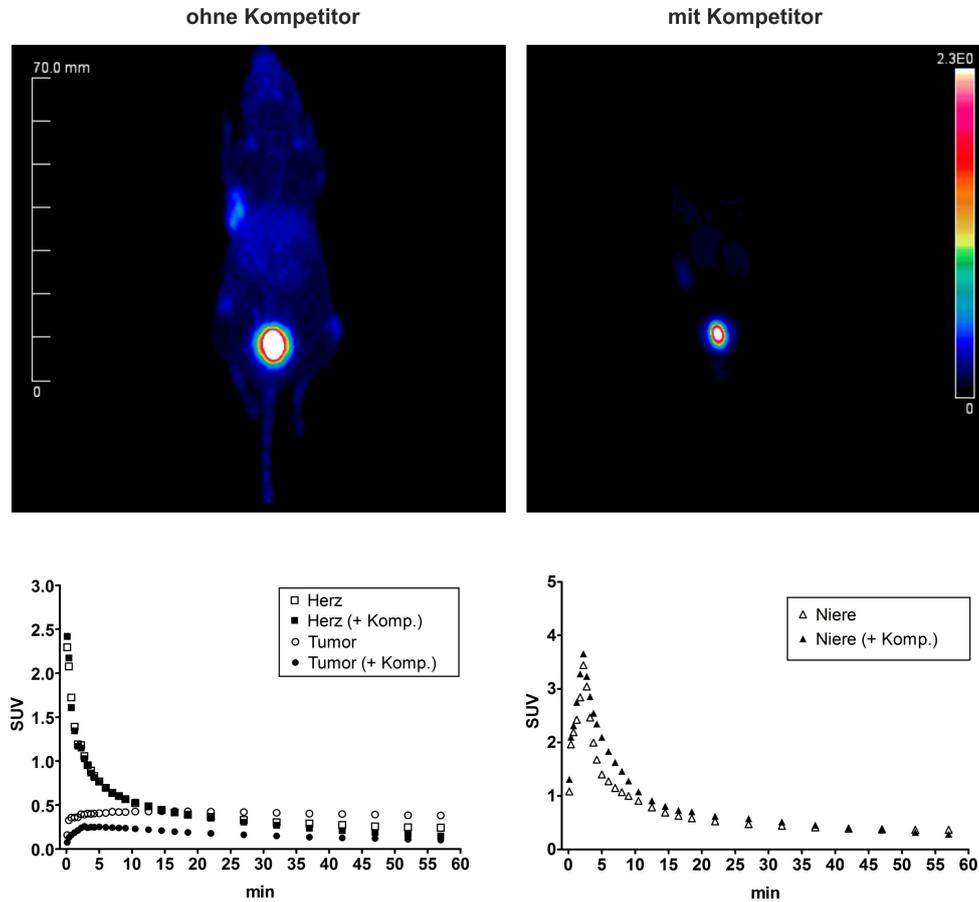


Abbildung 4.28. Maximumintensitätsprojektionen und SUV-Werte nach intravenöser Injektion von ⁶⁸Ga-FAPI-02 in HT-1080-FAP-tumortragenden Mäusen mit und ohne gleichzeitiger Injektion von unmarkierter Substanz als Kompetitor; n=1.

Um die Bindungsspezifität von FAPI-02 zu seinem Zielprotein *in vivo* zu untersuchen, wurde der radiomarkierte Tracer gleichzeitig mit 30 nmol des unmarkierten Liganden verabreicht, wodurch die spezifische Aktivität des Tracers von 80 nmol/GBq auf 2,5 nmol/GBq reduziert wurde. Wie in Abbildung 4.28 zu sehen ist, führt die simultane Gabe des unmarkierten Liganden zu einer kompetitiven Verdrängung des Radiotracers und damit zu einer deutlichen Reduktion der Tumoranreicherung. Im Gegensatz dazu sind die gemessenen Aktivitäten in anderen Organen, wie dem Herzen oder der Niere, unverändert. Diese Beobachtung zeigt, dass die Tumoranreicherung von FAPI-02 auf eine spezifische Bindung an FAP zurückzuführen ist und verdeutlicht, dass eine ausreichend hohe spezifische Aktivität des Radiotracers entscheidend für eine substantielle Tumoranreicherung ist.

Bioverteilung von FAPI-02 in tumortragenden Nacktmäusen

Zur quantitativen Beurteilung der Bioverteilung *in vivo* wurde FAPI-02 mit Lutetium-177 radiomarkiert und in tumortragenden Nacktmäusen untersucht. Hierzu wurden die zu untersuchenden Organe jeweils eine, vier und 24 Stunden nach Injektion des Tracers entnommen und die Aktivitäten im Gammacounter bestimmt. Analog den Bildgebungsstudien wurde die FAP-positive Tumormlinie HT-1080-FAP sowie die FAP-negativen Linien U87MG und Capan-2 verwendet.

Entsprechend den Ergebnissen aus der Bildgebung ist bereits eine Stunde nach Injektion des Tracers eine signifikante Tumoranreicherung in allen drei Tumormodellen erkennbar (Abb. 4.29). Dabei ist die gemessene Aktivität im U87MG-Modell mit $8,52 \pm 2,05$ %ID etwa doppelt so hoch wie im HT-1080-FAP- bzw. Capan-2-Modell ($4,51 \pm 0,82$ bzw. $3,82 \pm 0,39$ %ID). In allen drei Modellen nimmt die gemessene Tumoraktivität im Verlauf von 24 Stunden deutlich ab, wobei der geringste Efflux im HT-1080-FAP-Modell zu beobachten ist. Hier sind nach 24 Stunden noch 25 % der Aktivität nach einer Stunde vorhanden. Im Gegensatz dazu können in den Tumormodellen mit der geringeren FAP-Expression nur noch 0,1 % der ursprünglichen Aktivität nachgewiesen werden. Erneut sind die gemessenen Aktivitäten im Blut sowie in allen untersuchten Organen in allen Tumormodellen äußerst gering. Die Anreicherungswerte sind im Anhang in den Tabellen 5.32, 5.33 und 5.34 angegeben.

Die Ergebnisse aus den Tierstudien zeigen, dass FAPI-02 nach intravenöser Injektion bereits nach wenigen Minuten in FAP-positive Tumore aufgenommen und im Verlauf der ersten Stunde kontinuierlich angereichert wird. Dabei erfolgt die Bindung FAP-spezifisch und lässt sich durch eine Erhöhung der Precursormenge vollständig kompetitieren. Der Radiotracer zeigt eine sehr geringe Verteilung in allen untersuchten Organen und wird rasch aus dem Organismus eliminiert, wobei die Ausscheidung primär renal erfolgt. FAPI-02 akkumuliert nicht nur in Tumoren, die humanes FAP exprimieren, sondern zeigt auch eine starke Anreicherung in ursprünglich FAP-negativen Xenotransplantaten. Dies ist auf eine Bindung des Liganden an murines FAP zurückzuführen, welches durch die Rekrutierung und Aktivierung der mauseigenen CAFs im Tumorstroma vorhanden ist. Da die Menge des murinen Proteins in den jeweiligen Tumormodellen deutlich geringer ist als die Anzahl der humanen FAP-Moleküle in der HT-1080-Transfektante, ist auch die Tumoranreicherung des FAP-spezifischen Radiotracers entsprechend schwächer.

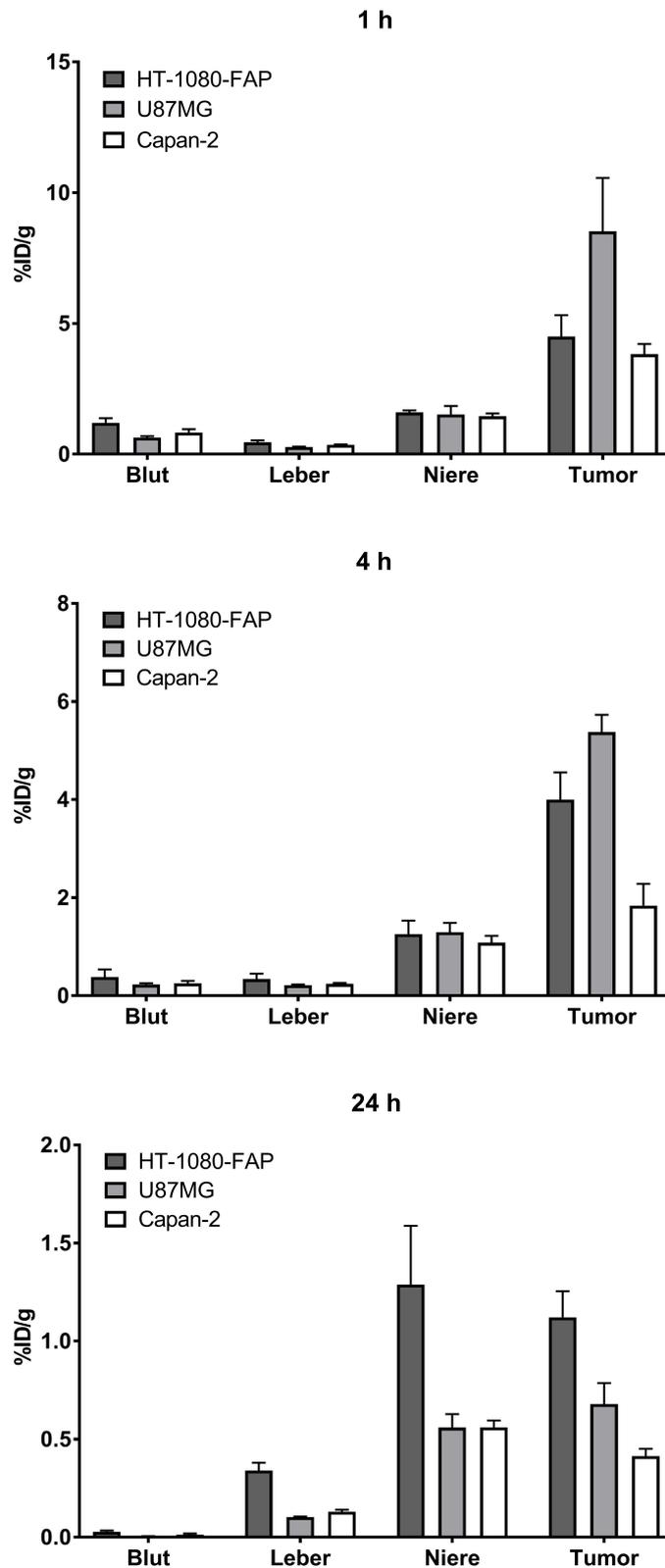


Abbildung 4.29. Bioverteilung von FAPI-02 in HT-1080-FAP-, U87MG- und Capan-2-tumortragenden Mäusen eine, vier und 24 Stunden nach Injektion des Tracers; n=3.

Dieser Zusammenhang ist für alle zielgerichteten Moleküle von Bedeutung, deren Anwendung nur zielführend ist, wenn das adressierte Protein in ausreichend hoher Konzentration vorhanden ist. Demgemäß eignet sich das Capan-2-Tumormodell deutlich besser für die Reflexion der klinischen Situation als die gentechnisch modifizierte Zelllinie HT-1080-FAP, die sich durch eine artifiziell hohe Proteinexpression auszeichnet.

Der Vorteil von FAPI-02 besteht darin, dass es als theranostische Verbindung sowohl als Diagnostikum als auch als Therapeutikum einsetzbar ist. Dies ermöglicht eine einfache Stratifizierung des Patientenkollektivs, für das eine zielgerichtete therapeutische Behandlung sinnvoll ist. Damit ist FAPI-02 ideal für die Kombination mit diagnostisch verwendeten Radionukliden, wie Gallium-68 oder Indium-111 geeignet. Im Hinblick auf einen potentiellen Einsatz als Therapeutikum stellt der verhältnismäßig schnelle Efflux der Substanz aus dem Tumor einen limitierenden Faktor dar. Um eine effektive Strahlendosis zu gewährleisten, sollte die Verweildauer im Tumor folglich deutlich verlängert werden.

Überraschend an den Ergebnissen der Bioverteilungsstudie ist die höhere Tumoranreicherung von FAPI-02 in U87MG-transplantierten Mäusen im Vergleich zu HT-1080-FAP-Tieren. So sind eine Stunde nach Tracerinjektion bereits $8,52 \pm 2,05$ %ID/g im Tumor nachweisbar, während es im HT-1080-FAP-Tumor lediglich $4,51 \pm 0,82$ %ID/g sind. Auch nach vier Stunden ist im U87MG-Tumor eine höhere Aktivität von $5,38 \pm 0,35$ %ID/g messbar (HT-1080-FAP $4,00 \pm 0,56$ %ID/g). Während die HT-1080-FAP-Transfektante das Zielprotein in großer Menge ausbildet, weisen U87MG-Zellen per se nur eine sehr geringe FAP-Expression auf, so dass in diesem Modell eine deutlich schwächere Anreicherung von FAPI-02 zu erwarten wäre. Die gleichwohl höhere Traceraufnahme im U87MG-Tumor muss demnach mit einer vermehrten Rekrutierung von murinen Zellen, die endogenes FAP exprimieren, zusammenhängen. Ähnliche Beobachtungen wurden in vorangegangenen Arbeiten mehrfach beschrieben. So konnte in U87- sowie U138-xenotransplantierten Mäusen eine erhöhte endogene FAP-Expression gezeigt werden^[102]. Auch in Gewebeproben aus humanen Glioblastomen wurde die grundsätzliche Präsenz mesenchymaler Zellen, die charakteristische CAF-Marker aufweisen, nachgewiesen^[103]. Busek *et al.* zeigten ferner eine erhöhte FAP-Expression in hochgradigen Glioblastomen, v.a. in mesenchymalen Subtypen. Dabei wurde das Membranprotein sowohl in den Tumor- als auch in den Stromazellen nachgewiesen, wobei letztere häufig um dysplastische Blutgefäße herum angeordnet waren und mesenchymale Marker exprimierten.

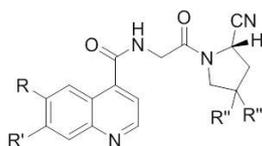
Interessanterweise war in niedriggradigen Hirntumoren keine FAP-Expression zu erkennen, so dass das Protein als Marker für hochgradige Glioblastome angesehen werden kann. Demzufolge könnte FAPI-02 für die Differenzierung der verschiedenen Stadien humaner Glioblastome eingesetzt werden und als spezifischer Tracer für die aggressivste Form der Hirntumoren Bedeutung finden.

4.4.3 In vitro-Charakterisierung der FAPI-Derivate FAPI-03 bis -15

Mit dem Ziel, die Tumorretentionszeit des Tracers für einen möglichen Einsatz als Endoradiotherapeutikum zu erhöhen, wurde durch gezielte chemische Modifikation eine Reihe von FAPI-Derivaten entwickelt. Dabei wurde insbesondere der Linker zwischen DOTA und der FAP-affinen Chinolinstruktur variiert. Zusätzlich wurden Derivate hergestellt, bei denen zwei Wasserstoff-Atome des Pyrrolidin-Rings durch Fluor-Atome substituiert wurden. Dadurch wird die Lipophilie der resultierenden Verbindungen erhöht, was zu einer längeren Verweilzeit in den Zielzellen führen soll. Zudem wurde eines der FAPI-Derivate, FAPI-10, an eine sogenannte NLS-Sequenz (*Nuclear Localization Signal*) gekoppelt. Dabei handelt es sich um das Signalpeptid des Protoonkogens c-myc, welches den gezielten Transport des Proteins in den Zellkern ermöglicht. Diese Strategie beruht auf der Idee, dass FAPI-10 nach erfolgter FAP-vermittelter Internalisierung in die Zielzelle durch die Kernlokalisierungssequenz in den Zellkern transportiert wird und so deutlich länger im Zellinneren verbleibt. Eine Übersicht der hergestellten Derivate ist in Tabelle 4.4 gegeben.

Zur Charakterisierung der Bindungs- und Internalisierungseigenschaften der FAPI-Derivate FAPI-03 bis -15 wurden die Verbindungen mit Lutetium-177 markiert und im Zellbindungsassay auf HT-1080-FAP-Zellen untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.30 zusammengefasst. Dargestellt ist jeweils die prozentuale Bindung und Internalisierung relativ zur Leitstruktur FAPI-02.

Alle Tracer zeigen eine nahezu vollständige Internalisierung mit Werten über 90 %. Aufgrund der geringen Gesamtbindung nach 24 Stunden wurden die Derivate FAPI-06, -07, -08 und -09 von der weitergehenden Charakterisierung ausgeschlossen. Obwohl FAPI-03, -11 und -12 nach 24 Stunden eine höhere Zellbindung zeigten als FAPI-02, wurden die Verbindungen aufgrund ihrer unzureichenden Bindung nach einer und vier Stunden ebenfalls verworfen.



Name	R	R'	R''	EC ₅₀ [nM]
FAPI-02		H	H	21
FAPI-03		H	H	n.d.
FAPI-04		H	F	6.5
FAPI-05		H	F	17
FAPI-06		H	H	n.d.
FAPI-07		H	F	n.d.
FAPI-08	H		H	n.d.
FAPI-09	H		F	n.d.
FAPI-10	H-PAAKRVKLDK [*] C ^{**} -OH	H	H	21
FAPI-11		H	F	n.d.
FAPI-12		H	F	n.d.
FAPI-13		H	F	4.5
FAPI-14		H	F	n.d.
FAPI-15		H	F	9.1

Tabelle 4.4. Übersicht der FAPI-Derivate -02 bis -15

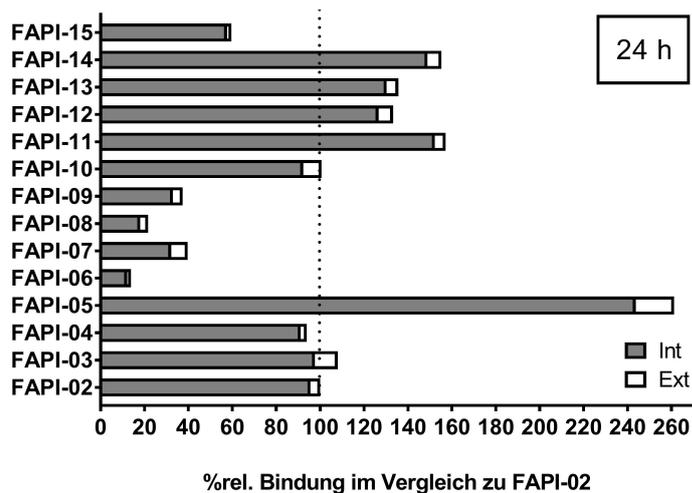
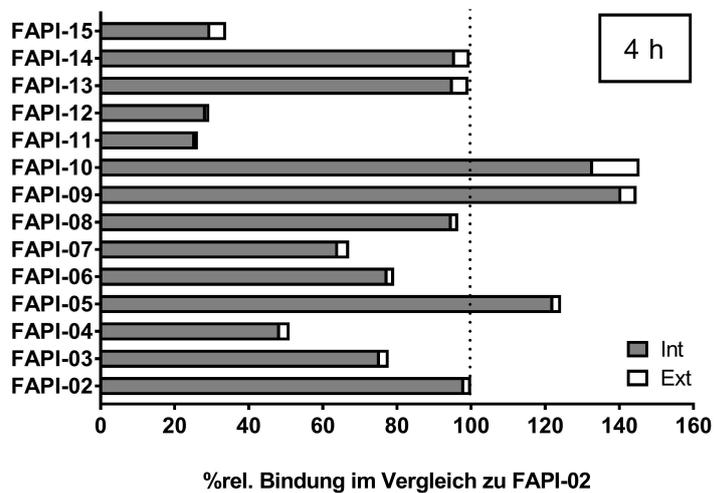
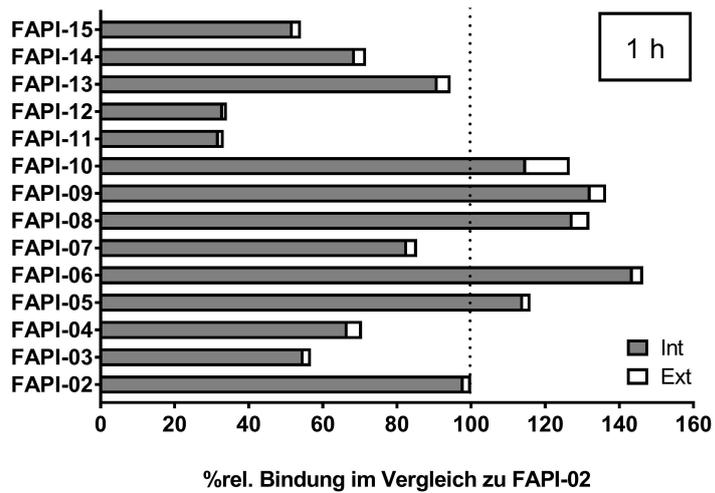


Abbildung 4.30. Relative Bindung und Internalisierung der Derivate FAPI-03 bis -15 an HT-1080-FAP-Zellen im Vergleich zu FAPI-02 nach Inkubation für eine, vier und 24 Stunden bei 37 °C. Int: internalisierter Anteil; Ext: extrazellulär gebundene Fraktion; n=3.

Zur Charakterisierung der Bindungsspezifität zum Zielprotein wurden die verbleibenden Derivate im Bindungsassay an murinem FAP und CD26 untersucht (Abb. 4.31). Hierbei zeigten alle untersuchten Derivate mit 18 bis 31 %ID eine starke Bindung an murines FAP und eine sehr geringe Affinität zu CD26. Mit einem Bindungswert von 0,04 % hatte FAPI-04 die geringste CD26-Bindung und damit die höchste Spezifität zum Zielprotein. Dieses Ergebnis wurde in einem Konkurrenzexperiment bestätigt, in dem FAPI-04 mit einem IC_{50} -Wert von 6,5 nM eine deutlich höhere FAP-Spezifität zeigte als FAPI-02 (Abb. 4.32 A). Ähnliche Werte erzielten auch FAPI-13 (4,5 nM) und FAPI-15 (9,1 nM).

Weiterhin wurden die FAPI-Derivate bezüglich ihrer Verweildauer in FAP-positiven Zellen untersucht. Wie in Abbildung 4.32 B zu sehen ist, werden FAPI-04 und -05 mit einer effektiven Halbwertszeit von 3,0 bzw. 2,8 Stunden deutlich langsamer aus den Zellen ausgeschieden als FAPI-02 (1,7 Stunden). Auch die FAPI-Derivate -13, -14 und -15 verbleiben deutlich länger in den Zellen; aufgrund der nahezu linearen Eliminationskinetik in den ersten 24 Stunden kann für diese Verbindungen allerdings keine aussagekräftige Halbwertszeit berechnet werden.

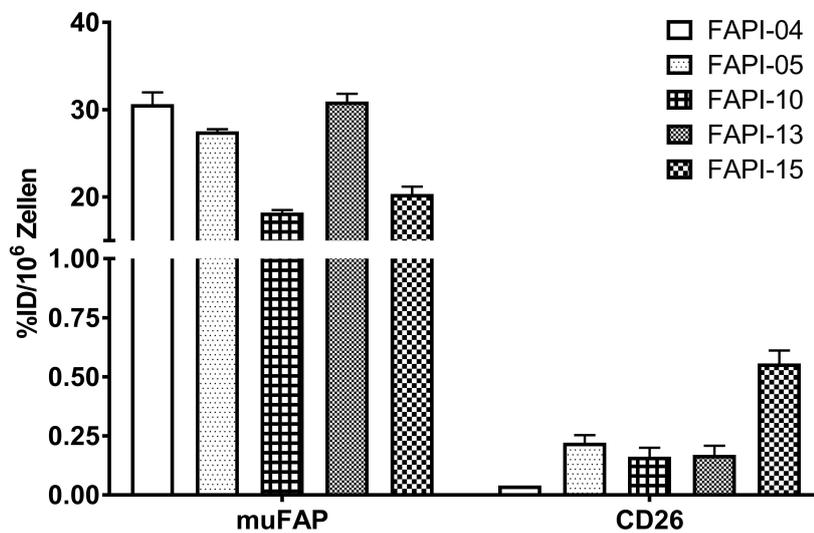


Abbildung 4.31. Bindung ausgewählter FAPI-Derivate an HEK-muFAP- und HEK-CD26-Zellen nach Inkubation für eine Stunde bei 37 °C; n=3.

