

# Die Rolle der Chemie in der Entwicklung einer Krebstherapie durch die Bor-Neutroneneinfangreaktion

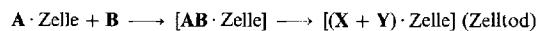
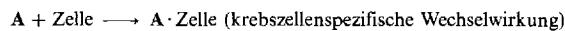
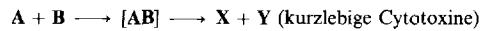
Von M. Frederick Hawthorne\*

Professor Heinrich Nöth zum 65. Geburtstag gewidmet

Ein Therapieverfahren, das Tumorzellen in Gegenwart gesunder Zellen selektiv zerstört, ist das große Ziel der Onkologen und würde möglicherweise die Rettung für Krebspatienten bedeuten, die an einer der derzeit noch unheilbaren Krebsformen wie Hirntumor und malignes Melanom erkrankt sind. Eine selektive Zellzerstörung ist prinzipiell mit einer Therapie möglich, die auf der Reaktion des  $^{10}\text{B}$ -Kerns mit einem Neutron geringer kinetischer Energie (thermisches Neutron) beruht. Diese Kernreaktion liefert als Produkte  $^{4}\text{He}^{2+}$ - und  $^{7}\text{Li}^{3+}$ -Ionen, etwa 2.4 MeV kinetische Energie sowie etwas  $\gamma$ -Strahlung. Da die energiereichen und cytotoxischen Produkt-Ionen im Gewebe nur eine freie Weglänge von etwa einem Zeldurchmesser haben, könnte man den zu zerstörenden Zelltyp dadurch kennzeichnen, daß man nur an oder in ihn  $^{10}\text{B}$ -Kerne plaziert. In dieser Übersicht beschreibe ich den derzeitigen Stand der chemischen Forschung zu diesem Therapieverfahren (Bor-Neutroneneinfangtherapie, BNCT), dessen multidisziplinärer Charakter natürlich nicht nur den Einsatz von Chemie, sondern auch den von Biologie, Kernphysik, Medizin und verwandten Spezialgebieten erfordert. Methoden, die entwickelt wurden, um  $^{10}\text{B}$ -Kerne in Krebszellen zu plazieren, werden in Beziehung gesetzt zu allgemeinen Zellstrukturen und zu den verschiedenen Zellkompartimenten, in denen sich die Borverbindungen befinden können. Es werden sowohl die Methoden zur Synthese von borhaltigen Biomolekülen und Medikamenten als auch repräsentative Befunde zu deren Effektivität bei der gezielten Anreicherung in Krebszellen vorgestellt. Die Aussichten für eine wirkungsvolle BNCT sind dank rascher Entwicklung z.B. auf den Gebieten bioorganische Chemie, Mikrobiologie, Immunologie und Kernchemie sehr gut. Es konnten effektive Borlieferersysteme identifiziert werden, die durch die Zusammenarbeit von Chemie und Biologie sicherlich noch weiter verbessert werden können.

## 1. Einleitung

Ist es möglich und was würde es bringen, ein ungiftiges Molekül **A** selektiv an Krebszellen zu binden, um dann ausschließlich diese bösartigen Zellen zu zerstören, indem man das zellgebundene **A** durch Aktivierung mit einem zweiten ungiftigen Reagens **B** in ein tödliches Cytotoxin überführt? Man hätte damit eine *binäre* Krebstherapie entwickelt, deren Selektivität, Wirksamkeit und Sicherheit besser wären als die der derzeit gebräuchlichen, auf der Verwendung nur eines Agens beruhenden Verfahren der Strahlen- und Chemotherapie. Zudem hätte man dann die Möglichkeit, Tumore zu zerstören, die zur Zeit noch nicht langfristig kontrollierbar sind. Eine solche *binäre Therapie* setzt voraus, daß die harmlosen Moleküle **A** und **B** miteinander sehr leicht reagieren, daß die dabei entstehenden extrem energiereichen Produkte



Schema 1. Eine hypothetische binäre cytotoxische Reaktion, bei der aus zwei harmlosen Agentien **A** und **B** die zelltötenden Reaktionsprodukte **X** und **Y** entstehen. Im Fall der BNCT stellt **A** einen  $^{10}\text{B}$ -Kern dar, der selektiv an oder in eine Krebszelle plaziert wird. **B** ist ein langsames Neutron, und **X** und **Y** stehen für sehr energiereiche  $^{4}\text{He}^{2+}$ - und  $^{7}\text{Li}^{3+}$ -Ionen.

**X** und **Y** aufgrund ihrer sehr kurzen Lebensdauer auf einen kleinen Raum beschränkt sind und daß sie in dieser Zeit als sehr wirksame Zellgifte fungieren. Ein solcher binärer Prozeß wird durch die Reaktionsgleichungen in Schema 1 beschrieben. Als ein Beispiel dafür wird in dieser Übersicht die Therapie durch Bor-Neutroneneinfang (BNCT) beschrieben.