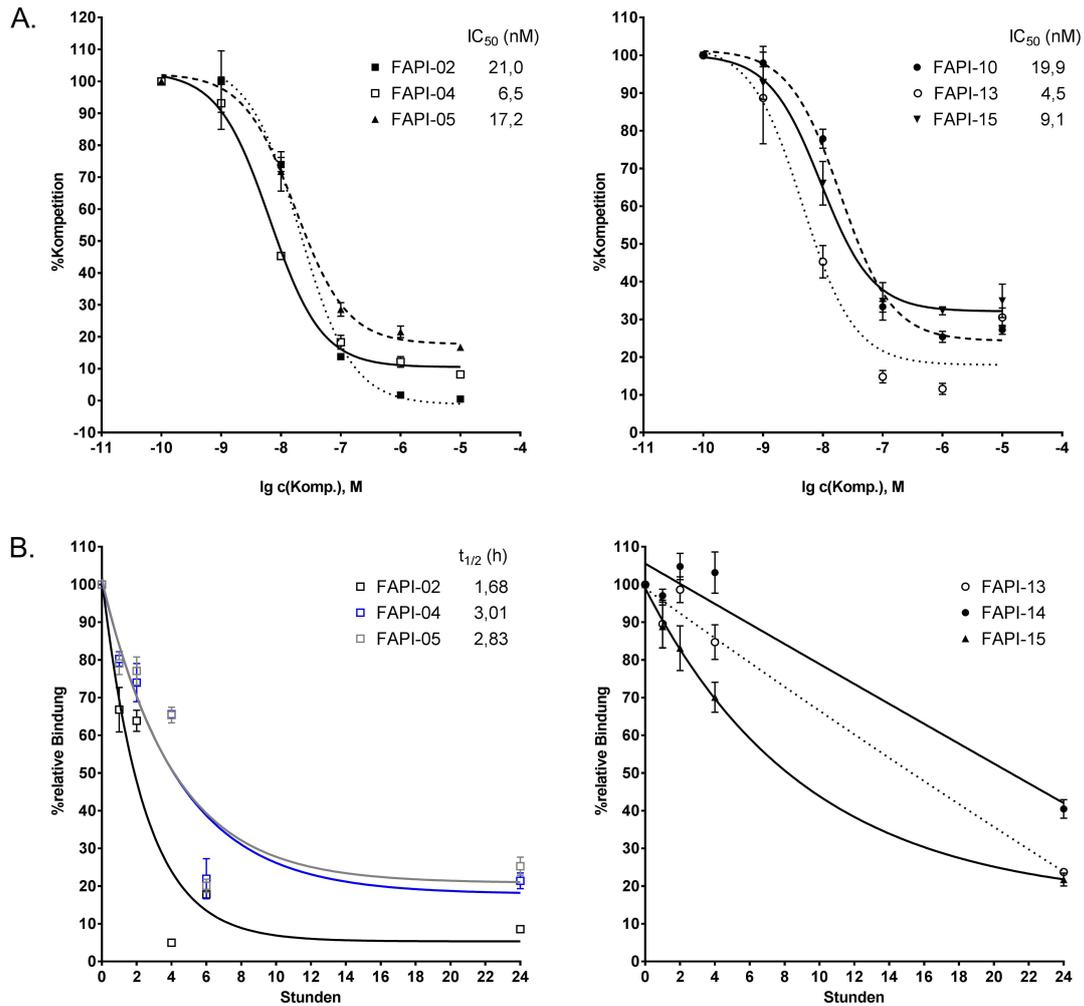


Abbildung 4.32. A. Konkurrenz ausgewählter FAPI-Derivate durch Zugabe steigender Konzentrationen an unmarkierter Substanz; Inkubation auf HT-1080-Zellen für eine Stunde bei 37 °C. B. Zeitabhängiger Efflux der FAPI-Derivate aus FAP-positiven HT-1080-Zellen nach Inkubation für 60 Minuten bei 37 °C; n=3 für alle Experimente.

4.4.4 In vivo-Charakterisierung von FAPI-03 bis -15

Bioverteilung ausgewählter FAPI-Derivate in tumortragenden Nacktmäusen

Aufgrund ihrer vorteilhaften Bindungseigenschaften *in vitro* wurden die FAPI-Derivate -04, -05, -10, -13 und -15 zur Charakterisierung der Pharmakokinetik in tumortragenden Nacktmäusen untersucht. Die Ergebnisse der Bioverteilungsstudie sind in Abbildung 4.33 zusammengefasst. Bereits nach einer Stunde ist für alle FAP-Liganden eine hohe Tumoraufnahme bei geringer Aktivität in allen untersuchten Organen zu erkennen, was in einem günstigen Tumor-Gewebe-Verhältnis resultiert (siehe Anhang Abb. 5.1). Im Gegensatz zu FAPI-02 ist die gemessene Tumoraktivität bei den meisten Derivaten nach vier Stunden

höher als nach einer Stunde, was für eine langsamere Ausscheidung der Tracer aus dem Tumorgewebe spricht. Betrachtet man die Tumoraufnahme der Verbindungen im direkten Vergleich, so sind nach einer Stunde keine signifikanten Unterschiede zu erkennen (Abb. 4.34). Zu späteren Zeitwerten jedoch zeigen insbesondere die Derivate FAPI-04, -05 und -13 einen deutlich höheren Tumor-Uptake als ihre Leitstruktur. Nach 24 Stunden können im Falle von FAPI-04 und -13 noch 61 % bzw. 76 % der gemessenen Aktivität nach einer Stunde nachgewiesen werden, während bei FAPI-02 lediglich knapp 25 % der ursprünglich gemessenen Aktivität detektierbar sind.

Um einen Vergleich der gesamten Tumoraktivität im Verlauf von 24 Stunden zu ermöglichen, wurde analog der Bestimmung der Bioverfügbarkeit die Fläche unter der Kurve (*Area Under Curve*, AUC) für die einzelnen FAPI-Derivate errechnet. Wie Tabelle 4.5 zu entnehmen ist, ergeben sich für alle Derivate höhere AUC-Werte als für FAPI-02, wobei die größte Differenz bei FAPI-05 und -13 zu sehen ist. Die gemessenen Aktivitäten im Blut sowie in den Organen sind bei allen Derivaten zu allen Zeitpunkten minimal. Eine Ausnahme stellt die Verbindung FAPI-10 dar, für welche bereits nach einer Stunde eine stark erhöhte Nierenaktivität zu beobachten ist ($10,46 \pm 1,50$ %ID/g), die auch im Verlauf von 24 Stunden nur geringfügig abnimmt ($6,70 \pm 0,65$ %ID/g). Diese Beobachtung ist auf eine erhöhte Nierenretention des Tracers aufgrund der peptidischen Kernlokalisierungssequenz zurückzuführen. Dabei bedingt die Lysin-reiche Signalsequenz vermutlich einen lysosomalen Einschluss des Tracers in den proximalen Tubuluszellen der Niere, was die renale Ausscheidung des Tracers erschwert (siehe Abschnitt 4.2.4).

Derivat	AUC
FAPI-02	64,0
FAPI-04	99,4
FAPI-05	103,3
FAPI-10	49,3
FAPI-13	157,5
FAPI-15	68,0

Tabelle 4.5. AUC-Werte ausgewählter FAPI-Derivate

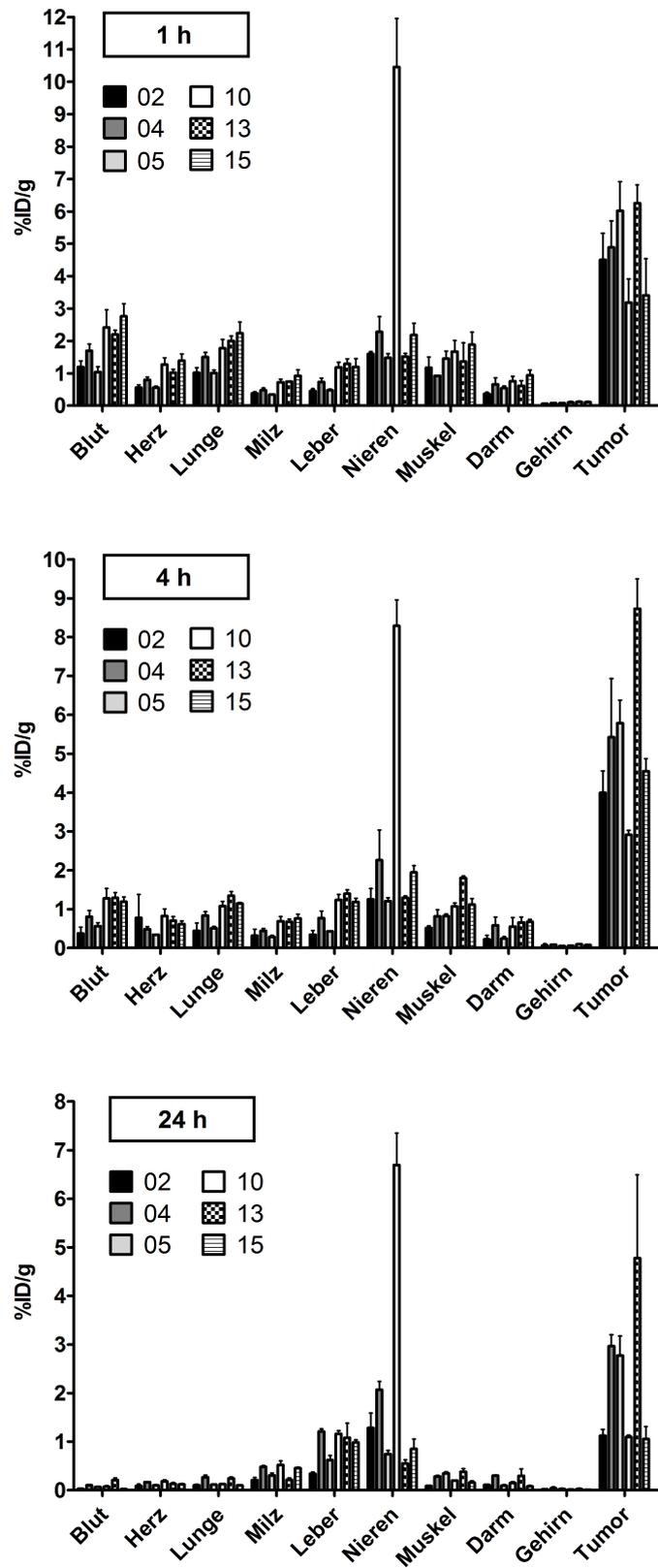


Abbildung 4.33. A-C. Bioverteilung ausgewählter FAPI-Derivate in HT-1080-FAP-tumortragenden Mäusen nach einer, vier und 24 Stunden; n=3.

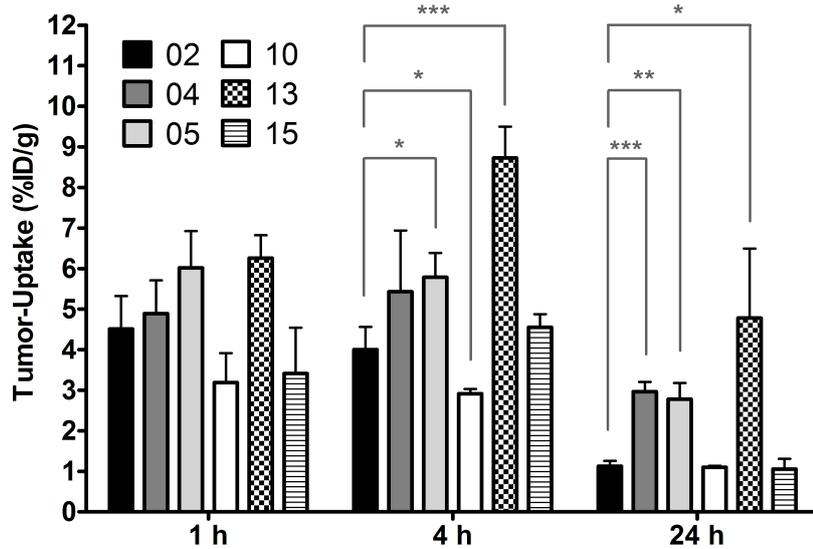


Abbildung 4.34. Tumoranreicherung der untersuchten FAPI-Derivate nach einer, vier und 24 Stunden in HT-1080-FAP-tumortragenden Mäusen; n=3.

Bildgebungsstudien mit ausgewählten FAPI-Derivaten

Aufgrund der hohen Tumoranreicherung von FAPI-04, -13 und -15 in den Bioverteilungsstudien wurden die Substanzen im Hinblick auf eine mögliche Anwendung als Radiotracer im Kleintier-PET untersucht. Abbildung 4.35 zeigt die Verteilung von ^{68}Ga -FAPI-04 bis zu 140 Minuten nach Tracerinjektion in tumortragenden Nacktmäusen. Hierbei wurde sowohl das FAP-positive Tumormodell HT-1080-FAP, als auch das FAP-negative Modell SK-LMS-1 verwendet. In beiden Fällen ist eine rasche Akkumulation von FAPI-04 im Tumor zu erkennen, die bis zu 140 Minuten nach Injektion konstant bleibt. Dabei wird die Substanz schnell aus dem Blut aufgenommen, was in einem hohen Bildkontrast resultiert. Die renale Elimination des Tracers erfolgt ebenfalls rasch und kontinuierlich.

Abbildung 4.36 zeigt die Bioverteilung von ^{68}Ga -FAPI-13 und -15 in HT-1080-FAP-tumortragenden Tieren. Die Tumoranreicherung beider Substanzen ist deutlich geringer und die gemessene Aktivität in Leber und Muskel geringfügig höher als im Falle von FAPI-04, was in einem schlechteren Bildkontrast resultiert. FAPI-15 zeigt nach einer Stunde zudem eine deutlich höhere Nierenretention als die übrigen Derivate (Abb. 4.37). Dies ist durch den Triethylglykol-Spacer zu erklären, der anstelle der 1,3-Propyleinheit im Molekül eingefügt wurde. Die Konjugation von biopharmazeutischen Molekülen mit Polyethylenglykol-Ketten (PEGylierung) ist eine gängige Methode um die pharmakokinetischen Eigenschaften dieser Wirkstoffe zu beeinflussen.

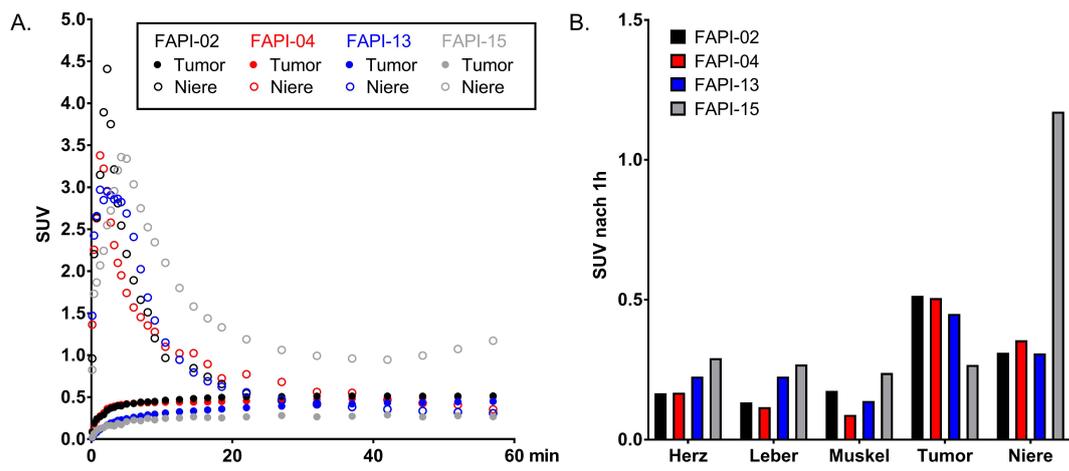


Abbildung 4.37. SUV-Werte nach intravenöser Gabe von ⁶⁸Ga-FAPI-02, -04, -13 und -15 in HT-1080-FAP-tumortragenden Nacktmäusen; n=1.

4.4.5 Klinische Evaluierung von FAPI-02 und -04

Aufgrund der vielversprechenden Daten aus den Tierversuchen wurden die mit Gallium-68 markierten Derivate FAPI-02 und FAPI-04 in ersten klinischen Bildgebungsstudien an Patienten mit diversen Tumorentitäten untersucht. Um eine ausreichend hohe Stabilität der Tracer zu gewährleisten, wurde vor dem ersten klinischen Einsatz der Substanzen eine Stabilitätsanalyse in humanem Serum durchgeführt. Dabei konnte auch nach Inkubation für 24 Stunden keine Zersetzung der Radiotracer beobachtet werden (Abb. 4.38).

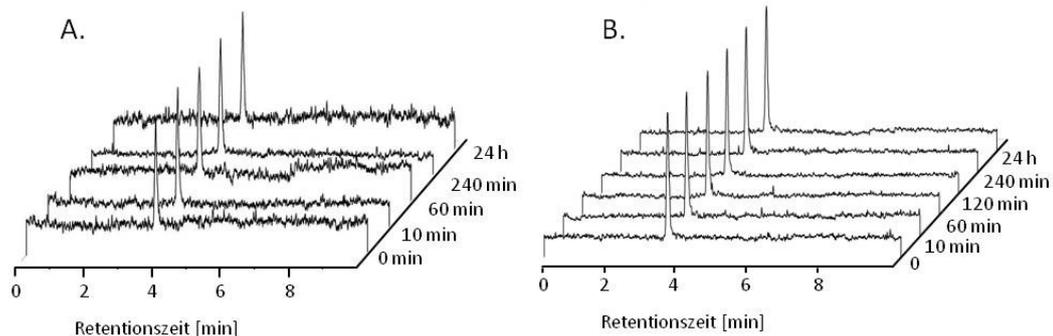


Abbildung 4.38. HPLC-Analyse der Stabilität von radiomarkiertem FAPI-02 und -04 in humanem Serum nach Inkubation für zehn Minuten bis 24 Stunden.

Die Anwendung der Radiotracer erfolgte gemäß §13.2 des deutschen Arzneimittelgesetzes (Anwendung radioaktiver Stoffe zu medizinischen Zwecken). Alle Patienten hatten vor Einschluss in die Untersuchung bereits eine klinisch etablierte antitumorale Behandlung

erhalten, die die weitere Tumorprogression oder -metastasierung jedoch nicht verhindern konnte. Hierzu zählen neben der konventionellen Chemotherapie auch die lokale Strahlentherapie sowie die Behandlung mit ggf. vorhandenen zielgerichteten Therapeutika (z.B. Tyrosinkinaseinhibitoren). Weiterhin wurden zunächst nur Patienten mit stromareichen Tumorarten untersucht, welche das Zielprotein mit hoher Wahrscheinlichkeit exprimieren. Die Bioverteilung der beiden Tracer wurde jeweils zehn Minuten, eine und drei Stunden nach Injektion mittels kombinierter PET/CT untersucht. Die rekonstruierten Maximumintensitätsprojektionen sind für eine Auswahl von Patienten in den Abbildungen 4.39 bis 4.46 zusammengefasst.

Bei allen untersuchten Patienten zeigte sich eine schnelle Anreicherung der Tracer im Primärtumor sowie in Weichteil-, Lymphknoten- und Knochenmetastasen. Bereits zehn Minuten nach intravenöser Injektion von FAPI-02 zeigen die PET-Aufnahmen einer Brustkrebs-Patientin mit multiplen Knochenmetastasen eine starke Anreicherung des Tracers in den metastatischen Läsionen im Sternum, den Rippen und in mehreren Brustwirbelkörpern sowie in betroffenen Lymphknoten (Abb. 4.39), die auch nach drei Stunden nur geringfügig abnimmt. In den gesunden Organen sind während des gesamten Untersuchungszeitraums lediglich minimale Aktivitäten messbar.

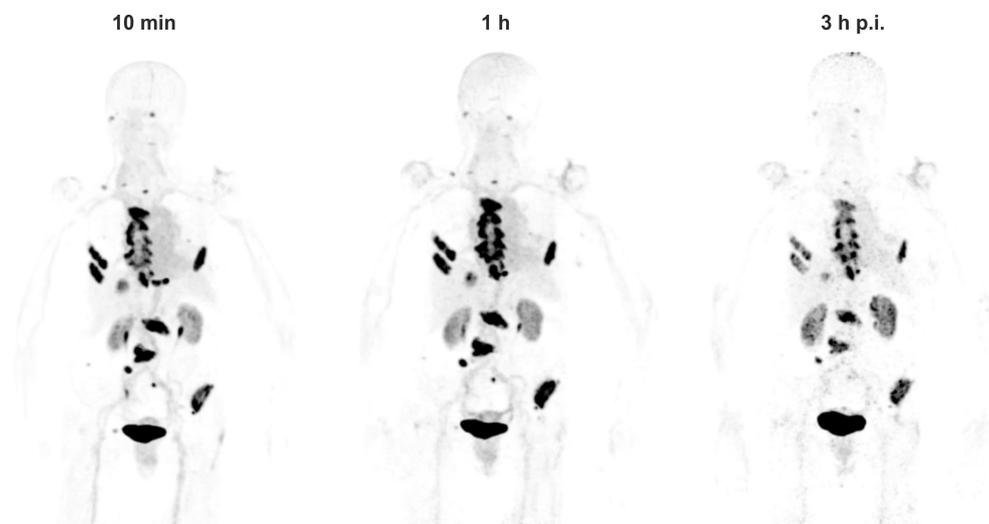


Abbildung 4.39. Maximumintensitätsprojektionen einer Patientin mit metastasiertem Mammakarzinom zehn Minuten sowie eine und drei Stunden nach intravenöser Gabe von ^{68}Ga -FAPI-02.

Wie bereits aus den Tierversuchen zu erwarten war, erfolgt die Elimination des Tracers primär renal. Wie auf den Aufnahmen deutlich zu sehen ist, erfolgt dabei keine Anreicherung des Liganden im Nierenparenchym; eine erhöhte Aktivität ist lediglich im Kelchsystem der Niere sowie in der Blase zu sehen. Die schnelle Clearance von FAPI-02 aus dem Blut resultiert in kontrastreichen Bildern.

Die Untersuchung weiterer Patienten mit unterschiedlichen Tumorentitäten liefert vergleichbare Ergebnisse. Wie in Abbildung 4.40 zu sehen ist, zeigt FAPI-02 eine Stunde nach Injektion eine starke Anreicherung in einem Pankreaskarzinom, einem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC, Metastasen im Knochenmark und in den Knochen sowie in Nebenniere und Nebenmilz) sowie einem HNO-Tumor (Plattenepithelkarzinom mit großer submandibulärer Raumforderung). Dabei ist bei allen untersuchten Patienten eine äußerst geringe unspezifische Aktivität zu sehen, was zu ausgezeichneten Bildkontrasten führt.

Wie aus den Bioverteilungsstudien mit U87MG-xenotransplantierten Mäusen zu erwarten war, eignet sich FAPI-02 auch für die Detektion hochgradiger Hirntumore. Wie in Abbildung 4.41 zu sehen ist, zeigt der Gallium-markierte Tracer eine starke Anreicherung in einem histologisch gesicherten Glioblastom (WHO Grad IV). Bereits nach zehn Minuten ist die deutlich abgegrenzte Läsion im rechten Parietallappen klar zu erkennen (SUV max 6,27). Dabei nimmt die gemessene Aktivität selbst drei Stunden nach Tracerinjektion nicht merklich ab (SUV max 6,13 bzw. 5,3 nach einer bzw. drei Stunden).

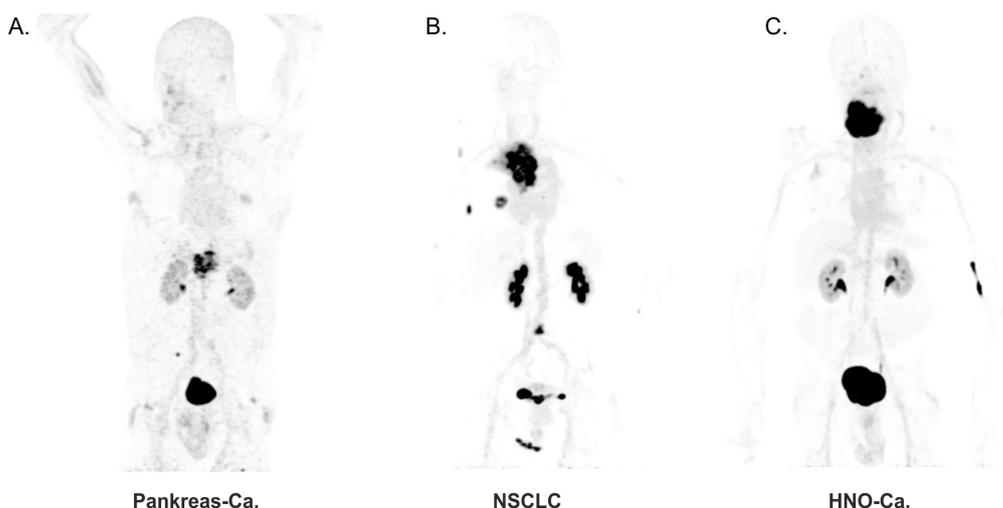


Abbildung 4.40. Maximumintensitätsprojektionen von Patienten mit metastasierten Epithelialtumoren eine Stunde nach intravenöser Gabe von ^{68}Ga -FAPI-02. A. Pankreaskarzinom B. Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (NSCLC) C. HNO-Tumor.

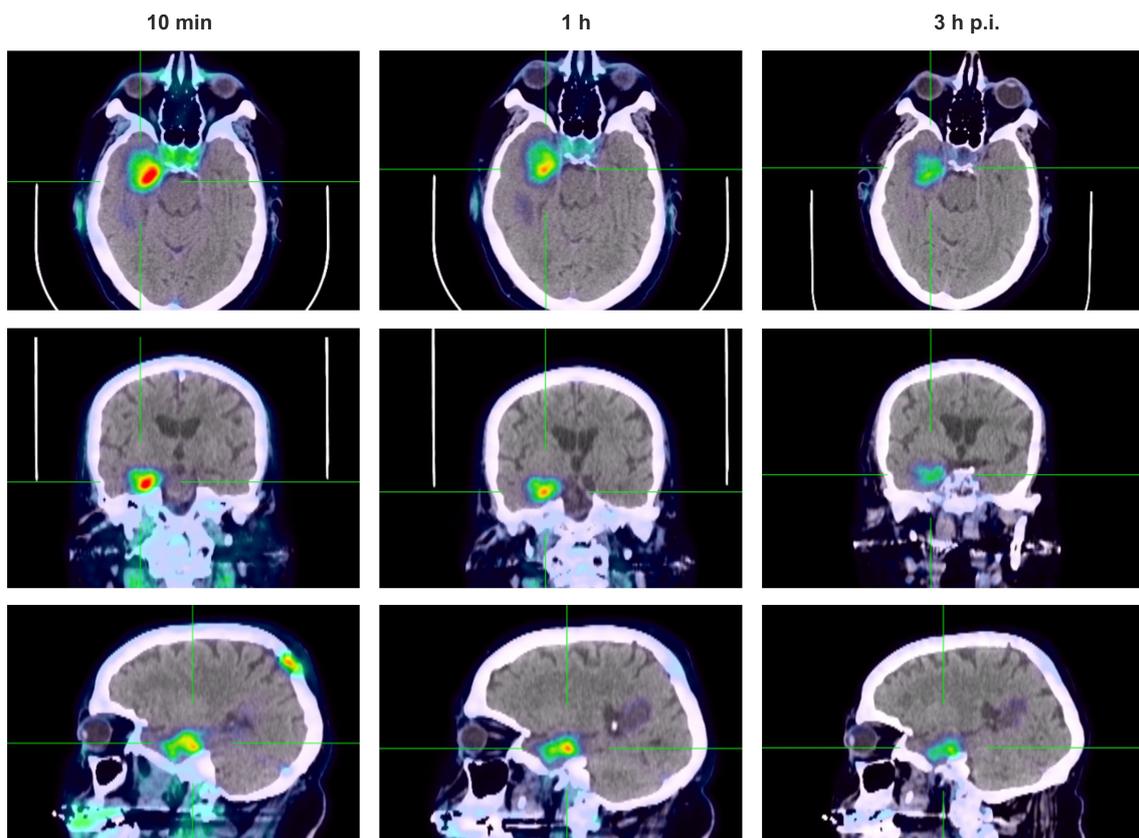


Abbildung 4.41. Transaxiale, koronare und sagittale Fusionsbilder eines Glioblastom-Patienten zehn Minuten, eine und drei Stunde nach intravenöser Gabe von ^{68}Ga -FAP-02.

Zur Beurteilung der diagnostischen Genauigkeit von ^{68}Ga -FAP-02 wurde der Tracer einem Patienten mit einem metastasierten Lungentumor verabreicht und die Organverteilung eine Stunde nach Injektion mittels PET/CT analysiert. Um einen direkten Vergleich des FAP-Liganden mit einem etablierten onkologischen Diagnostikum zu ermöglichen, wurde einen Tag zuvor bereits eine PET-Untersuchung nach Applikation des radioaktiven Glucosederivates ^{18}F -FDG durchgeführt, welches zu den gebräuchlichsten PET-Tracern in der Nuklearmedizin gehört.

Der Vergleich der beiden PET/CT-Aufnahmen ergibt einen klaren Vorteil von FAP-02 gegenüber dem nuklearmedizinischen Standarddiagnostikum. Dabei zeigt der FAP-Ligand eine höhere Tumoraufnahme mit einem maximalen SUV-Wert von 11,1 (^{18}F -FDG 4,7) und eine deutlich geringere Aktivität im Blut und in der Leber, was in einem höheren Bildkontrast und einer besseren Darstellung der malignen Läsionen resultiert. Im Gegensatz zum Glucose-basierten Radiotracer, welcher in Organen mit einem physiologisch hohen Energieumsatz sowie in entzündlichem Gewebe eine starke Anreicherung zeigt, akkumuliert FAP-02 lediglich in den karzinomatösen Läsionen, die das Zielprotein exprimieren.

Dies eröffnet neue Perspektiven für die zielgerichtete Diagnose von malignen Läsionen in Geweben mit hoher metabolischer Aktivität, wie der Leber oder dem Gehirn.

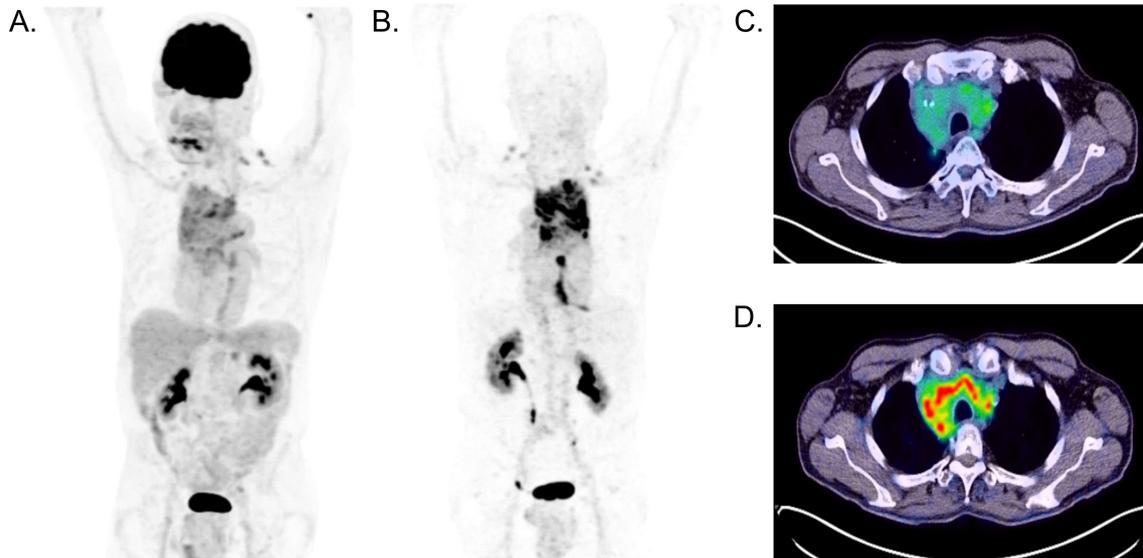


Abbildung 4.42. Ganzkörperprojektion (MIP) sowie transaxiale Fusionsbilder eine Stunde nach intravenöser Gabe von ^{18}F -FDG (A, C) bzw. ^{68}Ga -FAPI-02 (B, D) in einem Patienten mit metastasiertem Lungenkarzinom.

Auch FAPI-04 zeigt eine vorteilhafte Organverteilung mit einer raschen Tumoranreicherung und sehr geringer unspezifischer Bindung in gesundem Gewebe. Wie in Abbildung 4.43 zu sehen ist, sind die multiplen Knochenmetastasen einer Patientin mit fortgeschrittenem Mammakarzinom bereits zehn Minuten nach Injektion des Tracers deutlich erkennbar. Auch nach drei Stunden ist das Signal noch sehr stark, wobei die Intensität deutlich höher ist als nach Gabe von FAPI-02.

Dieses Ergebnis kann in den unterschiedlichsten Tumorentitäten beobachtet werden. Abbildung 4.44 zeigt die Maximumintensitätsprojektionen eine Stunde nach Injektion von FAPI-04 in Patienten mit diversen Epithelialtumoren, darunter ein stark fortgeschrittenes Sigma-Karzinom, ein neuroendokriner Tumor mit multiplen Lebermetastasen sowie ein High-grade seröses Ovarialkarzinom. Bei allen untersuchten Patienten ist die unspezifische Bindung in gesundem Gewebe minimal, was in einem günstigen Tumor-Gewebe-Verhältnis und einem hohen Bildkontrast resultiert. Darüber hinaus zeichnet sich FAPI-04 durch eine lange Retentionszeit in FAP-positiven Tumoren aus. Wie in Abbildung 4.45 zu sehen ist, ist der mit Indium-111 markierte Tracer auch 43 Stunden nach Injektion noch in den malignen Läsionen nachweisbar. Dies stellt eine ideale Voraussetzung für die Kombination des Tracers mit therapeutisch wirksamen Radionukliden dar.

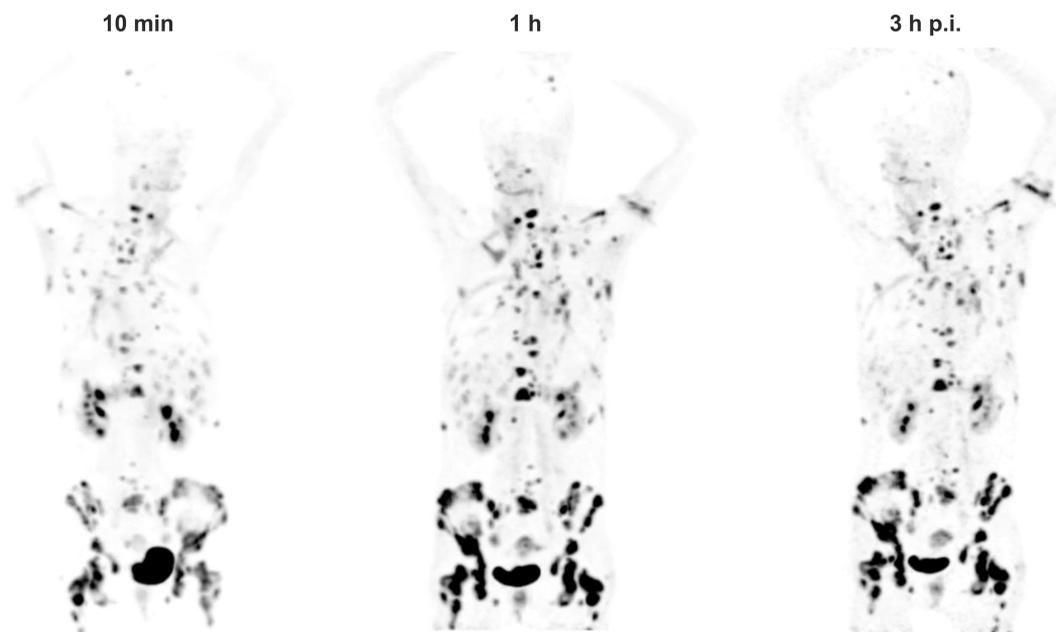


Abbildung 4.43. Maximumintensitätsprojektionen zehn Minuten sowie eine und drei Stunden nach intravenöser Gabe von ^{68}Ga -FAPI-04 in einer Patientin mit metastasiertem Mammakarzinom.

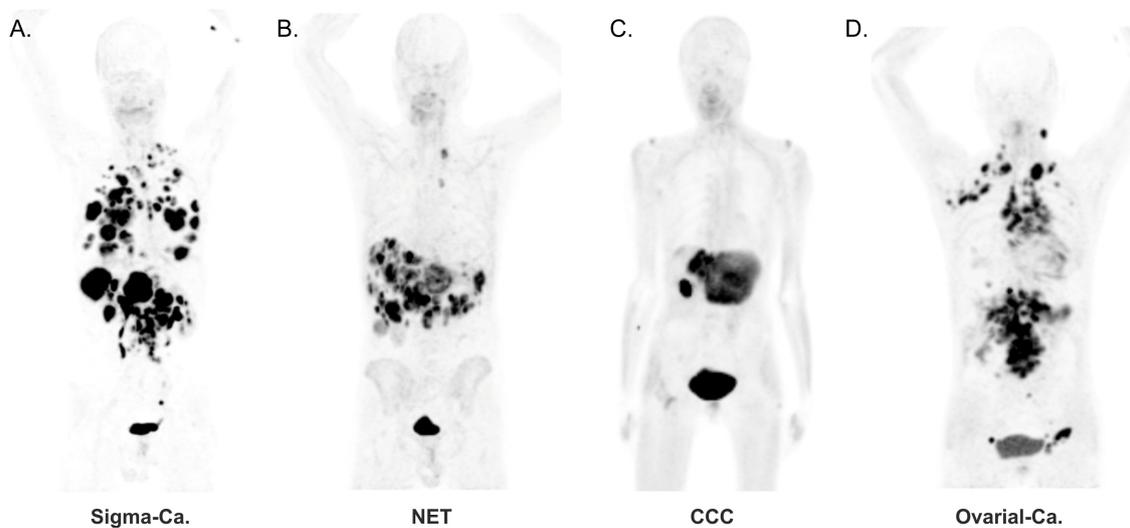


Abbildung 4.44. Maximumintensitätsprojektionen eine Stunde nach intravenöser Gabe von ^{68}Ga -FAPI-04 in Patienten mit metastasierten Epitheliumtumoren. A. Sigma-Karzinom. B. Neuroendokriner Tumor (NET). C. Gallengangskarzinom (Cholangiozelluläres Karzinom, CCC). D. Ovarialkarzinom.

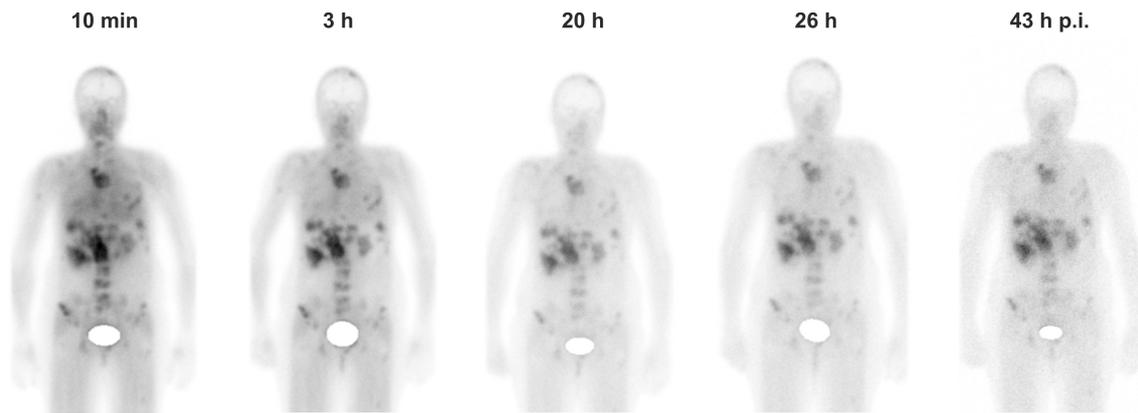


Abbildung 4.45. Szintigraphie bis zu 43 Stunden nach intravenöser Gabe von ^{111}In -FAPI-04 in einer Patientin mit metastasiertem Mammakarzinom.

Nachdem die diagnostische Gabe von ^{68}Ga -FAPI-04 eine starke Anreicherung des Tracers in den Knochenmetastasen einer Patientin mit fortgeschrittenem Mammakarzinom gezeigt hatte, wurde die Patientin mit der mit Yttrium-90 markierten Verbindung therapiert. Abbildung 4.46 zeigt die Bremsstrahlungsaufnahmen bis zu einem Tag nach Injektion des Tracers. Obwohl die verabreichte Dosis mit 2,9 GBq vergleichsweise gering war, führte bereits die einmalige Gabe zu einer signifikanten Reduktion der Schmerzmedikation. Dabei konnte die tägliche Morphingabe um drei bis vier Bolusinjektionen auf eine reine Basalmedikation reduziert werden.

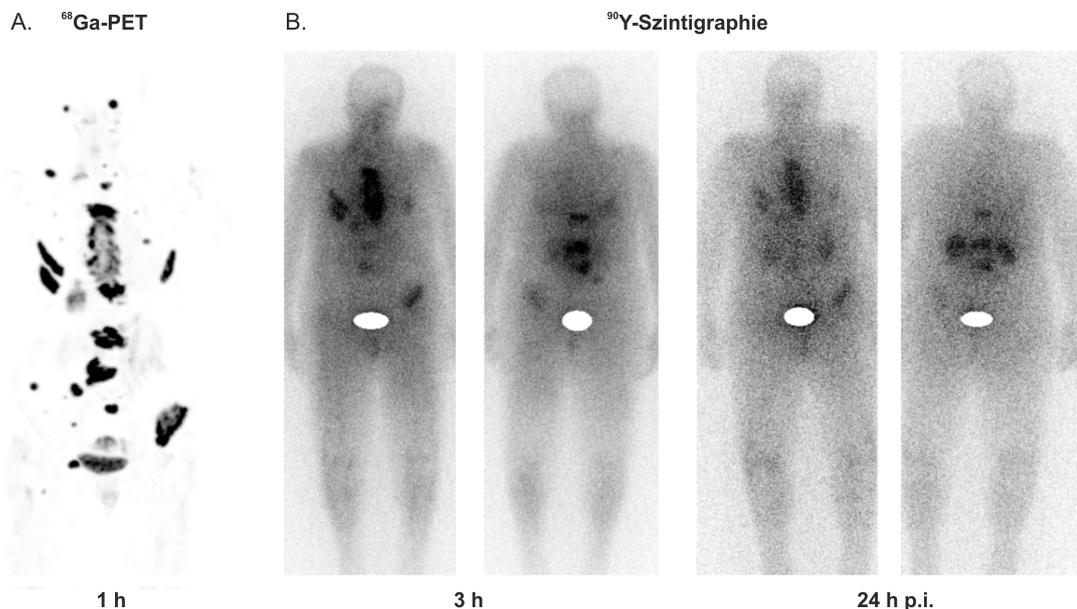


Abbildung 4.46. A. Maximumintensitätsprojektion eine Stunde nach intravenöser Gabe von ^{68}Ga -FAPI-04 in einer Patientin mit metastasiertem Mammakarzinom. B. Bremsstrahlungsaufnahmen bis zu einem Tag nach therapeutischer Gabe von ^{90}Y -FAPI-04 in einer Patientin mit metastasiertem Mammakarzinom.

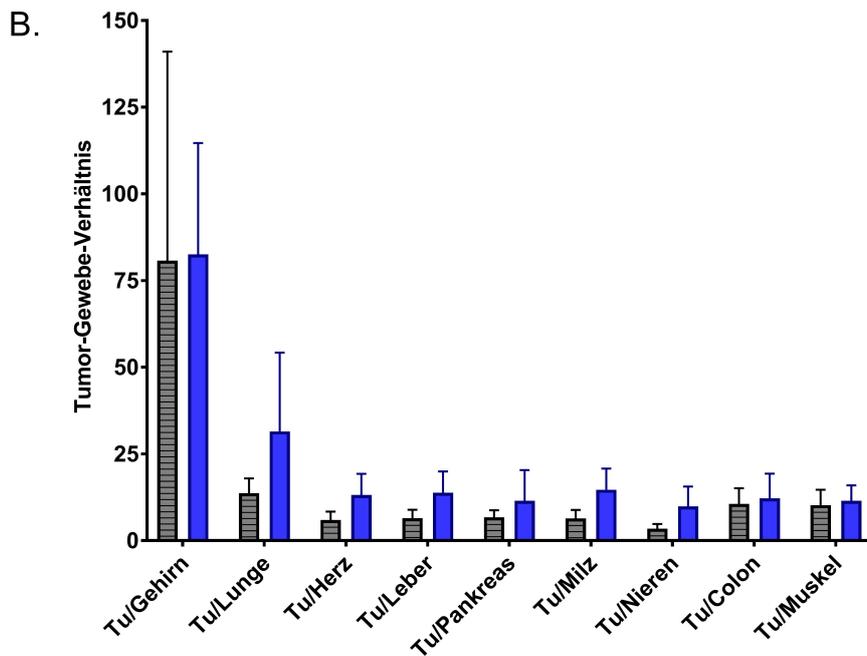
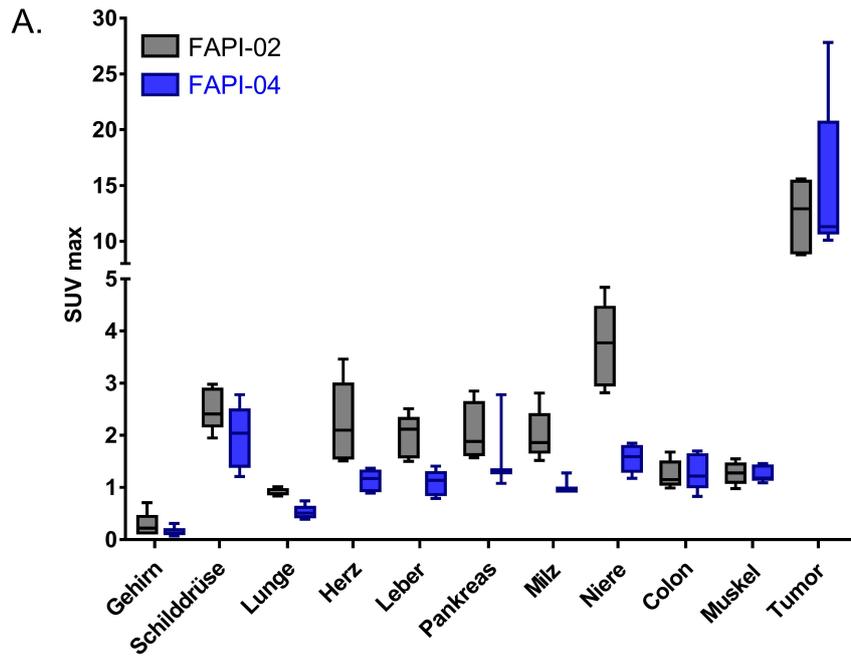


Abbildung 4.47. A. SUV-Werte eine Stunde nach intravenöser Injektion von FAPI-02 bzw. -04 in Tumorpatienten mit unterschiedlichen Tumorentitäten; n=5. B. Tumor-Gewebe-Verhältnis eine Stunde nach intravenöser Gabe von FAPI-02 bzw. -04 in Tumorpatienten mit unterschiedlichen Tumorentitäten; n=5.

Ausgehend von einem Enzyminhibitor mit hoher Affinität und Spezifität zu seinem Zielprotein ist es gelungen, eine Reihe von theranostischen FAP-spezifischen Tracern zu entwickeln und nach profunder Charakterisierung auf FAP-positiven Zellen sowie im Tierversuch in einer ersten klinischen Studie zu untersuchen.