## 2. Die Bor-Neutroneneinfang(BNC)-Reaktion und die entsprechende Therapie

### 2.1. Historische Übersicht über die Grundideen zur BNCT

Die schnelle Entwicklung der Quantenmechanik, der Kernphysik und der damit verwandten Chemie in den dreißiger Jahren führte unter anderem 1932 zur Entdeckung des Neutrons durch James Chadwick<sup>[1]</sup>. Bei den Untersuchungen zur Wechselwirkung von Neutronen mit einer Reihe von Substanzen schälte sich das Phänomen der Neutronenstreuung durch elastischen Stoß<sup>[2]</sup> mit Atomkernen, insbesondere mit dem allgegenwärtigen Proton des H-Atoms, heraus. Die Entdeckung des Einfangs langsamer (oder thermischer) Neutronen durch bestimmte Atomkerne ist das Verdienst von Fermi et al.<sup>[3]</sup>; für wieder andere Atomkerne wurde der Zerfall bei Wechselwirkung mit thermischen Neutronen beschrieben<sup>[4]</sup>. Im Jahr 1935 hatte sich bereits eine erhebliche Menge solcher Informationen angesammelt, und es wurde deutlich, daß die Fähigkeit eines Atomkerns, ein Neutron einzufangen, nicht von seiner Masse, sondern von seiner Struktur abhängt. Die Beschreibung von Atomkernen an-

[\*] Prof. M. F. Hawthorne

Department of Chemistry and Biochemistry  
University of California, Los Angeles  
Los Angeles, CA 90024 (USA)  
Telefax: Int. +310/206-4038

hand ihres charakteristischen Einfangquerschnitts in Einheiten von  $10^{-24} \text{ cm}^2$ , genannt 1 Barn, kam bereits damals auf. Es war bekannt, daß der Bor-Atomkern einen außergewöhnlich großen Einfangquerschnitt für den Neutroneneinfang hat, während die Einfangquerschnitte der dem Bor benachbarten Elemente im Periodensystem Stickstoff und Kohlenstoff relativ klein sind. In einer wichtigen Veröffentlichung beschrieb Taylor 1935<sup>[5]</sup> den Einfang thermischer Neutronen durch  $^{10}\text{B}$ -Atomkerne und die dadurch ausgelöste Bildung von  $^4\text{He}^{2+}$ - ( $\alpha$ -Teilchen) und  $^7\text{Li}^{3+}$ -Ionen sowie von etwa 2 MeV kinetischer Energie, die auf diese beiden schweren Produkt-Ionen verteilt ist.

Weiterhin wurde gezeigt<sup>[5]</sup>, daß der Translationsraum der Produkt-Ionen sehr gering war; er betrug etwa 7.6  $\mu\text{m}$  in Photogelatine und 1.1 cm in Luft. Daher sind der Lithiumkern und das  $\alpha$ -Teilchen kurzlebige, energiereiche Partikel, die organische Materialien durch Ionisierungsprozesse erheblich lokal schädigen können. Aufgrund dieser Befunde war im Jahr 1936 der Punkt erreicht, an dem das Konzept der Therapie durch Bor-Neutroneneinfang (BNCT) vorgestellt werden konnte.

Gordon L. Locher von der Bartol Research Foundation des Franklin Institute in Philadelphia, Pennsylvania, beschrieb 1936 in einer zukunftsweisenden Veröffentlichung<sup>[6]</sup> die potentiellen medizinischen Anwendungen von Neutronen und des Bor-Neutroneneinfangs. Er ging von der einfachen Bor-Neutroneneinfangreaktion als Basis einer binären Therapie, wie sie in Schema 1 beschrieben wurde, aus, d. h.  $^{10}\text{B}$ -Kern = A, und zwar in Form einer Verbindung, die sich spezifisch im Tumor anreichert, thermisches Neutron = B,  $\alpha$ -Teilchen und Lithiumkern = X und Y. Dieser Vorschlag ist deswegen so elegant, weil dabei keine radioaktiven Materialien auftreten und weil außerdem der Therapieverlauf über die Neutronenmenge moduliert werden kann.