Bereits die Leitsubstanz FAPI-02 zeichnet sich durch eine hohe Affinität und Spezifität zu humanem und murinem FAP sowie eine nahezu vollständige Internalisierungsrate in FAP-positive Zellen aus. Der radiomarkierte Tracer zeigt eine schnelle Aufnahme in FAP-positive Tumore *in vivo* und besitzt keine unspezifische Bindung in gesundem Gewebe. Auch in Patienten mit Pankreas-, Brust- und Lungentumoren zeigt FAPI-02 eine starke Anreicherung im Primärtumor sowie in Weichteil- und Knochenmetastasen und betroffenen Lymphknoten. Im Gegensatz zum radiomarkierten FAP-Antikörper F19 bzw. seiner humanisierten Variante Sibrotuzumab erfolgt bereits innerhalb der ersten Stunde nach Injektion eine nahezu vollständige Internalisierung der FAPI-Derivate in FAP-positiven Tumoren. Zudem ist die Zirkulationszeit der kleinen Moleküle im Organismus deutlich geringer, was in einem verbesserten Tumor-Organ-Verhältnis sowie einem höheren Bildkontrast resultiert.

Mit dem Ziel, die Tumorretentionszeit zu verlängern, wurden die Derivate FAPI-03 bis -15 durch gezielte chemische Modifikation der Leitstruktur entwickelt. Dabei wurde insbesondere der Linker zwischen dem Chelator DOTA und der FAP-affinen Chinolinstruktur variiert. Zusätzlich wurden Derivate mit einem 4,4-Difluorpyrrolidin hergestellt, dessen Einführung eine der wichtigsten Verbesserungen der Leitstruktur darstellt. Die resultierenden Moleküle sind deutlich lipophiler als ihre Ausgangsverbindung, was in einer verbesserten Gewebepерmeation sowie einer längeren Verweildauer im Tumor resultiert. Darüber hinaus zeigen die fluorierten Derivate eine geringere Bindung an CD26 sowie einen langsameren Efflux aus FAP-positiven Zellen.

Durch die Betrachtung der Struktur-Wirkungsbeziehungen der FAPI-Derivate können einige Rückschlüsse auf die wichtigsten Strukturelemente gezogen werden. So zeigen die einfachen 3-Amino-1-propyl-Derivate FAPI-06 und -07 im Zellbindungsassay eine respektable FAP-Bindung nach Inkubation für eine bzw. vier Stunden, werden nach 24 Stunden jedoch fast vollständig aus den Zellen eliminiert. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass das heterozyklische Segment essentiell für eine längere Verweildauer der Substanzen in den Zellen ist. Auch die 7-Chinoly-verbundenen Verbindungen FAPI-08 und -09

besitzen mit einem erheblichen Bindungsverlust nach 24 Stunden ein ähnliches pharmakokinetisches Profil, was durch eine Abspaltung des radioaktiven Molekülfragments zu erklären wäre. Damit scheint die genaue Position des Linkers an der Chinolingrouppe eine entscheidende Rolle für die Stabilität des Moleküls zu spielen. Dies wäre eine zusätzliche Erklärung für die geringen Bindungswerte von FAPI-06 und -07 nach 24 Stunden. Da die Bindung zwischen DOTA und der Propylamingruppe deutlich leichter zugänglich ist als das Piperazin-gebundene DOTA bei FAPI-02 und -04, kann eine enzymatische Spaltung an dieser Stelle leichter erfolgen. FAPI-13 zeigt von allen im Mausmodell untersuchten Derivaten die höchste Tumoraufnahme, bedingt aufgrund einer höheren Aktivität im Blut jedoch auch einen schlechteren Bildkontrast. Dies könnte durch die höhere Lipophilie der Piperidingruppe und der damit einhergehenden stärkeren Bindung an Albumin oder andere Plasmaproteine zu erklären sein. Zwar bewirkt dieser Effekt offensichtlich eine höhere Affinität des Moleküls zum Zielprotein sowie eine längere Verweildauer im Tumor, könnte bei therapeutischer Anwendung jedoch die Gefahr einer Hämatoxizität mit sich bringen, wodurch die therapeutische Breite verringert wird.

Die klinische Untersuchung von FAPI-02 und FAPI-04 in Patienten mit diversen soliden Tumoren sowie hochgradigen Glioblastomen ergab eine schnelle Akkumulation der Substanzen im Primärtumor sowie in Weichteil-, Lymphknoten- und Knochenmetastasen. Hingegen war die Anreicherung der Tracer im Blut sowie in anderen Organen sehr gering, was in kontrastreichen Bildern und vorteilhaften Tumor-Gewebe-Verhältnissen resultierte. Im Vergleich zu dem nuklearmedizinischen Standarddiagnostikum ^{18}F -FDG zeigt FAPI-02 eine höhere Tumoraufnahme und eine deutlich geringere Aktivität im Blut und in der Leber, was eine bessere Darstellung der malignen Läsionen ermöglicht. Im Gegensatz zum Glucosebasierten Radiotracer, welcher in Organen mit einem physiologisch hohen Energieumsatz sowie in entzündlichem Gewebe eine starke Anreicherung zeigt, akkumuliert FAPI-02 lediglich in den karzinomatösen Läsionen, die das Zielprotein exprimieren. Dies eröffnet neue Perspektiven für die zielgerichtete Diagnose von malignen Neoplasien in Geweben mit einer hohen metabolischen Aktivität, wie der Leber oder dem Gehirn.

Durch die hohe Auflösung der kombinierten PET/CT können selbst kleine Läsionen sichtbar gemacht werden, sofern das Zielprotein in ausreichender Menge zur Verfügung steht. Da das Wachstum von soliden Neoplasien über einen Durchmesser von ein bis zwei Millimetern hinaus die Ausbildung eines unterstützenden Tumorstromas erfordert, welches

sich in der Regel durch eine hohe FAP-Expression auszeichnet, sollte die Anwendung der FAPI-Derivate in der PET/CT bereits eine Darstellung von Läsionen mit einem Durchmesser von drei bis fünf Millimetern ermöglichen. Darüber hinaus kann eine Ausweitung der Anwendung der FAPI-Tracer als Diagnostika von nicht-onkologischen Erkrankungen in Erwägungen gezogen werden. Neben der Expression in malignen Neoplasien wird FAP auch in Myofibroblasten-ähnlichen Synovialzellen bei Patienten mit rheumatoider Arthritis sowie Osteoarthritis^[105], Arteriosklerose^[106], Fibrose^[107,108] sowie in ischämischem Herzgewebe nach einem Myokardinfarkt^[109,110] nachgewiesen. Gleichwohl sollte generell nicht außer Acht gelassen werden, dass im Rahmen der Wundheilung, z.B. nach chirurgischen Maßnahmen, ebenfalls mit einer erhöhten Expression aktivierter Fibroblasten zu rechnen ist.

Im Gegensatz zu peptidischen Tracern, wie z.B. DOTA-(MC-FA-012)₃ akkumulieren die FAPI-Derivate nicht im Nierenparenchym und zeichnen sich durch eine schnelle renale Clearance aus. Damit ist die Niere keiner übermäßig erhöhten Strahlenbelastung ausgesetzt, was im Hinblick auf eine potentielle Therapie einen großen Vorteil darstellt. Eine erste therapeutische Anwendung von FAPI-04 mit Yttrium-90 konnte ohne messbare Nebenwirkungen, v.a. im Hinblick auf eine potentielle Hämatotoxizität, vorgenommen werden und führte zu einer signifikanten Reduktion der Schmerzmedikation bei einer Patientin mit multiplen Knochenmetastasen. Die Betrachtung der Bremsstrahlungsaufnahmen verdeutlichte, dass der Tracer auch 24 Stunden nach Injektion noch im Tumor nachgewiesen werden kann. Da die unspezifische Aktivität in den Organen sehr gering war, ist es denkbar, die eingesetzte Strahlendosis zu erhöhen, um einen größeren Therapieeffekt zu erzielen. Inwieweit dies möglich ist, muss basierend auf dosimetrischen Berechnungen in Dosis-Eskalationsstudien noch untersucht werden. Darüber hinaus werden derzeit verschiedene Ansätze für eine therapeutische Anwendung des FAP-Liganden außerhalb des nuklearmedizinischen Spektrums evaluiert. Hierzu gehört eine Kopplung des FAP-affinen Strukturelementes an diverse Effektormoleküle, wie z.B. Chemotherapeutika oder Immunmodulatoren. Derzeit liegt das Hauptaugenmerk allerdings auf der Nutzung der theranostischen Tracer für die zielgerichtete Diagnostik und Behandlung solider Tumoren. Die Möglichkeit, ein und dasselbe Molekül mit diagnostischen als auch therapeutischen Radionukliden zu kombinieren, ermöglicht eine zuverlässige und ökonomische Vorhersage über einen möglichen Therapieerfolg und erlaubt damit eine deutliche Erhöhung der Therapiesicherheit.

5 Anhang

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampère
Acm	Acetaminomethyl
AcOOH	Peressigsäure
AMC	7-Amino-4-Methylcoumarin
Amp	Ampicillin
APCE	<i>Antiplasmin-Cleavage Enzyme</i>
aq. HBr	wässrige Bromwasserstoffsäure
aq. HCl	wässrige Salzsäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Boc	tert-Butyloxycarbonyl
bFGF	<i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>
BM-MSC	<i>Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell</i>
BMSC	<i>Bone Marrow Stem Cell</i>
bp	Basenpaar
Bq	Becquerel
CAF	<i>Cancer-associated Fibroblast</i>
CAR	<i>Chimeric Antigen Receptor</i>
CCK	<i>Cyclic Cystine Knot</i>
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
Cl	Chlorid
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CN	Cyanid
CPP	<i>Cell-Penetrating Peptide</i>
Cs ₂ CO ₃	Cäsiumcarbonat
CT	Computertomographie

DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTPs	2'-Desoxyribonucleosid-5'-triphosphate
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure
DPPIV	Dipeptidylpeptidase IV
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced Chemoluminescence</i>
ECM	<i>Extracellular Matrix</i>
EETI	<i>Ecballium Elaterium</i> Trypsin Inhibitor
EGF	<i>Epithelial Growth Factor</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
EtOH	Ethanol
F-DOPA	Fluor-L-dihydroxyphenylalanin
F-TYR	Fluor-L-tyrosin
FAP	<i>Fibroblast activation protein</i>
FBS	Fetales bovines Serum
FDG	Fluordesoxyglucose
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
for	<i>forward</i>
FSP	<i>Fibroblast-specific Protein</i>
FWHM	<i>Full-Width Half-Maximum</i>
Ga	Gallium
Ge	Germanium
Glu	Glucose
HBTU	(2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HCl	Chlorwasserstoff
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HER	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor</i>

HES	Hydroxyethylstärke
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HNO	Hals, Nase und Ohren
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
hu	human
I/I ₂	Iod
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
ICD	<i>International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems</i>
ID	Injizierte Dosis
IgG	Immunglobulin G
In	Indium
ITLC	<i>Instant Thin Layer Chromatography</i>
IVC	<i>Individually Ventilated Cage</i>
kb	Kilobasen
KI	Kaliumiodid
LAL	Limulus-Amöbozyten-Lysat
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
Lu	Lutetium
M	Molar
MCoTI	<i>Momordica Cochinchinensis</i> Trypsin Inhibitor
Me	Methyl
MeOH	Methanol
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MIP	Maximumintensitätsprojektion
MMP	Matrixmetalloprotease
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Massenspektrometrie
mu	murin

NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
nBuLi	n-Butyllithium
NCT	Nationales Zentrum für Tumorerkrankungen
n.d.	<i>not determined</i>
NGS	Next-Generation-Sequenzierung
NMP	N-Methyl-2-pyrrolidon
NSCLC	<i>Non-Small Cell Lung Cancer</i>
OD	Optische Dichte
OH	Hydroxid
OSEM	<i>Ordered Subset Expectation Maximization</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
$(PPh_3)_2PdCl_2$	Bis(triphenylphosphin)palladium(II)dichlorid
PDGF	<i>Platelet-derived Growth Factor</i>
PEG	Polyethylenglykol
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
pfu	<i>Plaque forming units</i>
PRRT	Peptid-Rezeptor-Radionuklidtherapie
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rev	<i>reverse</i>
ROI	<i>Region Of Interest</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RP	<i>Reverse Phase</i>
rpm	<i>Revolutions Per Minute</i>
SD	<i>Standard Deviation</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SFTI	<i>Sunflower Trypsin Inhibitor</i>
SG	Silica-Gel
SMA	<i>Smooth Muscle Actin</i>
Sn	Stannyl
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>
SPECT	<i>Single Photon Emission Computed Tomography</i>

SUV	<i>Standardized Uptake Value</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropylsilan
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Tos	Tosylat
V	Volt
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WB	Western Blot
wt	Wildtyp
Y	Yttrium

Nomenklatur der Aminosäuren

Alanin	Ala	A	Leucin	Leu	L
Arginin	Arg	R	Lysin	Lys	K
Asparagin	Asn	N	Methionin	Met	M
Asparaginsäure	Asp	D	Phenylalanin	Phe	F
Cystein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q	Serin	Ser	S
Glutaminsäure	Glu	E	Threonin	Thr	T
Glycin	Gly	G	Tryptophan	Trp	W
Histidin	His	H	Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	I	Valin	Val	V

Abbildungsverzeichnis

1.1	Eigenschaften maligner Tumoren	3
1.2	Schematischer Aufbau des Tumorstromas	6
1.3	Entstehung Tumor-assoziiertes Fibroblasten	8
1.4	Ablauf des Phagen-Display-Pannings	13
1.5	Aufbau der Phagemid-basierten Phagenbibliothek	14
1.6	Zyklische Gerüstproteine für den Einsatz im Phagen-Display	19
3.1	Synthese von nicht-radioaktivem FAPI-01	47
3.2	Synthese von radioaktivem FAPI-01	47
3.3	Synthese von FAPI-02	48
4.1	In vitro-Charakterisierung der SFTI8-Peptide	60
4.2	Bindung ausgewählter SFTI8-Peptide an magnetische Beads	61
4.3	In vitro-Charakterisierung der Ph.Min10-GP-FAP-Peptide	64
4.4	Zellbindung von MC-FA-012	67
4.5	In vitro-Kompetition von MC-FA-012	67
4.6	Zellbindung von MC-FA-012 und DOTA-(MC-FA-012) ₃	68
4.7	In vitro-Charakterisierung von DOTA-(MC-FA-012) ₃	69
4.8	Kleintier-PET von DOTA-(MC-FA-012) ₃ im CT26-FAP-Modell	70
4.9	Zeit-Aktivitätskurve von DOTA-(MC-FA-012) ₃ im CT26-FAP-Modell	71
4.10	Kleintier-PET von DOTA-(MC-FA-012) ₃ im U87MG-Modell	72
4.11	Zeit-Aktivitätskurve von DOTA-(MC-FA-012) ₃ im CT26-FAP- bzw. U87MG-Modell	72
4.12	Bioverteilung von DOTA-(MC-FA-012) ₃ im CT26-FAP-Modell	73
4.13	Bioverteilung von DOTA-(MC-FA-012) ₃ im U87MG-Modell	74
4.14	PET/CT eines Patienten mit nekrotischer Lebermetastase	75
4.15	PET/CT zweier Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom	76
4.16	SUV-Werte von DOTA-(MC-FA-012) ₃ in einem Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom	76
4.17	SUV-Werte von DOTA-(MC-FA-012) ₃ in acht Tumorpatienten	77

4.18 Szintigraphie von DOTA-(MC-FA-012) ₃ in einem Tumorpatienten	78
4.19 Bindung von DOTA-(MC-FA-012) ₃ an Caki-Zellen	80
4.20 Einfluss nephroprotektiver Substanzen auf die Zellbindung von DOTA-(MC-FA-012) ₃	80
4.21 Bioverteilung von DOTA-(MC-FA-012) ₃ in tumortragenden Mäusen nach Gabe von Nephroprotektoren	81
4.22 Bioverteilung von DOTA-(MC-FA-012) ₃ in tumortragenden Mäusen nach Konkurrenz mit unspezifischem Cyclotid	82
4.23 In vivo-Konkurrenz von DOTA-(MC-FA-012) ₃	83
4.24 Zellbindung der MC-FA-012-Derivate	85
4.25 In vitro-Charakterisierung von FAPI-01 und -02	88
4.26 Internalisierung von FAPI-02	89
4.27 Kleintier-PET nach Gabe von FAPI-02 in verschiedenen Tumormodellen	91
4.28 Kleintier-PET nach Gabe von FAPI-02 mit und ohne Konkurrenz durch unmarkierte Substanz	92
4.29 Bioverteilung von FAPI-02 in tumortragenden Mäusen	94
4.30 Relative Zellbindung der Derivate FAPI-03 bis -15	98
4.31 Bindung ausgewählter FAPI-Derivate an murines FAP und CD26	99
4.32 Konkurrenz und Efflux ausgewählter FAPI-Derivate	100
4.33 Bioverteilung ausgewählter FAPI-Derivate in tumortragenden Mäusen	102
4.34 Tumoranreicherung ausgewählter FAPI-Derivate in tumortragenden Mäusen	103
4.35 Kleintier-PET nach Gabe von FAPI-04 in verschiedenen Tumormodellen	104
4.36 Kleintier-PET nach Gabe von FAPI-13 und -15 in tumortragenden Nacktmäusen	104
4.37 SUV-Werte ausgewählter FAPI-Derivate in tumortragenden Nacktmäusen	105
4.38 Serumstabilität von FAPI-02 und -04	105
4.39 PET/CT einer Patientin mit metastasiertem Mammakarzinom nach Gabe von FAPI-02	106
4.40 PET/CT von Patienten mit metastasierten Epithelaltumoren nach Gabe von FAPI-02	107
4.41 PET/CT eines Glioblastom-Patienten nach Gabe von FAPI-02	108
4.42 PET/CT nach Gabe von FDG bzw. FAPI-02 in einem Patienten mit Lungenkarzinom	109
4.43 PET/CT nach Gabe von FAPI-04 in einer Patientin mit metastasiertem Mammakarzinom	110

4.44	PET/CT nach Gabe von FAPI-04 in Patienten mit metastasierten Epitheliumtumoren	110
4.45	Szintigraphie nach Gabe von FAPI-04 in einer Patienten mit metastasiertem Mammakarzinom	111
4.46	Therapeutische Gabe von FAPI-04 in einer Patientin mit metastasiertem Mammakarzinom	111
4.47	SUV-Werte und Tumor-Gewebe-Verhältnis nach Gabe von FAPI-02 bzw. -04 in Tumorpatienten	112
5.1	Tumor-Gewebe-Verhältnis ausgewählter FAPI-Derivate im HT-1080-FAP-Modell	151

Tabellenverzeichnis

3.1	Antikörper	26
3.2	Zelllinien und Kulturmedien	27
3.3	Geräte	29
3.4	Zusammensetzung der SDS-Gele	30
3.5	Restriktionsverdau von Plasmid-DNA	34
3.6	Zusammensetzung der Sequenzierungs-PCR	34
3.7	Restriktion des Vektors und der Min10.FAP-GP-Bibliothek	36
3.8	Ligationsansätze für die Min10.FAP-GP-Bibliothek	37
3.9	Transformationsansätze für die Min10.FAP-GP-Bibliothek	38
3.10	PCR-Primer für die Herstellung der SFTI8- und Min10.FAP-GP-Bibliothek	40
3.11	Ansätze zur Reduktion der Nierenakkumulation von DOTA-(MC-FA-012) ₃	52
4.1	Übersicht der im Panning angereicherten SFTI8-Peptide	59
4.2	Übersicht der im Panning angereicherten Ph.Min10-GP-FAP-Peptide	63
4.3	Übersicht der MC-FA-012-Derivate	84
4.4	Übersicht der FAPI-Derivate -02 bis -15	97
4.5	AUC-Werte ausgewählter FAPI-Derivate	101
5.1	Übersicht der im Biopanning angereicherten Peptide	127
5.2	HPLC-MS-Analytik der Panning-Peptide	128
5.3	HPLC-MS-Analytik der FAPI-Derivate	128
5.4	Zellbindung der Ph.SF8-FAP-Peptide	129
5.5	Bindung der Ph.SF8-FAP-Peptide an magnetische Beads	129
5.6	Zellbindung der Min10.FAP-GP-Peptide	130
5.7	Zellbindung der MC-FA-012-Derivate	131
5.8	Internalisierung von DOTA-(MC-FA-012) ₃ in CHO-FAP-Zellen	131
5.9	Zellbindung der modifizierten MC-FA-012-Derivate	131
5.10	Internalisierung von DOTA-(MC-FA-012) ₃ in CHO-FAP- und Caki-Zellen .	132
5.11	Kompetition von DOTA-(MC-FA-012) ₃ mit Nephroprotektoren	132
5.12	Kompetition von DOTA-(MC-FA-012) ₃ mit Arginin/Lysin	132

5.13	Zellbindung von FAPI-01 und FAPI-02	133
5.14	Internalisierung von FAPI-01 und FAPI-02	133
5.15	Bindung der FAPI-Derivate an muFAP und CD26	133
5.16	Relative Bindung und Internalisierung von FAPI-02 bis FAPI-15	134
5.17	SUV-Werte von ^{68}Ga -DOTA-(MC-FA-012) ₃ im CT26-FAP-Modell	135
5.18	SUV-Werte von ^{68}Ga -DOTA-(MC-FA-0116) ₃ im CT26-FAP-Modell	136
5.19	SUV-Werte von ^{68}Ga -DOTA-(MC-FA-012) ₃ im U87MG-Modell	137
5.20	Organverteilung von ^{177}Lu -DOTA-(MC-FA-012) ₃ im CT26-FAP-Modell	138
5.21	Organverteilung von ^{177}Lu -DOTA-(MC-FA-012) ₃ im U87MG-Modell	138
5.22	Organverteilung von ^{177}Lu -DOTA-(MC-FA-012) ₃ bei Nephroprotektion	139
5.23	Organverteilung von ^{177}Lu -DOTA-(MC-FA-012) ₃ bei Konkurrenz	139
5.24	SUV-Werte von ^{68}Ga -FAPI-02 im HT-1080-FAP-Modell	140
5.25	SUV-Werte von ^{68}Ga -FAPI-02 im U87MG-Modell	141
5.26	SUV-Werte von ^{68}Ga -FAPI-02 im Capan-2-Modell	142
5.27	SUV-Werte von ^{68}Ga -FAPI-02 im BxPC3-Modell	143
5.28	SUV-Werte von ^{68}Ga -FAPI-04 im HT-1080-FAP-Modell	144
5.29	SUV-Werte von ^{68}Ga -FAPI-04 im SK-LMS-1-Modell	145
5.30	SUV-Werte von ^{68}Ga -FAPI-13 im HT-1080-FAP-Modell	146
5.31	SUV-Werte von ^{68}Ga -FAPI-15 im HT-1080-FAP-Modell	147
5.32	Organverteilung von ^{177}Lu -FAPI-02 im HT-1080-FAP-Modell	148
5.33	Organverteilung von ^{177}Lu -FAPI-02 im U87MG-Modell	148
5.34	Organverteilung von ^{177}Lu -FAPI-02 im Capan-2-Modell	149
5.35	Organverteilung der FAPI-Derivate eine Stunde nach Injektion	149
5.36	Organverteilung der FAPI-Derivate vier Stunden nach Injektion	150
5.37	Organverteilung der FAPI-Derivate 24 Stunden nach Injektion	150
5.38	SUV-Werte von ^{68}Ga -DOTA-(MC-FA-012) ₃ in Tumorpatienten	152
5.39	Tumor-Gewebe-Verhältnis von ^{68}Ga -DOTA-(MC-FA-012) ₃	152
5.40	SUV-Werte von ^{68}Ga -FAPI-02 und -04 in Tumorpatienten	153
5.41	Tumor-Gewebe-Verhältnis von ^{68}Ga -FAPI-02 und -04	153

Analytische Daten

Auswertung der Next-Generation-Sequenzierungsdaten

Bezeichnung	Sequenz	Runde 1	Runde 2	Runde 3	Runde 4
Ph.SF8-FAP1	R ₁ -HPTHKMPW-R ₂	n.d.	5038	78121	97799
Ph.SF8-FAP2	R ₁ -GIHGWAFL-R ₂	n.d.	2,81	105691	128255
Ph.SF8-FAP3	R ₁ -EWWFGSSR-R ₂	n.d.	3,22	84288	121312
Ph.SF8-FAP4	R ₁ -KWKTGLGWH-R ₂	n.d.	2,21	69269	95700
Ph.SF8-FAP5	R ₁ -LWKVIHNNH-R ₂	n.d.	1,21	35169	37892
Ph.SF8-FAP6	R ₁ -HKSYPWTH-R ₂	n.d.	5561	17934	28900
GP-01	WMR-R ₃ -SFHQWPPGPK-R ₄	3,25	19,30	22,66	36,84
GP-02	LFR-R ₃ -DWHGWFDGPD-R ₄	3,06	10,83	20,42	30,24
GP-03	LMQ-R ₃ -PIAKHLMGPV-R ₄	3,53	15,89	24,07	22,94
GP-04	LHR-R ₃ -VRFMHMYGPW-R ₄	2,86	9,78	13,77	40,39
GP-05	LWH-R ₃ -GFSPQHIGPD-R ₄	2,48	13,19	18,36	29,23
GP-06	LLR-R ₃ -TTRMEYHGPK-R ₄	2,20	11,53	16,48	28,92
GP-07	LFR-R ₃ -DWNDGQFGPF-R ₄	3,25	12,05	16,30	24,86
GP-08	LMR-R ₃ -FMYGSHWGPV-R ₄	1,62	8,56	19,67	30,45
GP-09	HMG-R ₃ -IWMAGVYGPV-R ₄	2,48	8,56	12,64	21,41
GP-10	LMR-R ₃ -WTDATSYGPD-R ₄	2,39	5,85	10,02	22,84
GP-11	IMR-R ₃ -LTYQDTWGPT-R ₄	1,53	6,55	12,55	18,67
GP-12	LMR-R ₃ -DYKGRAFGPS-R ₄	1,81	4,89	8,90	21,82
GP-13	LMR-R ₃ -GKFQVFLGPV-R ₄	0,57	5,41	7,68	23,34
GP-14	LFN-R ₃ -EARDQVMGPV-R ₄	1,43	3,93	8,33	24,56
GP-15	LAR-R ₃ -DRSFHKPGPA-R ₄	1,43	6,03	7,49	15,83
GP-16	LMV-R ₃ -MVWLDKQGPT-R ₄	1,43	7,42	8,71	14,01
GP-17	LMR-R ₃ -ILKDIYDGPV-R ₄	0,95	3,06	7,49	20,20
GP-18	LMR-R ₃ -PFYDLWFGPD-R ₄	2,48	5,33	10,30	6,29
GP-19	LMR-R ₃ -ISWQPHQGPN-R ₄	4,81	12,21	29,16	97,48
GP-20	LMR-R ₃ -FTDLHEPGPK-R ₄	0,77	2,06	6,58	505,12
GP-21	LMR-R ₃ -TLESILEGPD-R ₄	1,93	8,27	31,43	440,23
GP-22	LME-R ₃ -NGHPKVYGPW-R ₄	2,90	8,10	31,08	2372,35
GP-23	LMR-R ₃ -TDDWAVSGPN-R ₄	9,72	11,34	33,18	107,00
GP-24	LMR-R ₃ -TDLWKTLPV-R ₄	3,77	7,32	90,15	340,56
GP-25	LMR-R ₃ -WVRVNILGPD-R ₄	5,27	5,63	120,19	383,66
GP-26	LMR-R ₃ -STFLRYDGPM-R ₄	5,47	10,71	32,37	53,20
GP-27	LME-R ₃ -NGHPKVYGPW-R ₄	14,07	19,71	250,24	525,44
GP-28	LMH-R ₃ -MRRENTIGPR-R ₄	11,20	15,91	33,89	46,47
GP-29	LMR-R ₃ -IFQIANNGPM-R ₄	4,77	6,69	15,69	25,59

GP-30	LMR-R ₃ -FTSLVLFGR-R ₄	3,86	7,96	12,32	19,03
GP-31	LMR-R ₃ -IDLMWSEGPM-R ₄	10,40	11,87	24,43	22,61
GP-32	LMR-R ₃ -RVGFRPGGPD-R ₄	7,96	10,20	15,92	22,79
GP-33	LMA-R ₃ -GWQSNFRGPN-R ₄	8,28	8,11	13,32	14,19
GP-34	LML-R ₃ -TDTMEHAGPV-R ₄	0,85	1,50	117,33	149,00
GP-35	DMD-R ₃ -VTYGHLEGPM-R ₄	5,08	18,51	37,67	155,84
GP-36	LMV-R ₃ -RAWQGVYGP-R ₄	1,39	2,26	38,14	80,85
GP-37	LMR-R ₃ -KLIKLSDGPD-R ₄	1,0	1,8	8,5	11,5
GP-38	LMR-R ₃ -LDAYSNMGPN-R ₄	1,31	2,09	21,05	43,10
GP-39	LME-R ₃ -RENGHPMGPD-R ₄	1,29	2,50	9,87	16,01
GP-40	LMS-R ₃ -DSWERAHGPD-R ₄	2,46	3,76	17,23	29,76
GP-41	LMR-R ₃ -STFLRYDGPM-R ₄	1,31	2,93	29,27	22,35
GP-42	LMR-R ₃ -LEATGWDGPD-R ₄	0,82	1,34	9,23	46,52

Tabelle 5.1. Bezeichnung und Anzahl je Panning-Runde der mittels Phagen-Display identifizierten Peptide. Die angegebenen Werte sind jeweils auf eine Million Reads normalisiert.

R₁: GRCT; R₂: CYPD; R₃: CKQDSDCLAGSVC; R₄: YCG.

HPLC-MS-Analytik der mittels Phagen-Display identifizierten Peptide

Peptid	R _t (min)	m/z	Peptid	R _t (min)	m/z
Ph.SF8-FAP1	12,53	1927,74	GP-19	10,52	3066,21
Ph.SF8-FAP2	16,13	1793,74	GP-20	10,09	3172,29
Ph.SF8-FAP3	15,28	1948,82	GP-21	11,83	3104,25
Ph.SF8-FAP4	12,76	1949,84	GP-22	10,30	3159,24
Ph.SF8-FAP5	14,28	1940,92	GP-23	10,57	3093,18
Ph.SF8-FAP6	13,20	1999,86	GP-24	11,36	3209,34
GP-01	11,13	2750,10	GP-25	11,44	3200,37
GP-02	11,60	3279,21	GP-26	10,78	3218,28
GP-03	11,29	3066,30	GP-27	10,29	3159,24
GP-04	11,17	3361,35	GP-28	9,21	3241,32
GP-05	11,00	3121,20	GP-29	11,29	3136,26
GP-06	9,66	3232,35	GP-30	11,78	3168,36
GP-07	11,88	3230,22	GP-31	11,59	3210,24
GP-08	11,39	3212,22	GP-32	9,73	3089,28
GP-09	11,62	3087,15	GP-33	10,42	3109,20
GP-10	11,16	3144,15	GP-34	10,28	3110,16
GP-11	11,11	3212,25	GP-35	10,61	3096,12
GP-12	10,00	3128,25	GP-36	10,95	3109,26

GP-13	11,95	3122,34	GP-37	10,35	3117,33
GP-14	10,88	3106,23	GP-38	10,22	3016,14
GP-15	9,39	3082,26	GP-39	9,44	3114,15
GP-16	11,80	3149,28	GP-40	9,80	3132,15
GP-17	11,08	3193,35	GP-41	10,61	3218,28
GP-18	12,90	3288,27	GP-42	10,58	3091,17

Tabelle 5.2. Massenspektrometrische Analyse der mittels Phagen-Display identifizierten Peptide. R_t : Retentionszeit, m/z : Masse-zu-Ladungs-Verhältnis ($[M+H]^+$).

HPLC-MS-Analytik der FAPI-Derivate

Bezeichnung	R_t (min)	m/z
FAPI-01	11,95	435,01
FAPI-02	8,37	837,39
FAPI-03	8,62	851,40
FAPI-04	8,80	873,37
FAPI-05	9,12	887,38
FAPI-06	8,72	768,33
FAPI-07	9,24	804,31
FAPI-08	8,45	837,39
FAPI-09	9,08	873,37
FAPI-10	9,58	753,05
FAPI-11	10,23	844,34
FAPI-12	10,27	858,35
FAPI-13	10,72	872,37
FAPI-14	11,19	886,39
FAPI-15	9,55	947,40
FAPI-02-Atto488	10,19	1022,27

Tabelle 5.3. Massenspektrometrische Analyse der FAPI-Derivate. R_t : Retentionszeit, m/z : Masse-zu-Ladungs-Verhältnis ($[M+H]^+$).

Experimentelle Originaldaten

Daten aus zellbasierten Experimenten

Peptide aus dem Phagendisplay

	CHO FAP			CHO mock		
	10 min	60 min	unspezifisch	10 min	60 min	unspezifisch
Ph.SF8-FAP1	0,41 ± 0,02	0,48 ± 0,07	0,44 ± 0,03	0,37 ± 0,10	0,23 ± 0,04	0,30 ± 0,04
Ph.SF8-FAP2	6,37 ± 1,22	3,78 ± 0,26	3,72 ± 0,34	5,46 ± 0,42	4,39 ± 0,20	3,35 ± 0,69
Ph.SF8-FAP3	1,42 ± 0,06	1,38 ± 0,01	0,91 ± 0,16	0,64 ± 0,01	0,69 ± 0,07	0,75 ± 0,13
Ph.SF8-FAP4	8,45 ± 1,57	2,25 ± 0,09	17,25 ± 0,85	7,85 ± 0,48	12,01 ± 0,38	14,24 ± 0,28
Ph.SF8-FAP5	6,02 ± 0,63	14,05 ± 5,71	11,49 ± 6,75	6,11 ± 0,29	10,77 ± 0,36	13,31 ± 0,38
Ph.SF8-FAP6	5,06 ± 0,18	6,65 ± 0,28	9,25 ± 0,40	5,58 ± 0,40	7,06 ± 0,34	8,90 ± 0,40

Tabelle 5.4. Bindung der Ph.SF8-FAP-Peptide an CHO-FAP- und CHO-mock-Zellen sowie unspezifische Bindung. Mittelwert ± Standardabweichung; n=3.

	FAP-positiv	FAP-negativ
Ph.SF8-FAP5	85,00 ± 7,98	89,89 ± 12,38
Ph.SF8-FAP6	95,02 ± 11,03	99,20 ± 1,72
MC-FA-012	7,98 ± 1,90	1,12 ± 0,38

Tabelle 5.5. Bindung ausgewählter Ph.SF8-FAP-Peptide an FAP-positive sowie FAP-negative Cobalt-Beads. Mittelwert ± Standardabweichung; n=2.

	10 min	60 min	unspezifisch
GP-02	1,09 ± 0,23	0,72 ± 0,10	0,25 ± 0,05
GP-03	0,57 ± 0,15	0,44 ± 0,03	0,14 ± 0,01
GP-04	1,74 ± 0,21	1,08 ± 0,17	0,42 ± 0,01
GP-05	0,96 ± 0,34	0,56 ± 0,15	0,11 ± 0,01
GP-06	0,84 ± 0,20	0,67 ± 0,24	0,17 ± 0,00
GP-07	1,26 ± 0,13	0,96 ± 0,13	0,16 ± 0,01
GP-08	1,38 ± 0,34	1,11 ± 0,05	0,29 ± 0,01
GP-09	0,34 ± 0,07	0,18 ± 0,03	0,09 ± 0,02
GP-10	0,60 ± 0,06	0,69 ± 0,02	0,31 ± 0,01
GP-11	0,47 ± 0,11	0,35 ± 0,04	0,17 ± 0,04
GP-12	0,42 ± 0,02	0,38 ± 0,05	0,24 ± 0,03

GP-13	1,20 ± 0,23	1,41 ± 0,06	3,03 ± 0,23
GP-14	0,32 ± 0,18	0,27 ± 0,03	0,24 ± 0,10
GP-15	0,35 ± 0,05	0,32 ± 0,04	0,14 ± 0,00
GP-16	0,23 ± 0,04	0,23 ± 0,02	0,11 ± 0,00
GP-17	0,35 ± 0,14	0,35 ± 0,02	0,18 ± 0,04
GP-18	0,53 ± 0,02	0,56 ± 0,04	0,09 ± 0,01
GP-20	0,14 ± 0,04	0,10 ± 0,00	0,01 ± 0,01
GP-21	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
GP-22	0,17 ± 0,05	0,07 ± 0,07	0,00 ± 0,00
GP-23	0,03 ± 0,01	0,00 ± 0,01	0,03 ± 0,02
GP-24	0,29 ± 0,07	0,33 ± 0,04	0,19 ± 0,01
GP-25	1,19 ± 0,14	1,23 ± 0,03	0,66 ± 0,07
GP-26	0,16 ± 0,05	0,14 ± 0,01	0,06 ± 0,04
GP-27	0,37 ± 0,03	0,35 ± 0,03	0,21 ± 0,01
GP-28	0,06 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,00
GP-29	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00
GP-30	1,01 ± 0,15	1,17 ± 0,05	1,91 ± 0,05
GP-31	0,06 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01
GP-32	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01
GP-33	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,02	0,00 ± 0,00
GP-35	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,01 ± 0,01
GP-36	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01
GP-37	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01
GP-39	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00
GP-40	0,04 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01
GP-41	0,04 ± 0,02	0,04 ± 0,01	0,00 ± 0,00
GP-42	0,03 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01

Tabelle 5.6. Bindung der Min10.FAP-GP-Peptide an CHO-FAP-Zellen sowie unspezifische Bindung. Mittelwert ± Standardabweichung; n=3.

MC-FA-012 und Derivate

	MC-Myc-010		MC-FA-012		DOTA-(MC-FA-012) ₃	
	10 min	60 min	10 min	60 min	10 min	60 min
huFAP	0,25 ± 0,1	0,02 ± 0,00	6,82 ± 0,98	4,10 ± 0,55	10,76 ± 0,85	59,43 ± 3,87
muFAP	0,23 ± 0,05	0,19 ± 0,00	0,21 ± 0,03	0,24 ± 0,04	0,82 ± 0,17	0,68 ± 0,03
mock	n.d.	n.d.	0,21 ± 0,09	0,06 ± 0,01	0,14 ± 0,02	0,65 ± 0,14
unspezifisch	n.d.	0,02 ± 0,01	n.d.	0,06 ± 0,03	n.d.	0,27 ± 0,02

Tabelle 5.7. Zellbindung der MC-FA-012-Derivate sowie unspezifische Bindung. Mittelwert ± Standardabweichung; n=3.

	37°C		4°C	
	Int	Ext	Int	Ext
10 min	12,24 ± 0,56	25,00 ± 1,09	9,52 ± 0,64	28,24 ± 0,90
30 min	11,38 ± 0,31	23,44 ± 1,09	7,52 ± 2,00	23,13 ± 0,11
60 min	32,46 ± 0,71	32,63 ± 0,84	14,56 ± 0,77	38,13 ± 1,81
120 min	33,77 ± 4,84	34,07 ± 2,05	21,66 ± 1,26	43,08 ± 0,43
240 min	25,82 ± 0,51	36,74 ± 1,96	20,55 ± 1,38	51,71 ± 2,59

Tabelle 5.8. Internalisierung von DOTA-(MC-FA-012)₃ in CHO-FAP-Zellen. Int: intrazellulärer Anteil, Ext: extrazellulärer Anteil. Mittelwert ± Standardabweichung; n=3.

	10 min	60 min
MC-FA-012	7,97 ± 2,09	8,76 ± 0,25
SF-MCFA012-Y	2,10 ± 0,18	1,83 ± 0,05
SF-MCFA012-F	1,64 ± 0,18	1,46 ± 0,25
Min-MCFA012-F	1,07 ± 0,12	1,92 ± 0,28
EETI-MCFA012	0,69 ± 0,06	0,33 ± 0,27
MC-FA-012-NH ₂	1,51 ± 0,14	0,98 ± 0,05
MC-FA-012-G	2,47 ± 0,03	1,89 ± 0,11
MC-FA-012-D	0,37 ± 0,01	0,29 ± 0,03
MC-FA-012-C	0,95 ± 0,14	0,88 ± 0,05
MC-FA-012-F7	0,87 ± 0,02	1,46 ± 0,08

Tabelle 5.9. Bindung der modifizierten MC-FA-012-Derivate an CHO-FAP-Zellen. Mittelwert ± Standardabweichung; n=3.

Zelllinie	Int	Ext
CHO-FAP	27,58 ± 0,77	31,06 ± 1,50
Caki-1	0,04 ± 0,01	0,79 ± 0,01
Caki-2	0,05 ± 0,02	0,85 ± 0,03

Tabelle 5.10. Internalisierung von DOTA-(MC-FA-012)₃ in CHO-FAP-, Caki-1- und Caki-2-Zellen. Int: internalisierter Anteil; Ext: extrazellulärer Anteil. Mittelwert ± Standardabweichung; n=3.

	CHO FAP	Caki-1	Caki-2
ohne Protektion	65,27 ± 1,64	0,60 ± 0,02	0,70 ± 0,05
Arg/Lys	62,95 ± 1,99	0,70 ± 0,03	0,73 ± 0,05
Gelafundin	60,99 ± 0,19	0,66 ± 0,07	0,62 ± 0,01
Arg/Lys + Gelafundin	58,62 ± 0,25	0,68 ± 0,01	0,72 ± 0,01
Gentamicin 5 µM	68,52 ± 1,45	0,71 ± 0,01	0,95 ± 0,19
Gentamicin 0,5 µM	69,71 ± 1,73	0,71 ± 0,06	0,88 ± 0,05

Tabelle 5.11. Bindung von DOTA-(MC-FA-012)₃ an CHO-FAP-, Caki-1- und Caki-2-Zellen bei gleichzeitiger Inkubation mit verschiedenen Nephroprotektoren. Mittelwert ± Standardabweichung; n=3.

	Int	Ext
ohne Protektion	27,58 ± 0,77	31,06 ± 1,50
Arg/Lys	25,89 ± 0,86	31,46 ± 0,93
Gelafundin	25,01 ± 0,38	30,06 ± 0,88
Arg/Lys + Gelafundin	22,97 ± 0,68	30,12 ± 0,81
Gentamicin 5 µM	28,16 ± 0,72	34,49 ± 0,81
Gentamicin 0,5 µM	28,58 ± 1,11	34,52 ± 1,27

Tabelle 5.12. Internalisierung von DOTA-(MC-FA-012)₃ in CHO-FAP-Zellen bei gleichzeitiger Inkubation mit Arginin/Lysin in unterschiedlichen Konzentrationen. Int: internalisierter Anteil; Ext: extrazellulärer Anteil. Mittelwert ± Standardabweichung; n=3.

FAPI-Derivate

	FAPI-01	FAPI-02
HT-1080-FAP	24,28 ± 0,86	11,88 ± 0,08
HEK-muFAP	4,94 ± 0,25	5,79 ± 0,48
HEK-CD26	0,05 ± 0,01	0,13 ± 0,01
BxPC3	0,55 ± 0,05	0,56 ± 0,04
Capan-2	0,84 ± 0,08	0,49 ± 0,01
MCF-7	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,00
SK-LMS-1	0,50 ± 0,02	0,52 ± 0,03

Tabelle 5.13. Bindung von FAPI-01 und -02 an unterschiedliche Zelllinien. Mittelwert ± Standardabweichung; n=3.

	FAPI-01				FAPI-02			
	37°C		4°C		37°C		4°C	
	Int	Ext	Int	Ext	Int	Ext	Int	Ext
10 min	16,02 ± 0,3	1,13 ± 0,1	15,06 ± 0,6	1,12 ± 0,2	10,79 ± 0,1	1,54 ± 0,2	10,04 ± 0,6	1,78 ± 0,3
1 h	15,05 ± 0,4	1,19 ± 0,1	37,16 ± 1,8	3,64 ± 0,3	10,65 ± 0,5	1,66 ± 0,1	11,67 ± 0,5	2,01 ± 0,3
4 h	13,54 ± 0,2	0,94 ± 0,0	58,33 ± 2,2	4,33 ± 0,3	12,24 ± 0,8	2,03 ± 0,1	11,50 ± 0,5	1,93 ± 0,2
24 h	2,24 ± 0,1	0,24 ± 0,0	23,41 ± 1,7	3,25 ± 0,3	7,62 ± 0,4	1,24 ± 0,1	4,39 ± 0,3	1,38 ± 0,2

Tabelle 5.14. Internalisierung von FAPI-01 und -02 in HT-1080-FAP-Zellen bei 37 und 4 °C. Int: intrazellulärer Anteil, Ext: extrazellulärer Anteil. Mittelwert ± Standardabweichung; n=3.

	HEK-muFAP	HEK-CD26
FAPI-04	30,64 ± 1,34	0,04 ± 0,00
FAPI-05	27,51 ± 0,26	0,22 ± 0,03
FAPI-10	18,21 ± 0,30	0,16 ± 0,04
FAPI-13	30,94 ± 0,90	0,17 ± 0,04
FAPI-15	20,36 ± 0,85	0,56 ± 0,06

Tabelle 5.15. Bindung ausgewählter FAPI-Derivate an HEK-muFAP und HEK-CD26 nach Inkubation für 60 Minuten. Mittelwert ± Standardabweichung; n=3.

	1 h		4 h		24 h	
	Int	Ext	Int	Ext	Int	Ext
FAPI-02	98,02	1,98	98,16	1,84	95,57	4,43
FAPI-03	54,78	2,00	75,41	2,36	97,65	10,39
FAPI-04	66,66	3,92	48,42	2,65	91,17	2,73
FAPI-05	114,06	1,97	122,17	2,15	243,76	17,44
FAPI-06	143,69	2,72	77,45	1,77	12,16	1,73
FAPI-07	82,76	2,66	64,12	2,94	32,18	7,49
FAPI-08	127,43	4,52	94,81	1,70	18,08	3,64
FAPI-09	132,31	4,14	140,56	4,13	32,92	4,49
FAPI-10	114,84	11,80	132,94	12,54	92,36	8,31
FAPI-11	31,95	1,32	25,55	0,76	152,20	5,00
FAPI-12	33,07	1,03	28,48	0,85	126,61	6,65
FAPI-13	91,00	3,49	95,07	4,22	130,26	5,39
FAPI-14	68,67	3,00	95,69	3,93	148,90	6,36
FAPI-15	51,91	2,15	29,66	4,24	57,63	2,02

Tabelle 5.16. Relative Bindung und Internalisierung von FAPI-02 bis -15 an HT-1080-FAP-Zellen. Die Werte geben die prozentuale Zellbindung im Verhältnis zu FAPI-02 an; n=3.

Daten aus den Tierversuchen

DOTA-(MC-FA-012)₃

Zeit (min)	FAP-Tumor	Niere	Herz	Blase	Muskel	wt-Tumor
0,13	0,03	0,94	2,63	0,20	0,01	0,02
0,38	0,22	3,24	5,52	0,53	0,11	0,10
0,75	0,31	3,68	4,07	0,49	0,18	0,14
1,25	0,37	4,19	3,35	0,46	0,22	0,16
1,75	0,42	4,70	2,95	0,47	0,23	0,17
2,25	0,45	5,13	2,64	0,45	0,26	0,19
2,75	0,50	5,58	2,37	0,49	0,29	0,22
3,25	0,53	5,95	2,18	0,50	0,27	0,23
3,75	0,54	6,24	1,98	0,53	0,27	0,22
4,25	0,57	6,54	1,84	0,53	0,24	0,24
5	0,59	6,97	1,65	0,55	0,30	0,24
6	0,62	7,43	1,45	0,58	0,29	0,24
7	0,65	7,93	1,27	0,62	0,28	0,25
8	0,68	8,27	1,14	0,63	0,26	0,25
9	0,69	8,53	1,04	0,66	0,23	0,25
10,5	0,71	8,95	0,94	0,70	0,22	0,24
12,5	0,74	9,48	0,82	0,77	0,24	0,25
14,5	0,78	9,83	0,71	0,85	0,24	0,24
16,5	0,80	10,08	0,62	0,89	0,19	0,24
18,5	0,82	10,31	0,58	0,90	0,23	0,22
22	0,84	11,09	0,51	0,98	0,21	0,22
27	0,88	11,34	0,42	1,11	0,18	0,20
32	0,90	11,93	0,38	1,17	0,17	0,19
37	0,93	12,26	0,33	1,28	0,15	0,18
42	0,95	12,71	0,30	1,30	0,14	0,17
47	0,97	12,88	0,27	1,36	0,12	0,16
52	0,99	13,09	0,24	1,39	0,10	0,15
57	1,01	13,39	0,22	1,43	0,10	0,14

Tabelle 5.17. Maximale SUV-Werte nach intravenöser Gabe von ⁶⁸Ga-DOTA-(MC-FA-012)₃ in CT26-FAP-tumortragenden Nacktmäusen.

Zeit (min)	Tumor	Niere	Herz	Blase	Muskel
0,13	0,07	0,55	2,30	0,15	0,12
0,38	0,17	1,12	2,05	0,21	0,21
0,75	0,19	1,28	1,84	0,22	0,25
1,25	0,20	1,58	1,65	0,25	0,23
1,75	0,23	1,85	1,49	0,25	0,23
2,25	0,25	2,26	1,43	0,26	0,26
2,75	0,26	2,50	1,28	0,28	0,24
3,25	0,28	2,72	1,18	0,33	0,25
3,75	0,27	2,92	1,07	0,43	0,25
4,25	0,27	3,07	0,99	0,48	0,26
5	0,27	3,33	0,89	0,54	0,23
6	0,27	3,57	0,78	0,59	0,23
7	0,26	3,80	0,69	0,61	0,21
8	0,26	3,98	0,64	0,63	0,20
9	0,26	4,14	0,58	0,67	0,21
10,5	0,26	4,35	0,52	0,76	0,21
12,5	0,25	4,58	0,46	0,89	0,20
14,5	0,24	4,76	0,41	1,01	0,19
16,5	0,22	4,94	0,37	1,10	0,17
18,5	0,22	5,09	0,34	1,19	0,16
22	0,21	5,33	0,30	1,29	0,15
27	0,19	5,60	0,26	1,43	0,13
60	0,19	5,60	0,26	1,40	0,13
120	0,08	7,10	0,04	1,20	0,03

Tabelle 5.18. Maximale SUV-Werte nach intravenöser Gabe von ^{68}Ga -DOTA-(MC-FA-0116) $_3$ in CT26-FAP-tumortragenden Nacktmäusen.

Zeit (min)	Tumor	Niere	Herz	Blase	Muskel
0,125	0,23	5,68	4,32	0,83	0,12
0,375	0,55	3,85	4,22	1,40	0,50
0,75	0,90	3,77	3,72	1,24	0,57
1,25	0,73	4,16	3,37	1,17	0,48
1,75	0,87	5,21	3,20	1,07	1,08
2,25	0,99	5,33	2,80	1,28	0,51
2,75	1,03	6,41	2,60	1,34	0,64
3,25	1,03	6,29	2,77	1,25	0,57
3,75	1,01	6,56	2,19	1,16	0,61
4,25	1,33	7,34	2,63	1,17	0,60
5	0,94	7,28	1,71	0,98	0,62
6	1,02	7,92	1,51	1,04	0,47
7	1,13	8,89	1,35	1,25	0,44
8	1,00	9,18	1,27	1,03	0,40
9	0,97	9,06	1,36	1,19	0,42
10,5	0,86	9,15	0,86	1,28	0,42
12,5	0,89	10,29	0,75	1,17	0,42
14,5	0,87	11,07	0,78	1,35	0,36
16,5	0,93	12,08	0,74	1,38	0,33
18,5	0,94	11,59	0,69	1,45	0,34
22	0,89	11,76	0,55	1,32	0,26
27	0,85	12,91	0,44	1,33	0,24
32	0,86	13,25	0,39	1,30	0,24
37	0,89	13,27	0,39	1,29	0,21
42	0,90	13,25	0,39	1,28	0,19
47	0,85	13,32	0,36	1,21	0,21
52	0,87	13,98	0,33	1,19	0,23
57	0,88	14,26	0,33	1,22	0,20

Tabelle 5.19. Maximale SUV-Werte nach intravenöser Gabe von ^{68}Ga -DOTA-(MC-FA-012)₃ in U87MG-tumortragenden Nacktmäusen.

	30 min	1 h	2 h	4 h	6 h	24 h
Blut	1,35 ± 0,18	0,36 ± 0,06	0,14 ± 0,02	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,05
Herz	0,62 ± 0,06	0,19 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,06 ± 0,01
Lunge	1,77 ± 0,02	0,67 ± 0,07	0,61 ± 0,17	0,45 ± 0,10	0,65 ± 0,51	0,19 ± 0,01
Leber	0,67 ± 0,05	0,40 ± 0,10	0,44 ± 0,06	0,41 ± 0,08	0,43 ± 0,07	0,36 ± 0,04
Milz	0,93 ± 0,07	0,55 ± 0,12	0,66 ± 0,07	0,59 ± 0,11	0,63 ± 0,08	0,46 ± 0,02
Niere	286,78 ± 31,03	222,32 ± 36,69	272,39 ± 21,44	245,19 ± 43,08	259,45 ± 61,80	213,41 ± 5,51
Darm	0,74 ± 0,24	0,51 ± 0,33	1,09 ± 1,37	0,29 ± 0,07	0,93 ± 0,70	0,34 ± 0,10
Gehirn	0,69 ± 0,19	0,23 ± 0,00	0,58 ± 0,61	0,32 ± 0,18	0,22 ± 0,02	0,22 ± 0,04
Muskel	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,13 ± 0,18	0,03 ± 0,01
Tumor	9,85 ± 1,75	6,79 ± 1,23	8,15 ± 2,24	7,77 ± 5,18	7,81 ± 1,86	5,85 ± 0,10

Tabelle 5.20. Organverteilung nach intravenöser Gabe von ^{177}Lu -DOTA-(MC-FA-012)₃ in CT26-FAP-tumortragenden Nacktmäusen. Mittelwert ± Standardabweichung; n=3.

	30 min	1 h	2 h	4 h	6 h	24 h
Blut	1,19 ± 0,05	0,36 ± 0,15	0,29 ± 0,16	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,05
Herz	0,51 ± 0,06	0,18 ± 0,05	0,17 ± 0,09	0,10 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,06 ± 0,01
Lunge	1,27 ± 0,15	0,70 ± 0,53	0,68 ± 0,59	0,45 ± 0,09	0,65 ± 0,51	0,19 ± 0,01
Leber	0,55 ± 0,02	0,38 ± 0,13	0,36 ± 0,17	0,41 ± 0,08	0,43 ± 0,07	0,36 ± 0,04
Milz	0,39 ± 0,05	0,20 ± 0,08	0,26 ± 0,18	0,59 ± 0,11	0,63 ± 0,08	0,46 ± 0,02
Niere	183,70 ± 9,34	148,13 ± 55,63	171,93 ± 97,37	245,19 ± 43,08	259,45 ± 61,80	213,41 ± 5,51
Darm	0,47 ± 0,16	0,21 ± 0,14	0,26 ± 0,22	0,29 ± 0,07	0,93 ± 0,70	0,33 ± 0,10
Gehirn	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,32 ± 0,18	0,22 ± 0,02	0,22 ± 0,04
Muskel	0,39 ± 0,10	0,20 ± 0,07	0,20 ± 0,17	0,02 ± 0,00	0,13 ± 0,18	0,03 ± 0,01
Tumor	6,42 ± 1,20	3,02 ± 1,33	3,16 ± 1,76	7,77 ± 5,18	7,81 ± 1,86	5,85 ± 0,10

Tabelle 5.21. Organverteilung nach intravenöser Gabe von ^{177}Lu -DOTA-(MC-FA-012)₃ in U87MG-tumortragenden Nacktmäusen. Mittelwert ± Standardabweichung; n=3.

	Arg/Lys	Gelafundin	ohne Protektion
Blut	0,62 ± 0,59	0,37 ± 0,07	0,31 ± 0,04
Herz	0,48 ± 0,51	0,25 ± 0,04	0,20 ± 0,01
Lunge	1,11 ± 0,85	0,85 ± 0,23	0,66 ± 0,28
Milz	0,58 ± 0,57	0,27 ± 0,03	0,28 ± 0,00
Leber	0,57 ± 0,13	0,54 ± 0,08	0,45 ± 0,08
Niere	181,86 ± 28,14	221,51 ± 30,36	205,66 ± 58,22
Muskel	0,36 ± 0,19	0,25 ± 0,11	0,36 ± 0,12
Darm	3,25 ± 4,59	0,08 ± 0,02	0,31 ± 0,03
Gehirn	0,03 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01
FAP-Tumor	8,58 ± 1,05	11,01 ± 1,89	8,67 ± 0,05
wt-Tumor	0,85 ± 0,43	0,55 ± 0,12	0,43 ± 0,08

Tabelle 5.22. Organverteilung nach intravenöser Gabe von ^{177}Lu -DOTA-(MC-FA-012)₃ nach Gabe unterschiedlicher Nephroprotektoren in CT26-FAP-tumortragenden Nacktmäusen. Mittelwert ± Standardabweichung; n=3.

	ohne Konkurrenz	MC-Myc-010	(MC-FA-0116)₃
Blut	0,39	0,49 ± 0,06	0,52 ± 0,07
Herz	0,21	0,24 ± 0,03	0,24 ± 0,04
Lunge	0,79	0,73 ± 0,07	0,88 ± 0,27
Milz	0,20	0,29 ± 0,03	0,27 ± 0,07
Leber	0,35	0,46 ± 0,07	0,39 ± 0,06
Niere	0,24	0,55 ± 0,26	0,59 ± 0,21
Muskel	143,49	178,78 ± 8,37	159,56 ± 15,18
Darm	0,23	0,38 ± 0,07	0,26 ± 0,05
Gehirn	0,02	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00
FAP-Tumor	3,82	4,14 ± 1,65	5,69 ± 1,28

Tabelle 5.23. Organverteilung nach intravenöser Gabe von ^{177}Lu -DOTA-(MC-FA-012)₃ nach Gabe unterschiedlicher Kompetitoren in CT26-FAP-tumortragenden Nacktmäusen. Mittelwert ± Standardabweichung; n=3 mit Kompetitor, n=1 ohne Kompetitor.

FAPI-Derivate

Zeit (min)	Tumor	Niere	Herz	Blase	Muskel	Leber
0,125	0,08	0,96	1,71	0,08	0,06	0,11
0,375	0,19	2,20	2,13	0,16	0,18	0,86
0,75	0,24	2,64	1,63	0,18	0,22	1,14
1,25	0,27	3,15	1,28	0,21	0,28	0,95
1,75	0,29	3,89	1,06	0,32	0,31	0,73
2,25	0,34	4,41	1,01	1,27	0,37	0,73
2,75	0,37	3,75	0,90	2,36	0,38	0,60
3,25	0,38	3,21	0,81	2,95	0,37	0,59
3,75	0,40	2,81	0,74	3,38	0,41	0,52
4,25	0,40	2,54	0,69	3,79	0,41	0,49
5	0,42	2,21	0,63	4,46	0,40	0,45
6	0,42	1,89	0,57	5,34	0,39	0,40
7	0,44	1,66	0,52	6,16	0,38	0,36
8	0,44	1,51	0,49	6,95	0,39	0,34
9	0,45	1,20	0,45	7,99	0,36	0,32
10,5	0,46	0,97	0,42	8,63	0,36	0,29
12,5	0,47	0,95	0,37	9,52	0,34	0,26
14,5	0,48	0,85	0,34	10,53	0,31	0,24
16,5	0,49	0,74	0,32	11,35	0,31	0,23
18,5	0,50	0,66	0,30	12,05	0,31	0,22
22	0,50	0,55	0,27	12,99	0,28	0,20
27	0,51	0,46	0,24	14,15	0,25	0,18
32	0,51	0,41	0,22	14,99	0,24	0,16
37	0,51	0,38	0,21	15,64	0,22	0,16
42	0,51	0,36	0,19	16,09	0,22	0,14
47	0,51	0,34	0,18	16,41	0,20	0,14
52	0,51	0,32	0,17	16,49	0,19	0,13
57	0,51	0,31	0,17	16,52	0,17	0,13

Tabelle 5.24. Maximale SUV-Werte von ^{68}Ga -FAPI-02 nach intravenöser Gabe in HT-1080-FAP-tumortragenden Nacktmäusen.

Zeit (min)	Tumor	Niere	Herz	Blase	Muskel	Leber
0,125	0,00	1,86	3,40	0,33	0,00	0,24
0,375	0,10	2,36	2,98	0,47	0,02	1,11
0,75	0,15	2,39	2,09	0,50	0,08	1,22
1,25	0,21	2,75	1,70	0,53	0,13	0,92
1,75	0,24	2,73	1,42	0,53	0,23	0,80
2,25	0,28	3,64	1,30	0,54	0,27	0,73
2,75	0,32	4,71	1,14	0,66	0,28	0,62
3,25	0,35	3,95	1,04	1,52	0,22	0,58
3,75	0,38	3,24	0,95	2,29	0,26	0,54
4,25	0,40	3,02	0,90	2,73	0,36	0,53
5	0,43	2,92	0,83	3,13	0,26	0,46
6	0,46	2,91	0,76	3,49	0,22	0,42
7	0,49	2,86	0,70	3,82	0,24	0,42
8	0,50	2,88	0,67	4,09	0,17	0,40
9	0,52	2,86	0,65	4,37	0,26	0,37
10,5	0,55	2,78	0,61	4,84	0,22	0,37
12,5	0,57	2,62	0,57	5,52	0,26	0,35
14,5	0,59	2,31	0,55	6,18	0,23	0,33
16,5	0,61	2,02	0,53	6,89	0,25	0,32
18,5	0,62	1,75	0,49	7,57	0,22	0,29
22	0,63	1,35	0,47	8,57	0,23	0,30
27	0,65	0,93	0,43	9,63	0,24	0,28
32	0,65	0,75	0,41	10,18	0,21	0,28
37	0,66	0,65	0,38	10,64	0,19	0,26
42	0,66	0,61	0,37	10,94	0,23	0,25
47	0,66	0,57	0,35	11,18	0,15	0,25
52	0,67	0,56	0,35	11,47	0,17	0,25
57	0,67	0,52	0,34	11,70	0,15	0,24

Tabelle 5.25. Maximale SUV-Werte von ^{68}Ga -FAPI-02 nach intravenöser Gabe in U87MG-tumortragenden Nacktmäusen.

Zeit (min)	Tumor	Niere	Herz	Blase	Muskel	Leber
0,125	0,27	1,34	2,97	0,16	0,13	0,11
0,375	0,26	1,79	2,39	0,17	0,23	0,96
0,75	0,29	1,85	1,94	0,17	0,24	1,01
1,25	0,31	2,12	1,55	0,18	0,28	0,81
1,75	0,32	2,31	1,33	0,20	0,31	0,67
2,25	0,37	2,60	1,23	0,22	0,34	0,61
2,75	0,36	2,85	1,10	0,23	0,33	0,53
3,25	0,38	3,06	0,98	0,33	0,33	0,50
3,75	0,41	3,01	0,89	0,69	0,34	0,44
4,25	0,40	2,76	0,83	1,12	0,31	0,41
5	0,40	2,48	0,75	1,60	0,31	0,36
6	0,42	2,29	0,68	2,06	0,31	0,34
7	0,42	2,18	0,63	2,42	0,28	0,32
8	0,42	2,04	0,58	2,74	0,26	0,28
9	0,44	1,85	0,54	3,11	0,26	0,28
10,5	0,44	1,49	0,50	3,67	0,25	0,25
12,5	0,44	1,12	0,45	4,27	0,24	0,24
14,5	0,46	1,01	0,41	4,65	0,22	0,21
16,5	0,45	0,94	0,38	4,93	0,22	0,20
18,5	0,45	0,85	0,35	5,23	0,20	0,19
22	0,45	0,70	0,32	5,69	0,18	0,17
27	0,44	0,57	0,29	6,18	0,17	0,16
32	0,43	0,48	0,26	6,56	0,15	0,14
37	0,41	0,42	0,24	6,88	0,15	0,14
42	0,41	0,37	0,23	7,12	0,15	0,14
47	0,40	0,35	0,22	7,31	0,14	0,13
52	0,40	0,33	0,21	7,49	0,14	0,12
57	0,38	0,32	0,20	7,67	0,14	0,12

Tabelle 5.26. Maximale SUV-Werte von ^{68}Ga -FAPI-02 nach intravenöser Gabe in Capan-2-tumortragenden Nacktmäusen.

Zeit (min)	Tumor	Niere	Herz	Blase	Muskel	Leber
0,125	0,08	0,88	1,31	0,24	0,03	0,25
0,375	0,22	1,39	1,41	0,22	0,09	0,77
0,75	0,27	1,53	1,09	0,23	0,12	0,67
1,25	0,30	1,75	0,87	0,23	0,15	0,54
1,75	0,31	2,18	0,75	0,25	0,18	0,45
2,25	0,34	2,35	0,69	0,45	0,19	0,42
2,75	0,33	1,86	0,62	0,81	0,21	0,36
3,25	0,34	1,51	0,58	1,11	0,20	0,35
3,75	0,32	1,31	0,53	1,34	0,21	0,31
4,25	0,32	1,17	0,51	1,51	0,21	0,29
5	0,31	1,01	0,47	1,75	0,21	0,27
6	0,30	0,91	0,43	1,99	0,20	0,26
7	0,29	0,89	0,39	2,18	0,20	0,25
8	0,27	0,82	0,37	2,38	0,19	0,22
9	0,28	0,76	0,35	2,58	0,19	0,21
10,5	0,26	0,65	0,32	2,85	0,18	0,21
12,5	0,26	0,58	0,30	3,15	0,17	0,20
14,5	0,25	0,54	0,28	3,38	0,17	0,18
16,5	0,24	0,45	0,26	3,64	0,16	0,18
18,5	0,24	0,45	0,25	3,80	0,16	0,18
22	0,22	0,40	0,23	4,11	0,15	0,17
27	0,21	0,35	0,21	4,48	0,14	0,16
32	0,19	0,31	0,20	4,77	0,13	0,15
37	0,19	0,29	0,18	5,01	0,13	0,15
42	0,18	0,27	0,17	5,22	0,12	0,14
47	0,18	0,26	0,16	5,40	0,12	0,15
52	0,16	0,25	0,16	5,55	0,11	0,15
57	0,16	0,23	0,15	5,69	0,11	0,14

Tabelle 5.27. Maximale SUV-Werte von ^{68}Ga -FAPI-02 nach intravenöser Gabe in BxPC3-tumortragenden Nacktmäusen.

Zeit (min)	Tumor	Niere	Herz	Blase	Muskel	Leber
0,125	0,09	1,36	2,40	0,20	0,16	0,27
0,375	0,18	2,26	1,97	0,29	0,24	0,91
0,75	0,23	2,63	1,58	0,32	0,28	0,86
1,25	0,28	3,38	1,30	0,40	0,31	0,74
1,75	0,31	3,22	1,14	0,90	0,31	0,65
2,25	0,36	2,96	1,11	1,60	0,35	0,62
2,75	0,38	2,58	1,02	2,09	0,35	0,58
3,25	0,39	2,31	0,95	2,50	0,37	0,55
3,75	0,40	2,10	0,90	2,84	0,34	0,49
4,25	0,41	1,95	0,85	3,14	0,34	0,47
5	0,42	1,74	0,78	3,52	0,33	0,44
6	0,43	1,57	0,72	3,94	0,33	0,40
7	0,43	1,45	0,66	4,29	0,32	0,37
8	0,43	1,35	0,62	4,59	0,31	0,35
9	0,43	1,28	0,57	4,87	0,29	0,33
10,5	0,44	1,10	0,54	5,31	0,29	0,31
12,5	0,44	1,02	0,48	5,71	0,27	0,27
14,5	0,44	1,02	0,45	6,02	0,25	0,25
16,5	0,44	0,89	0,42	6,34	0,24	0,24
18,5	0,45	0,72	0,39	6,67	0,23	0,22
22	0,45	0,77	0,35	7,04	0,20	0,21
27	0,46	0,68	0,31	7,57	0,17	0,19
32	0,47	0,56	0,28	8,02	0,15	0,17
37	0,48	0,55	0,25	8,35	0,14	0,15
42	0,49	0,47	0,22	8,67	0,12	0,15
47	0,49	0,43	0,20	8,91	0,11	0,13
52	0,50	0,41	0,18	9,15	0,10	0,12
57	0,51	0,36	0,17	9,35	0,09	0,12

Tabelle 5.28. Maximale SUV-Werte von ^{68}Ga -FAP1-04 nach intravenöser Gabe in HT-1080-FAP-tumortragenden Nacktmäusen.

Zeit (min)	Tumor	Niere	Herz	Blase	Muskel	Leber
0,125	0,09	1,25	2,29	0,21	0,08	0,20
0,375	0,22	2,11	2,73	0,23	0,24	1,05
0,75	0,30	2,34	1,99	0,25	0,30	0,96
1,25	0,37	2,62	1,54	0,26	0,33	0,76
1,75	0,42	3,07	1,29	0,28	0,37	0,67
2,25	0,50	3,54	1,23	0,47	0,45	0,63
2,75	0,54	3,25	1,08	0,92	0,41	0,58
3,25	0,55	2,79	0,99	1,46	0,38	0,53
3,75	0,57	2,39	0,92	1,95	0,40	0,52
4,25	0,59	2,07	0,85	2,37	0,38	0,52
5	0,61	1,76	0,79	2,88	0,40	0,47
6	0,63	1,43	0,71	3,46	0,39	0,42
7	0,65	1,18	0,65	3,91	0,37	0,40
8	0,66	1,06	0,61	4,25	0,35	0,40
9	0,67	0,98	0,56	4,52	0,36	0,36
10,5	0,67	0,91	0,53	4,87	0,34	0,35
12,5	0,68	0,80	0,49	5,27	0,33	0,33
14,5	0,68	0,71	0,45	5,62	0,30	0,33
16,5	0,68	0,67	0,43	5,89	0,29	0,32
18,5	0,68	0,63	0,41	6,13	0,30	0,31
22	0,68	0,57	0,38	6,48	0,27	0,29
27	0,68	0,52	0,34	6,87	0,25	0,27
32	0,67	0,51	0,32	7,14	0,25	0,27
37	0,66	0,51	0,30	7,33	0,23	0,27
42	0,66	0,53	0,29	7,44	0,23	0,26
47	0,66	0,60	0,28	7,49	0,22	0,26
52	0,65	0,66	0,28	7,50	0,22	0,26
57	0,65	0,70	0,27	7,50	0,21	0,26

Tabelle 5.29. Maximale SUV-Werte von ^{68}Ga -FAPI-04 nach intravenöser Gabe in SK-LMS-1-tumortragenden Nacktmäusen.

Zeit (min)	Tumor	Niere	Herz	Blase	Muskel	Leber
0,125	0,01	1,47	3,28	0,24	0,02	0,24
0,375	0,05	2,43	2,44	0,23	0,04	0,93
0,75	0,08	2,66	1,84	0,24	0,10	1,18
1,25	0,12	2,97	1,49	0,36	0,11	1,01
1,75	0,14	2,85	1,28	0,70	0,14	0,85
2,25	0,17	2,95	1,20	1,03	0,13	0,81
2,75	0,19	2,91	1,06	1,24	0,16	0,77
3,25	0,20	2,86	0,98	1,40	0,20	0,67
3,75	0,22	2,86	0,91	1,55	0,18	0,62
4,25	0,23	2,82	0,84	1,73	0,17	0,59
5	0,24	2,69	0,76	2,04	0,16	0,53
6	0,26	2,41	0,69	2,50	0,17	0,49
7	0,27	2,02	0,65	2,95	0,16	0,45
8	0,29	1,69	0,61	3,33	0,17	0,44
9	0,30	1,41	0,56	3,67	0,17	0,44
10,5	0,31	1,15	0,53	4,06	0,17	0,40
12,5	0,33	0,94	0,48	4,42	0,16	0,38
14,5	0,34	0,79	0,45	4,72	0,16	0,37
16,5	0,35	0,69	0,43	4,96	0,17	0,35
18,5	0,36	0,62	0,41	5,16	0,17	0,33
22	0,37	0,56	0,37	5,44	0,16	0,31
27	0,39	0,47	0,33	5,75	0,16	0,30
32	0,41	0,42	0,31	5,99	0,15	0,28
37	0,42	0,38	0,28	6,19	0,14	0,27
42	0,43	0,35	0,26	6,35	0,13	0,25
47	0,44	0,34	0,25	6,47	0,14	0,24
52	0,45	0,32	0,23	6,57	0,14	0,24
57	0,45	0,31	0,23	6,64	0,14	0,23

Tabelle 5.30. Maximale SUV-Werte von ^{68}Ga -FAP1-13 nach intravenöser Gabe in HT-1080-FAP-tumortragenden Nacktmäusen.

Zeit (min)	Tumor	Niere	Herz	Blase	Muskel	Leber
0,125	0,02	0,82	2,36	0,19	0,01	0,10
0,375	0,06	1,73	2,00	0,24	0,10	0,96
0,75	0,10	1,87	1,42	0,22	0,13	1,37
1,25	0,13	2,07	1,17	0,23	0,15	1,31
1,75	0,14	2,24	1,05	0,23	0,17	1,23
2,25	0,16	2,55	1,04	0,26	0,19	1,21
2,75	0,16	2,72	0,97	0,26	0,22	1,09
3,25	0,16	2,95	0,88	0,27	0,24	1,01
3,75	0,19	3,20	0,85	0,30	0,24	0,94
4,25	0,17	3,36	0,80	0,41	0,26	0,86
5	0,21	3,34	0,76	0,91	0,25	0,83
6	0,23	3,04	0,70	1,86	0,28	0,77
7	0,22	2,75	0,67	2,75	0,26	0,67
8	0,25	2,52	0,62	3,49	0,26	0,65
9	0,23	2,34	0,59	4,17	0,26	0,63
10,5	0,25	2,10	0,56	5,10	0,29	0,58
12,5	0,25	1,80	0,52	6,24	0,25	0,52
14,5	0,27	1,58	0,49	7,21	0,26	0,50
16,5	0,26	1,44	0,46	8,02	0,27	0,46
18,5	0,25	1,33	0,44	8,72	0,24	0,44
22	0,27	1,19	0,42	9,76	0,26	0,40
27	0,28	1,06	0,38	10,88	0,25	0,36
32	0,27	0,99	0,35	11,60	0,25	0,33
37	0,27	0,96	0,33	12,05	0,25	0,32
42	0,29	0,95	0,32	12,38	0,25	0,30
47	0,26	1,00	0,31	12,56	0,24	0,28
52	0,28	1,07	0,30	12,55	0,24	0,27
57	0,27	1,17	0,29	12,56	0,24	0,27

Tabelle 5.31. Maximale SUV-Werte von ^{68}Ga -FAP1-15 nach intravenöser Gabe in HT-1080-FAP-tumortragenden Nacktmäusen.

	30 min	1 h	2 h	4 h	6 h	24 h
Blut	2,13 ± 0,95	1,20 ± 0,18	0,63 ± 0,05	0,38 ± 0,16	0,26 ± 0,11	0,03 ± 0,01
Herz	0,82 ± 0,21	0,56 ± 0,09	0,38 ± 0,05	0,78 ± 0,60	0,16 ± 0,02	0,09 ± 0,04
Lunge	1,56 ± 0,28	1,02 ± 0,15	0,59 ± 0,01	0,44 ± 0,20	0,26 ± 0,07	0,10 ± 0,02
Milz	0,51 ± 0,13	0,38 ± 0,05	0,26 ± 0,02	0,31 ± 0,17	0,18 ± 0,04	0,21 ± 0,05
Leber	0,55 ± 0,04	0,45 ± 0,07	0,40 ± 0,10	0,34 ± 0,11	0,31 ± 0,07	0,34 ± 0,04
Niere	2,23 ± 0,09	1,60 ± 0,08	1,28 ± 0,13	1,26 ± 0,28	1,34 ± 0,19	1,29 ± 0,30
Muskel	1,77 ± 0,23	1,17 ± 0,33	0,93 ± 0,38	0,52 ± 0,05	0,48 ± 0,13	0,09 ± 0,01
Darm	0,71 ± 0,31	0,37 ± 0,05	0,62 ± 0,09	0,22 ± 0,10	0,18 ± 0,10	0,11 ± 0,01
Gehirn	0,09 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,02	0,07 ± 0,04	0,09 ± 0,04	0,02 ± 0,01
Tumor	3,86 ± 0,44	4,51 ± 0,82	4,70 ± 1,19	4,00 ± 0,56	3,22 ± 1,29	1,12 ± 0,13

Tabelle 5.32. Organverteilung nach intravenöser Gabe von ^{177}Lu -FAP-02 in HT-1080-FAP-tumortragenden Nacktmäusen. Mittelwert ± Standardabweichung; n=3.

	30 min	1 h	2 h	4 h	6 h	24 h
Blut	1,19 ± 0,15	0,63 ± 0,05	0,40 ± 0,09	0,23 ± 0,03	0,15 ± 0,03	0,01 ± 0,00
Herz	0,53 ± 0,05	0,29 ± 0,03	0,20 ± 0,02	0,13 ± 0,02	0,10 ± 0,01	0,02 ± 0,00
Lunge	0,96 ± 0,29	0,71 ± 0,20	0,54 ± 0,26	0,40 ± 0,16	0,14 ± 0,01	0,02 ± 0,00
Milz	0,35 ± 0,03	0,19 ± 0,02	0,16 ± 0,03	0,16 ± 0,02	0,16 ± 0,02	0,06 ± 0,01
Leber	0,43 ± 0,06	0,28 ± 0,01	0,23 ± 0,03	0,22 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,10 ± 0,00
Niere	2,61 ± 0,28	1,52 ± 0,32	1,18 ± 0,21	1,30 ± 0,19	1,43 ± 0,14	0,56 ± 0,07
Muskel	0,71 ± 0,06	0,66 ± 0,19	0,47 ± 0,06	0,29 ± 0,05	0,16 ± 0,07	0,03 ± 0,01
Darm	0,48 ± 0,14	0,18 ± 0,01	0,15 ± 0,03	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,02	0,02 ± 0,00
Gehirn	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Tumor	10,12 ± 3,65	8,52 ± 2,05	8,23 ± 2,29	5,38 ± 0,35	3,37 ± 0,73	0,68 ± 0,11

Tabelle 5.33. Organverteilung nach intravenöser Gabe von ^{177}Lu -FAP-02 in U87MG-tumortragenden Nacktmäusen. Mittelwert ± Standardabweichung; n=3.

	30 min	1 h	2 h	4 h	6 h	24 h
Blut	1,44 ± 0,06	0,83 ± 0,13	0,53 ± 0,07	0,25 ± 0,05	0,17 ± 0,01	0,01 ± 0,01
Herz	0,69 ± 0,05	0,37 ± 0,03	0,29 ± 0,04	0,16 ± 0,03	0,13 ± 0,01	0,03 ± 0,01
Lunge	1,28 ± 0,13	0,72 ± 0,02	0,51 ± 0,09	0,28 ± 0,05	0,20 ± 0,02	0,04 ± 0,00
Milz	0,45 ± 0,01	0,25 ± 0,02	0,21 ± 0,04	0,16 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,07 ± 0,01
Leber	0,52 ± 0,02	0,36 ± 0,02	0,31 ± 0,04	0,24 ± 0,02	0,24 ± 0,01	0,13 ± 0,01
Niere	2,02 ± 0,24	1,45 ± 0,11	1,2 9± 0,24	1,08 ± 0,14	1,03 ± 0,15	0,56 ± 0,03
Muskel	1,34 ± 0,03	0,94 ± 0,17	0,60 ± 0,10	0,42 ± 0,04	0,31 ± 0,08	0,08 ± 0,01
Darm	0,53 ± 0,26	0,30 ± 0,06	0,21 ± 0,06	0,16 ± 0,02	0,11 ± 0,01	0,04 ± 0,01
Gehirn	0,12 ± 0,09	0,05 ± 0,01	0,02 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01
Tumor	5,37 ± 1,62	3,82 ± 0,39	3,19 ± 0,89	1,84 ± 0,45	1,12 ± 0,07	0,41 ± 0,04

Tabelle 5.34. Organverteilung nach intravenöser Gabe von ^{177}Lu -FAPI-02 in Capan-2-tumortragenden Nacktmäusen. Mittelwert ± Standardabweichung; n=3.

	FAPI-02	FAPI-04	FAPI-05	FAPI-10	FAPI-13	FAPI-15
Blut	1,20 ± 0,18	1,70 ± 0,21	1,04 ± 0,17	2,41 ± 0,55	2,20 ± 0,13	2,76 ± 0,39
Herz	0,56 ± 0,09	0,80 ± 0,09	0,56 ± 0,05	1,27 ± 0,21	1,02 ± 0,11	1,39 ± 0,21
Lunge	1,02 ± 0,15	1,50 ± 0,15	1,01 ± 0,09	1,77 ± 0,27	2,00 ± 0,15	2,24 ± 0,34
Milz	0,38 ± 0,05	0,48 ± 0,07	0,34 ± 0,02	0,72 ± 0,10	0,75 ± 0,02	0,93 ± 0,18
Leber	0,45 ± 0,07	0,73 ± 0,12	0,47 ± 0,03	1,18 ± 0,16	1,29 ± 0,15	1,20 ± 0,25
Nieren	1,60 ± 0,08	2,28 ± 0,48	1,48 ± 0,12	10,46 ± 1,50	1,52 ± 0,10	2,19 ± 0,36
Muskel	1,17 ± 0,33	0,92 ± 0,02	1,45 ± 0,23	1,67 ± 0,35	1,36 ± 0,58	1,89 ± 0,38
Darm	0,37 ± 0,05	0,66 ± 0,20	0,54 ± 0,08	0,76 ± 0,15	0,61 ± 0,17	0,94 ± 0,16
Gehirn	0,06 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,02	0,10 ± 0,04	0,12 ± 0,03	0,11 ± 0,02
Tumor	4,51 ± 0,82	4,89 ± 0,82	6,02 ± 0,90	3,19 ± 0,72	6,26 ± 0,57	3,41 ± 1,13

Tabelle 5.35. Organverteilung ausgewählter FAPI-Derivate eine Stunde nach intravenöser Gabe in HT-1080-FAP-tumortragenden Nacktmäusen. Mittelwert ± Standardabweichung; n=3.

	FAPI-02	FAPI-04	FAPI-05	FAPI-10	FAPI-13	FAPI-15
Blut	0,38 ± 0,16	0,81 ± 0,16	0,57 ± 0,08	1,28 ± 0,25	1,29 ± 0,14	1,19 ± 0,12
Herz	0,78 ± 0,60	0,49 ± 0,06	0,35 ± 0,01	0,82 ± 0,18	0,70 ± 0,11	0,62 ± 0,08
Lunge	0,44 ± 0,20	0,84 ± 0,10	0,51 ± 0,04	1,08 ± 0,12	1,35 ± 0,11	1,15 ± 0,03
Milz	0,31 ± 0,17	0,45 ± 0,06	0,28 ± 0,04	0,69 ± 0,12	0,68 ± 0,07	0,76 ± 0,11
Leber	0,34 ± 0,11	0,77 ± 0,19	0,43 ± 0,02	1,24 ± 0,14	1,40 ± 0,10	1,19 ± 0,09
Nieren	1,26 ± 0,28	2,26 ± 0,77	1,21 ± 0,08	8,29 ± 0,67	1,29 ± 0,05	1,95 ± 0,18
Muskel	0,52 ± 0,05	0,82 ± 0,16	0,82 ± 0,06	1,07 ± 0,09	1,80 ± 0,06	1,12 ± 0,15
Darm	0,22 ± 0,10	0,58 ± 0,22	0,24 ± 0,05	0,55 ± 0,23	0,66 ± 0,14	0,67 ± 0,07
Gehirn	0,07 ± 0,04	0,08 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,07 ± 0,01
Tumor	4,00 ± 0,56	5,43 ± 1,51	5,78 ± 0,60	2,91 ± 0,12	8,73 ± 0,77	4,55 ± 0,32

Tabelle 5.36. Organverteilung ausgewählter FAPI-Derivate vier Stunden nach intravenöser Gabe in HT-1080-FAP-tumortragenden Nacktmäusen. Mittelwert ± Standardabweichung; n=3.

	FAPI-02	FAPI-04	FAPI-05	FAPI-10	FAPI-13	FAPI-15
Blut	0,03 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,02	0,21 ± 0,04	0,03 ± 0,01
Herz	0,09 ± 0,04	0,17 ± 0,01	0,10 ± 0,02	0,18 ± 0,03	0,13 ± 0,03	0,12 ± 0,02
Lunge	0,10 ± 0,02	0,27 ± 0,04	0,12 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,24 ± 0,03	0,10 ± 0,01
Milz	0,21 ± 0,05	0,49 ± 0,03	0,31 ± 0,04	0,52 ± 0,08	0,22 ± 0,04	0,46 ± 0,02
Leber	0,34 ± 0,04	1,21 ± 0,05	0,62 ± 0,10	1,16 ± 0,07	1,08 ± 0,30	0,99 ± 0,06
Nieren	1,29 ± 0,30	2,07 ± 0,17	0,75 ± 0,07	6,70 ± 0,65	0,55 ± 0,08	0,85 ± 0,20
Muskel	0,09 ± 0,01	0,29 ± 0,02	0,35 ± 0,04	0,20 ± 0,01	0,38 ± 0,06	0,16 ± 0,04
Darm	0,11 ± 0,01	0,30 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,15 ± 0,03	0,30 ± 0,15	0,08 ± 0,02
Gehirn	0,02 ± 0,01	0,04 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,01 ± 0,00
Tumor	1,12 ± 0,13	2,97 ± 0,23	2,78 ± 0,40	1,10 ± 0,04	4,78 ± 1,71	1,06 ± 0,25

Tabelle 5.37. Organverteilung ausgewählter FAPI-Derivate 24 Stunden nach intravenöser Gabe in HT-1080-FAP-tumortragenden Nacktmäusen. Mittelwert ± Standardabweichung; n=3.

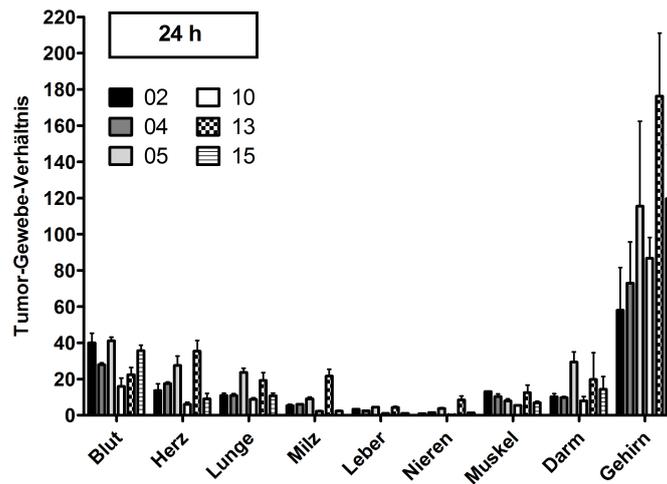
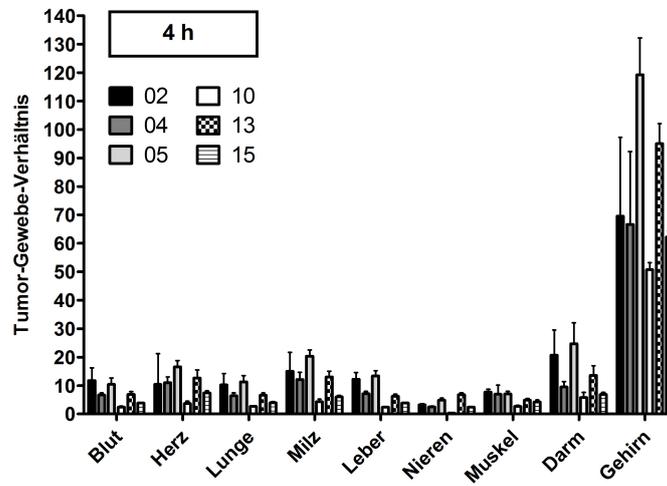
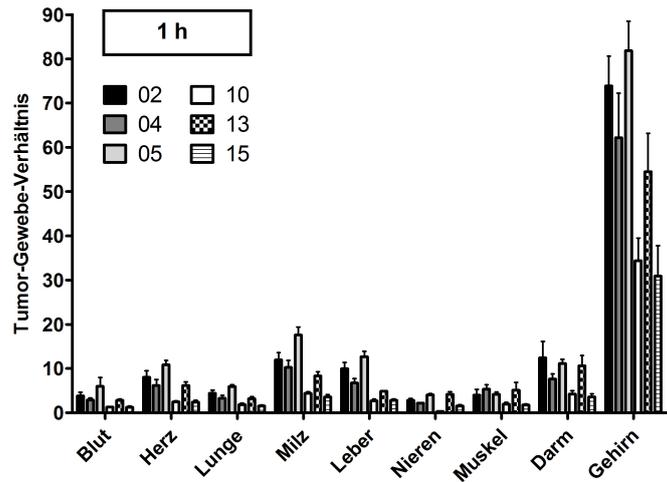


Abbildung 5.1. Tumor-Gewebe-Verhältnis der untersuchten FAPI-Derivate nach einer, vier und 24 Stunden in HT-1080-FAP-tumortragenden Mäusen; n=3.

Klinische Daten

DOTA-(MC-FA-012)₃

	1 h	3 h
Aorta	2,26 ± 1,01	1,93 ± 0,48
Darm	1,62 ± 0,53	1,81 ± 0,77
Gehirn	0,28 ± 0,14	0,35 ± 0,14
Glutealmuskel	1,15 ± 0,19	1,39 ± 0,35
Leber	3,19 ± 1,55	3,82 ± 2,15
Lunge	1,05 ± 0,57	1,04 ± 0,57
Milz	2,42 ± 0,46	2,63 ± 0,65
Nieren	85,83 ± 22,12	115,50 ± 23,23
Primärtumor	4,39 ± 2,89	5,70 ± 5,01
Metastasen	4,95 ± 2,58	4,72 ± 2,74

Tabelle 5.38. Maximale SUV-Werte nach intravenöser Injektion von ⁶⁸Ga-DOTA-(MC-FA-012)₃ in Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom. Mittelwert ± Standardabweichung; n(Organe)=8; n(Primärtumor)=7; n(Metastasen)=41.

	1 h	3 h
Tu/Aorta	2,611 ± 1,478	2,803 ± 1,157
Tu/Darm	3,398 ± 1,532	3,993 ± 3,827
Tu/Gehirn	22,331 ± 12,624	14,639 ± 6,146
Tu/Leber	2,007 ± 1,402	1,845 ± 1,235
Tu/Lunge	5,225 ± 1,877	5,549 ± 2,177
Tu/Milz	1,936 ± 1,005	2,065 ± 0,794
Tu/Niere	0,061 ± 0,024	0,047 ± 0,022

Tabelle 5.39. Tumor-Gewebe-Verhältnis nach intravenöser Injektion von ⁶⁸Ga-DOTA-(MC-FA-012)₃ in Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom. Mittelwert ± Standardabweichung; n=8.

FAPI-Derivate

	FAPI-02	FAPI-04
Blase	86,24 ± 68,83	53,27 ± 60,89
Colon	1,25 ± 0,28	1,30 ± 0,36
Gehirn	0,27 ± 0,25	0,15 ± 0,09
Herz	2,24 ± 0,81	1,14 ± 0,22
Leber	1,99 ± 0,42	1,09 ± 0,25
Lunge	0,91 ± 0,08	0,52 ± 0,14
Milz	2,00 ± 0,49	1,06 ± 0,19
Muskel	1,28 ± 0,22	1,26 ± 0,17
Nieren	3,72 ± 0,82	1,56 ± 0,28
Pankreas	2,05 ± 0,58	1,72 ± 0,92
Schilddrüse	2,51 ± 0,41	1,96 ± 0,61
Tumor	12,32 ± 3,36	14,83 ± 7,39

Tabelle 5.40. Maximale SUV-Werte eine Stunde nach intravenöser Injektion von ^{68}Ga -FAPI-02 bzw. -04 in Patienten mit unterschiedlichen Tumorentitäten. Mittelwert ± Standardabweichung; n=5.

	FAPI-02	FAPI-04
Tu/Colon	10,59 ± 4,51	12,19 ± 7,11
Tu/Gehirn	80,76 ± 60,23	82,53 ± 32,12
Tu/Herz	5,96 ± 2,43	13,17 ± 6,12
Tu/Leber	6,45 ± 2,47	13,79 ± 6,17
Tu/Lunge	13,68 ± 4,26	31,50 ± 22,68
Tu/Milz	6,42 ± 2,44	14,69 ± 6,12
Tu/Muskel	10,26 ± 4,42	11,50 ± 4,43
Tu/Nieren	3,46 ± 1,35	9,89 ± 5,73
Tu/Pankreas	6,72 ± 2,06	11,53 ± 8,82

Tabelle 5.41. Tumor-Gewebe-Verhältnis eine Stunde nach intravenöser Injektion von ^{68}Ga -FAPI-02 bzw. -04 in Patienten mit unterschiedlichen Tumorentitäten. Mittelwert ± Standardabweichung; n=5.

Literaturverzeichnis

- [1] A. Jemal, F. Bray, M. M. Center, et al. Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin*, 61(2):69–90, 2011.
- [2] B. W. Stewart and C. P. Wild. World Cancer Report 2014. Report, International Agency for Research on Cancer, 2014.
- [3] Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert-Koch-Institut. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Report, 2016.
- [4] P. Younger. Gale encyclopedia of cancer: a guide to cancer and its treatments, 3rd edition, 2011.
- [5] NTP (National Toxicology Program). Report on carcinogens, fourteenth edition. Report, Research Triangle Park, NC: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, 2016.
- [6] S. S. Khariwala, B. Ma, C. Ruszczak, et al. High level of tobacco carcinogen-derived DNA damage in oral cells is an independent predictor of oral/head and neck cancer risk in smokers. *Cancer Prev Res (Phila)*, 10(9):507–513, 2017.
- [7] S. Peterson, J. W. Lampe, T. K. Bammler, et al. Apiaceous vegetable constituents inhibit human cytochrome P-450 1A2 (hCYP1A2) activity and hCYP1A2-mediated mutagenicity of aflatoxin B1. *Food Chem Toxicol*, 44(9):1474–84, 2006.
- [8] J. M. Walboomers, M. V. Jacobs, M. M. Manos, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*, 189(1):12–9, 1999.
- [9] M. Hatakeyama and H. Higashi. Helicobacter pylori CagA: a new paradigm for bacterial carcinogenesis. *Cancer Sci*, 96(12):835–43, 2005.

- [10] T. Rustagi and C. A. Dasanu. Risk factors for gallbladder cancer and cholangiocarcinoma: similarities, differences and updates. *J Gastrointest Cancer*, 43(2):137–47, 2012.
- [11] S. V. Ukraintseva and A. I. Yashin. Opposite phenotypes of cancer and aging arise from alternative regulation of common signaling pathways. *Ann N Y Acad Sci*, 1010:489–92, 2003.
- [12] D. Hanahan and R. A. Weinberg. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1):57–70, 2000.
- [13] D. Hanahan and R. A. Weinberg. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5):646–74, 2011.
- [14] G. Awada, H. R. Kourie, and A. H. Awada. Novel mechanisms and approaches in the medical therapy of solid cancers. *Discov Med*, 20(108):33–41, 2015.
- [15] K. Shiga, M. Hara, T. Nagasaki, et al. Cancer-associated fibroblasts: Their characteristics and their roles in tumor growth. *Cancers (Basel)*, 7(4):2443–58, 2015.
- [16] A. M. Scott, G. Wiseman, S. Welt, et al. A phase I dose-escalation study of sibrutumab in patients with advanced or metastatic fibroblast activation protein-positive cancer. *Clin Cancer Res*, 9(5):1639–47, 2003.
- [17] D. F. Quail and J. A. Joyce. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med*, 19(11):1423–37, 2013.
- [18] M. R. Junttila and F. J. de Sauvage. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature*, 501(7467):346–54, 2013.
- [19] H. F. Dvorak. Tumors: wounds that do not heal. similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med*, 315(26):1650–9, 1986.
- [20] W. N. Brennen, J. T. Isaacs, and S. R. Denmeade. Rationale behind targeting fibroblast activation protein-expressing carcinoma-associated fibroblasts as a novel chemotherapeutic strategy. *Mol Cancer Ther*, 11(2):257–66, 2012.
- [21] N. E. Sounni and A. Noel. Targeting the tumor microenvironment for cancer therapy. *Clin Chem*, 59(1):85–93, 2013.
- [22] C. Sawyers. Targeted cancer therapy. *Nature*, 432(7015):294–7, 2004.

- [23] A. Abdelmoez, D. C. Coraca-Huber, G. C. Thurner, et al. Screening and identification of molecular targets for cancer therapy. *Cancer Lett*, 2016.
- [24] D. Hanahan and L. M. Coussens. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*, 21(3):309–22, 2012.
- [25] K. Pietras and A. Ostman. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp Cell Res*, 316(8):1324–31, 2010.
- [26] A. K. Mitra, M. Zillhardt, Y. Hua, et al. MicroRNAs reprogram normal fibroblasts into cancer-associated fibroblasts in ovarian cancer. *Cancer Discov*, 2(12):1100–8, 2012.
- [27] A. Toullec, D. Gerald, G. Despouy, et al. Oxidative stress promotes myofibroblast differentiation and tumour spreading. *EMBO Mol Med*, 2(6):211–30, 2010.
- [28] S. Wen, Y. Niu, S. Yeh, et al. BM-MSCs promote prostate cancer progression via the conversion of normal fibroblasts to cancer-associated fibroblasts. *Int J Oncol*, 47(2):719–27, 2015.
- [29] C. Jotzu, E. Alt, G. Welte, et al. Adipose tissue-derived stem cells differentiate into carcinoma-associated fibroblast-like cells under the influence of tumor-derived factors. *Anal Cell Pathol (Amst)*, 33(2):61–79, 2010.
- [30] C. E. Weber, A. N. Kothari, P. Y. Wai, et al. Osteopontin mediates an MZF1-TGF-beta1-dependent transformation of mesenchymal stem cells into cancer-associated fibroblasts in breast cancer. *Oncogene*, 34(37):4821–33, 2015.
- [31] R. Kalluri and R. A. Weinberg. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*, 119(6):1420–8, 2009.
- [32] P. O’Brien and B. F. O’Connor. Seprase: an overview of an important matrix serine protease. *Biochim Biophys Acta*, 1784(9):1130–45, 2008.
- [33] T. Kelly. Fibroblast activation protein-alpha and dipeptidyl peptidase IV (CD26): cell-surface proteases that activate cell signaling and are potential targets for cancer therapy. *Drug Resist Updat*, 8(1-2):51–8, 2005.
- [34] A. Loktev, T. Lindner, W. Mier, et al. A new method for tumor imaging by targeting cancer associated fibroblasts. *J Nucl Med*, 2018.

- [35] P. Garin-Chesa, L. J. Old, and W. J. Rettig. Cell surface glycoprotein of reactive stromal fibroblasts as a potential antibody target in human epithelial cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(18):7235–9, 1990.
- [36] A. M. Santos, J. Jung, N. Aziz, et al. Targeting fibroblast activation protein inhibits tumor stromagenesis and growth in mice. *J Clin Invest*, 119(12):3613–25, 2009.
- [37] S. Welt, C. R. Divgi, A. M. Scott, et al. Antibody targeting in metastatic colon cancer: a phase I study of monoclonal antibody F19 against a cell-surface protein of reactive tumor stromal fibroblasts. *J Clin Oncol*, 12(6):1193–203, 1994.
- [38] R. D. Hofheinz, S. E. al Batran, F. Hartmann, et al. Stromal antigen targeting by a humanised monoclonal antibody: an early phase II trial of sibrotuzumab in patients with metastatic colorectal cancer. *Onkologie*, 26(1):44–8, 2003.
- [39] J. Zhang, M. Valianou, H. Simmons, et al. Identification of inhibitory scFv antibodies targeting fibroblast activation protein utilizing phage display functional screens. *FASEB J*, 27(2):581–9, 2013.
- [40] A. Schmidt, D. Muller, M. Mersmann, et al. Generation of human high-affinity antibodies specific for the fibroblast activation protein by guided selection. *Eur J Biochem*, 268(6):1730–8, 2001.
- [41] M. Mersmann, A. Schmidt, J. F. Rippmann, et al. Human antibody derivatives against the fibroblast activation protein for tumor stroma targeting of carcinomas. *Int J Cancer*, 92(2):240–8, 2001.
- [42] E. Fischer, K. Chaitanya, T. Wuest, et al. Radioimmunotherapy of fibroblast activation protein positive tumors by rapidly internalizing antibodies. *Clin Cancer Res*, 18(22):6208–18, 2012.
- [43] N. Hornig, V. Kermer, K. Frey, et al. Combination of a bispecific antibody and costimulatory antibody-ligand fusion proteins for targeted cancer immunotherapy. *J Immunother*, 35(5):418–29, 2012.
- [44] L. C. Wang, A. Lo, J. Scholler, et al. Targeting fibroblast activation protein in tumor stroma with chimeric antigen receptor T cells can inhibit tumor growth and augment host immunity without severe toxicity. *Cancer Immunol Res*, 2(2):154–66, 2014.

- [45] Y. Wen, C. T. Wang, T. T. Ma, et al. Immunotherapy targeting fibroblast activation protein inhibits tumor growth and increases survival in a murine colon cancer model. *Cancer Sci*, 101(11):2325–32, 2010.
- [46] J. Lee, M. Fassnacht, S. Nair, et al. Tumor immunotherapy targeting fibroblast activation protein, a product expressed in tumor-associated fibroblasts. *Cancer Res*, 65(23):11156–63, 2005.
- [47] W. N. Brennan, D. M. Rosen, H. Wang, et al. Targeting carcinoma-associated fibroblasts within the tumor stroma with a fibroblast activation protein-activated prodrug. *J Natl Cancer Inst*, 104(17):1320–34, 2012.
- [48] K. Narra, S. R. Mullins, H. O. Lee, et al. Phase II trial of single agent Val-boroPro (Talabostat) inhibiting fibroblast activation protein in patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer Biol Ther*, 6(11):1691–9, 2007.
- [49] R. M. Eager, C. C. Cunningham, N. Senzer, et al. Phase II trial of talabostat and docetaxel in advanced non-small cell lung cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 21(6):464–72, 2009.
- [50] R. M. Eager, C. C. Cunningham, N. N. Senzer, et al. Phase II assessment of talabostat and cisplatin in second-line stage IV melanoma. *BMC Cancer*, 9:263, 2009.
- [51] C. C. Cunningham. Talabostat. *Expert Opin Investig Drugs*, 16(9):1459–65, 2007.
- [52] S. Adams, G. T. Miller, M. I. Jesson, et al. PT-100, a small molecule dipeptidyl peptidase inhibitor, has potent antitumor effects and augments antibody-mediated cytotoxicity via a novel immune mechanism. *Cancer Res*, 64(15):5471–80, 2004.
- [53] E. Ostermann, P. Garin-Chesa, K. H. Heider, et al. Effective immunoconjugate therapy in cancer models targeting a serine protease of tumor fibroblasts. *Clin Cancer Res*, 14(14):4584–92, 2008.
- [54] E. Tran, D. Chinnasamy, Z. Yu, et al. Immune targeting of fibroblast activation protein triggers recognition of multipotent bone marrow stromal cells and cachexia. *J Exp Med*, 210(6):1125–35, 2013.
- [55] K. N. Lee, K. W. Jackson, V. J. Christiansen, et al. Antiplasmin-cleaving enzyme is a soluble form of fibroblast activation protein. *Blood*, 107(4):1397–404, 2006.

- [56] F. M. Keane, T. W. Yao, S. Seelk, et al. Quantitation of fibroblast activation protein (FAP)-specific protease activity in mouse, baboon and human fluids and organs. *FEBS Open Bio*, 4:43–54, 2013.
- [57] G. P. Smith. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 228(4705):1315–7, 1985.
- [58] A. E. Nixon, D. J. Sexton, and R. C. Ladner. Drugs derived from phage display: from candidate identification to clinical practice. *MAbs*, 6(1):73–85, 2014.
- [59] P. Molek, B. Strukelj, and T. Bratkovic. Peptide phage display as a tool for drug discovery: targeting membrane receptors. *Molecules*, 16(1):857–87, 2011.
- [60] I. Rasched and E. Oberer. Ff coliphages: structural and functional relationships. *Microbiol Rev*, 50(4):401–27, 1986.
- [61] K. Omidfar and M. Daneshpour. Advances in phage display technology for drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*, 10(6):651–69, 2015.
- [62] G. A. Kuzmicheva and V. A. Belyavskaya. [peptide phage display in biotechnology and biomedicine]. *Biomed Khim*, 62(5):481–495, 2016.
- [63] S. S. Sidhu, W. J. Fairbrother, and K. Deshayes. Exploring protein-protein interactions with phage display. *Chembiochem*, 4(1):14–25, 2003.
- [64] H. B. Lowman, S. H. Bass, N. Simpson, et al. Selecting high-affinity binding proteins by monovalent phage display. *Biochemistry*, 30(45):10832–8, 1991.
- [65] H. M. Azzazy and Jr. Highsmith, W. E. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clin Biochem*, 35(6):425–45, 2002.
- [66] U. H. Weidle, J. Auer, U. Brinkmann, et al. The emerging role of new protein scaffold-based agents for treatment of cancer. *Cancer Genomics Proteomics*, 10(4):155–68, 2013.
- [67] U. Dietrich, R. Durr, and J. Koch. Peptides as drugs: from screening to application. *Curr Pharm Biotechnol*, 14(5):501–12, 2013.
- [68] Z. Zhou, C. Zhao, L. Wang, et al. A VEGFR1 antagonistic peptide inhibits tumor growth and metastasis through VEGFR1-PI3K-AKT signaling pathway inhibition. *Am J Cancer Res*, 5(10):3149–61, 2015.

- [69] L. R. Krumpe and T. Mori. The use of phage-displayed peptide libraries to develop tumor-targeting drugs. *Int J Pept Res Ther*, 12(1):79–91, 2006.
- [70] G. L. Verdine and G. J. Hilinski. Stapled peptides for intracellular drug targets. *Methods Enzymol*, 503:3–33, 2012.
- [71] R. J. Hosse, A. Rothe, and B. E. Power. A new generation of protein display scaffolds for molecular recognition. *Protein Sci*, 15(1):14–27, 2006.
- [72] P. Forrer, M. T. Stumpp, H. K. Binz, et al. A novel strategy to design binding molecules harnessing the modular nature of repeat proteins. *FEBS Lett*, 539(1-3):2–6, 2003.
- [73] S. Chen, J. Morales-Sanfrutos, A. Angelini, et al. Structurally diverse cyclisation linkers impose different backbone conformations in bicyclic peptides. *Chembiochem*, 13(7):1032–8, 2012.
- [74] D. J. Craik, J. E. Swedberg, J. S. Mylne, et al. Cyclotides as a basis for drug design. *Expert Opin Drug Discov*, 7(3):179–94, 2012.
- [75] C. D’Souza, S. T. Henriques, C. K. Wang, et al. Using the MCoTI-II cyclotide scaffold to design a stable cyclic peptide antagonist of SET, a protein overexpressed in human cancer. *Biochemistry*, 55(2):396–405, 2016.
- [76] A. Heitz, D. Le-Nguyen, and L. Chiche. Min-21 and Min-23, the smallest peptides that fold like a cystine-stabilized beta-sheet motif: design, solution structure, and thermal stability. *Biochemistry*, 38(32):10615–25, 1999.
- [77] F. Zoller, A. Markert, P. Barthe, et al. Combination of phage display and molecular grafting generates highly specific tumor-targeting miniproteins. *Angew Chem Int Ed Engl*, 51(52):13136–9, 2012.
- [78] C. Souriau, L. Chiche, R. Irving, et al. New binding specificities derived from Min-23, a small cystine-stabilized peptidic scaffold. *Biochemistry*, 44(19):7143–55, 2005.
- [79] R. G. Boy, W. Mier, E. M. Nothelfer, et al. Sunflower trypsin inhibitor 1 derivatives as molecular scaffolds for the development of novel peptidic radiopharmaceuticals. *Mol Imaging Biol*, 12(4):377–85, 2010.

- [80] M. L. Korsinczky, H. J. Schirra, and D. J. Craik. Sunflower trypsin inhibitor-1. *Curr Protein Pept Sci*, 5(5):351–64, 2004.
- [81] A. Gitlin, D. Debowski, N. Karna, et al. Inhibitors of Matriptase-2 based on the trypsin inhibitor SFTI-1. *Chembiochem*, 16(11):1601–7, 2015.
- [82] D. A. Jaffray and M. K. Gospodarowicz. *Radiation Therapy for Cancer*. Washington (DC), 2015.
- [83] M. Schiebe and K. Lackner. *Perkutane Radiotherapie*, pages 550–555. Springer Berlin Heidelberg, 2006.
- [84] M. Cremonesi, M. Ferrari, L. Bodei, et al. Dosimetry in peptide radionuclide receptor therapy: a review. *J Nucl Med*, 47(9):1467–75, 2006.
- [85] C. Kumar, N. Shetake, S. Desai, et al. Relevance of radiobiological concepts in radionuclide therapy of cancer. *Int J Radiat Biol*, pages 1–14, 2016.
- [86] S. Del Vecchio, A. Zannetti, R. Fonti, et al. Nuclear imaging in cancer theranostics. *Q J Nucl Med Mol Imaging*, 51(2):152–63, 2007.
- [87] R. Kumar, H. Dhanpathi, S. Basu, et al. Oncologic PET tracers beyond [(18)F]FDG and the novel quantitative approaches in PET imaging. *Q J Nucl Med Mol Imaging*, 52(1):50–65, 2008.
- [88] K. Jansen, L. Heirbaut, J. D. Cheng, et al. Selective inhibitors of fibroblast activation protein (FAP) with a (4-Quinolinoyl)-glycyl-2-cyanopyrrolidine scaffold. *ACS Med Chem Lett*, 4(5):491–6, 2013.
- [89] T. Lindner, A. Loktev, A. Altmann, et al. Development of quinoline based theranostic ligands for the targeting of fibroblast activation protein. *J Nucl Med*, 2018.
- [90] H. B. Shin, H. Sheen, H. Y. Lee, et al. Digital imaging and communications in medicine (DICOM) information conversion procedure for SUV calculation of PET scanners with different DICOM header information. *Phys Med*, 2017.
- [91] Y. Sugawara, K. R. Zasadny, A. W. Neuhoff, et al. Reevaluation of the standardized uptake value for FDG: variations with body weight and methods for correction. *Radiology*, 213(2):521–5, 1999.

- [92] C. Y. Edosada, C. Quan, T. Tran, et al. Peptide substrate profiling defines fibroblast activation protein as an endopeptidase of strict gly(2)-Pro(1)-cleaving specificity. *FEBS Lett*, 580(6):1581–6, 2006.
- [93] E. Vegt, M. Melis, A. Eek, et al. Renal uptake of different radiolabelled peptides is mediated by megalin: SPECT and biodistribution studies in megalin-deficient mice. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 38(4):623–32, 2011.
- [94] E. I. Christensen and H. Birn. Megalin and cubilin: multifunctional endocytic receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(4):256–66, 2002.
- [95] R. Dagil, C. O’Shea, A. Nykjaer, et al. Gentamicin binds to the megalin receptor as a competitive inhibitor using the common ligand binding motif of complement type repeats: insight from the nmr structure of the 10th complement type repeat domain alone and in complex with gentamicin. *J Biol Chem*, 288(6):4424–35, 2013.
- [96] H. Akizawa, T. Uehara, and Y. Arano. Renal uptake and metabolism of radiopharmaceuticals derived from peptides and proteins. *Adv Drug Deliv Rev*, 60(12):1319–28, 2008.
- [97] L. Bodei, M. Cremonesi, M. Ferrari, et al. Long-term evaluation of renal toxicity after peptide receptor radionuclide therapy with ^{90}Y -DOTATOC and ^{177}Lu -DOTATATE: the role of associated risk factors. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 35(10):1847–56, 2008.
- [98] A. Imhof, P. Brunner, N. Marincek, et al. Response, survival, and long-term toxicity after therapy with the radiolabeled somatostatin analogue ^{90}Y -DOTA]-TOC in metastasized neuroendocrine cancers. *J Clin Oncol*, 29(17):2416–23, 2011.
- [99] R. Valkema, S. A. Pauwels, L. K. Kvols, et al. Long-term follow-up of renal function after peptide receptor radiation therapy with $(^{90}\text{Y})\text{DOTA}(0),\text{Tyr}(3)\text{-octreotide}$ and $(^{177}\text{Lu})\text{DOTA}(0),\text{Tyr}(3)\text{-octreotate}$. *J Nucl Med*, 46 Suppl 1:83S–91S, 2005.
- [100] J. V. Taggart. Tubular transport mechanisms. *Am J Med*, 9(5):678–90, 1950.
- [101] D. W. Nierenberg. Drug inhibition of penicillin tubular secretion: concordance between in vitro and clinical findings. *J Pharmacol Exp Ther*, 240(3):712–6, 1987.

- [102] P. Busek, E. Balaziová, I. Matrasová, et al. Fibroblast activation protein alpha is expressed by transformed and stromal cells and is associated with mesenchymal features in glioblastoma. *Tumour Biol*, 37(10):13961–13971, 2016.
- [103] J. Trylčová, P. Busek, Jr. Smetana, K., et al. Effect of cancer-associated fibroblasts on the migration of glioma cells in vitro. *Tumour Biol*, 36(8):5873–9, 2015.
- [104] R. Webster, V. Elliot, B.K. Park, et al. *PEG and PEG conjugates toxicity: towards an understanding of the toxicity of PEG and its relevance to PEGylated biologicals*. PEGylated Protein Drugs: Basic Science and Clinical Applications. Milestones in Drug Therapy. Birkhäuser Basel, 2009.
- [105] S. Bauer, M. C. Jendro, A. Wadle, et al. Fibroblast activation protein is expressed by rheumatoid myofibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Res Ther*, 8(6):R171, 2006.
- [106] E. J. Hamson, F. M. Keane, S. Tholen, et al. Understanding fibroblast activation protein (FAP): substrates, activities, expression and targeting for cancer therapy. *Proteomics Clin Appl*, 8(5-6):454–63, 2014.
- [107] C. Egger, C. Cagnet, C. Gerard, et al. Effects of the fibroblast activation protein inhibitor, PT100, in a murine model of pulmonary fibrosis. *Eur J Pharmacol*, 809:64–72, 2017.
- [108] S. Uitte de Willige, J. J. Malfliet, H. L. Janssen, et al. Increased N-terminal cleavage of alpha-2-antiplasmin in patients with liver cirrhosis. *J Thromb Haemost*, 11(11):2029–36, 2013.
- [109] J. Tillmanns, D. Hoffmann, Y. Habbaba, et al. Fibroblast activation protein alpha expression identifies activated fibroblasts after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*, 87:194–203, 2015.
- [110] C. K. Nagaraju, E. Dries, N. Popovic, et al. Global fibroblast activation throughout the left ventricle but localized fibrosis after myocardial infarction. *Sci Rep*, 7(1):10801, 2017.

Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei den vielen Menschen bedanken, die mich während der herausfordernden, aber auch ungemein spannenden und lehrreichen Zeit meiner Promotion begleitet und durch ihre Unterstützung diese Arbeit ermöglicht haben.

Mein besonderer Dank gilt:

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Walter Mier für die Möglichkeit, die Promotion in einem abwechslungsreichen, interdisziplinären Arbeitsumfeld durchzuführen und seine herzliche Offenheit, mit der ich vom ersten Tag an in seinem Labor aufgenommen wurde. Vielen Dank für die stetige Unterstützung und Betreuung während der gesamten Promotionszeit sowie die Übernahme des Erstgutachtens.

Prof. Dr. Gert Fricker für die Übernahme des Zweitgutachtens und Prof. Dr. Walter-Emil Haefeli für die Teilnahme an der Prüfungskommission.

Prof. Dr. Uwe Haberkorn für die großartige Betreuung und Unterstützung meiner Arbeit, die fortlaufende Diskussions- und Hilfsbereitschaft sowie seinen grenzenlosen Optimismus, der besonders in kritischen Phasen sehr wertvoll war.

Dr. Annette Altmann für die intensive, vertrauensvolle Betreuung, die mir zugleich ein hohes Maß an wissenschaftlicher Freiheit erlaubte, was ich sehr zu schätzen weiß. Darüber hinaus gilt ihr mein besonderer Dank für die gründliche Korrektur dieser Arbeit, in einer Weise, die durchaus nicht selbstverständlich ist.

Dr. Matthias Eder und Dr. Stefan Seitz für die Teilnahme am Thesis Advisory Committee und die vielen hilfreichen Anregungen zur Optimierung des Phagen-Displays.

Dr. Matin Daneschdar, Dr. Joycelyn Wüstehübe-Lausch und Dr. Hans-Ullrich Schmoldt von der Firma Biontech AG für den wissenschaftlichen Austausch und die Bereitstellung der CHO-Zelltransfektanten.

Ein großes Dankeschön gilt meinen Kolleginnen Ulrike Bauder-Wüst, Christiane Brenner, Gabriela Glensch, Ulrike Hebling, Vanessa Kohl, Bettina Kraft, Irina Kupin, Ursula Schierbaum, Marlene Tesch, Sabine Weiß und Iris Wolf für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Unterstützung im molekularbiologischen Labor sowie bei den Tierversuchen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Karin Leotta für ihre stets unkomplizierte und zum Teil unverhofft spontane Durchführung der Kleintier-Bildgebungsstudien.

Allen Kollegen aus dem Radiopharmazie-Labor, insbesondere Dr. Sebastian Brings, Dr. Susanne Krämer, Dr. Christian Kleist, Dr. Max Sauter, Dr. Philipp Uhl und Dr. Artjom Wischnjow für die vielen fachlichen und nicht-fachlichen Gespräche und Anregungen. Besonderer Dank gilt Dr. Thomas Lindner für die Synthese eines Großteils der Verbindungen und die Unterstützung in allen chemischen Fragen.

Ein besonderer Dank gilt meinem Kollegen und guten Freund Martin Müller, den ich während meiner Promotionszeit außerordentlich zu schätzen gelernt habe und der mir auch in schwierigen Phasen stets zur Seite stand. Vielen Dank für die vielen fachlichen und persönlichen Gespräche und Ratschläge, für die Heiterkeiten, Anekdoten und Erzählungen und insbesondere für's aufmerksame Zuhören.

Ein großes Dankeschön gebührt auch dem Doktorandenprogramm des DKFZ, welches mir die Teilnahme an einer Vielzahl von spannenden wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Vorträgen, Kursen und Konferenzen ermöglicht hat. Darüber hinaus hat das DKFZ mit seinem breiten wissenschaftlichen Angebot einen Großteil der Experimente überhaupt erst möglich gemacht. Damit gilt mein Dank besonders den Core Facilities Mikroskopie, Proteomics and Genomics, insbesondere Agnes Hotz-Wagenblatt und Karl-Heinz Glatting für die Unterstützung bei den Sequenzierungs-Auswertungen, dem Zentrum für präklinische Forschung für die Versorgung der Versuchstiere sowie der Zentralbibliothek für die schnelle Bereitstellung jeder erdenklichen Publikation.

Darüber hinaus gilt mein Dank all meinen Freunden, mit denen ich Freude und Enttäuschungen teilen durfte und deren Rückhalt ungemein wertvoll für mich war.

Zu guter Letzt, doch mit besonderer Betonung, ein herzliches Dankeschön an meine großartige Familie, die mir in jeder Lebenslage beisteht und auf die ich mich bedingungslos verlassen kann. Ich schätze mich sehr glücklich, dass ich euch habe.