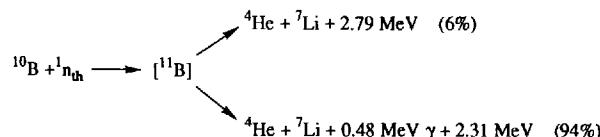
Die zwei für eine derartige Therapie nötigen Komponenten, nämlich eine kontrollierbare Quelle für energiearme Neutronen mit hohem Fluß und Borverbindungen, die einen Tumor lokalisieren können, waren 1936 noch nicht bekannt. Lochers Konzept mußte eine Prophezeiung bleiben, bis Kernreaktoren zur Verfügung standen, an denen ein erster Test mit thermischen Neutronen durchgeführt werden konnte. Dieser erste Versuch ließ bis 1954 auf sich warten. Damals setzten Sweet, Farr et al.<sup>[7]</sup> am Brookhaven National Laboratory (BNL) in Zusammenarbeit mit dem Massachusetts General Hospital (MGH) bei terminal an Hirntumoren

(Glioblastoma multiforme) erkrankten Patienten  $^{10}\text{B}$ -angereichertes Borat als  $^{10}\text{B}$ -Zielverbindung ein. Diese ersten Experimente werden in Abschnitt 3.1 behandelt. In diesen Pilotversuchen wurde die BNCT dazu verwendet, Gliomzellen abzutöten, die bei den normalen chirurgischen Eingriffen am ursprünglichen Tumorort zurückblieben.

Wie bei den potentiellen medizinischen Anwendungen der BNC-Reaktion zu erwarten war, ist an den Forschungen dazu ein breites Spektrum wissenschaftlicher Disziplinen beteiligt. Neben chemischen Untersuchungen enthält die Literatur über BNC und BNCT zahlreiche Untersuchungen unter anderem aus Zellbiologie, Nuclearwissenschaft und -technik, Strahlenonkologie, Pathologie, Pharmakologie und Immunologie. Ich beschränke mich in dieser Übersicht aber auf Themen im Grenzbereich zwischen der Chemie und den erwähnten anderen Disziplinen und habe sie aus der Sicht eines Chemikers geschrieben.

## 2.2. Grundlegende Aspekte der BNCT

Die BNC-Reaktion mit thermischen Neutronen (293 K  $\approx$  0.025 eV) ist in Schema 2 wiedergegeben. Der  $^{11}\text{B}$ -Kern



Schema 2. Die beiden Kernreaktionen, die nach dem Einfang eines langsamen (thermischen) Neutrons  $n_{\text{th}}$  durch einen  $^{10}\text{B}$ -Kern parallel ablaufen.

kann keine BNC-Reaktion eingehen, während der  $^{10}\text{B}$ -Kern dafür einen Einfangquerschnitt von 3837 Barn hat. Tabelle 1 enthält allgemein akzeptierte Einfangquerschnitte von Elementen mit ungewöhnlich hohen Werten sowie diejenigen von physiologisch wichtigen, normalerweise in Geweben vorkommenden Elementen. Der  $^{157}\text{Gd}$ -Kern wurde aufgrund seines sehr großen Einfangquerschnitts als Kandidat für die Neutroneneinfangtherapie gesehen. Die Reaktionsprodukte sind in diesem Fall Photonen und energiearme Auger-Elektronen, so daß eine Wirkung nur vorstellbar ist, wenn  $^{157}\text{Gd}$  mit DNA in Kontakt gebracht wird und dann



*M. Frederick Hawthorne, geboren 1928 in Kansas, begann 1944 das Chemieingenieurstudium an der Missouri School of Mines and Metallurgy und erhielt 1949 seinen BA in Chemie am Pomona College. 1953 promovierte er an der University of California at Los Angeles (UCLA) bei Donald J. Cram in Organischer Chemie. Nach einem Postdoc-Jahr bei George S. Hammond an der Iowa State University ging er 1954 zu Rohm and Haas in Huntsville, Alabama, wo er 1956 seine Forschungen in der Borchemie aufnahm. 1962 erhielt er einen Ruf als Professor an die University of California in Riverside. 1969 ging er als Professor für Anorganische Chemie an die UCLA und wurde Chefredakteur der Zeitschrift Inorganic Chemistry. Er hat eine Vielzahl von Auszeichnungen und Ehrungen erhalten, ist Mitglied der US National Academy of Sciences und der American Academy of Arts and Sciences sowie seit 1992 Ehrendoktor der Universität von Uppsala. Seit 1991 ist er Alexander von Humboldt Senior Scientist bei Heinrich Nöth in München. Er ist Mitglied des Executive Committee of the International Society for Neutron Capture Therapy. Schwerpunkte seiner Forschung sind die Verwendung von Boranclustern als Bausteinen in Wirt-Gast- und supramolekularen Komplexen, in der homogenen Katalyse, als Komponenten nanomechanischer Bausteine und in der Chemie biologischer Liefersysteme für die BNCT.*

Tabelle 1. Einfangquerschnitte für den Einfang thermischer Neutronen und natürliche Isotopenverteilungen (A) physiologisch wichtiger Elemente und (B) von Elementen mit den größten Einfangquerschnitten, einschließlich  $^{10}\text{B}$  [a].

Nuclid	Einfangquerschnitt [Barn]	Natürliche Häufigkeit [%]
(A)		
$^1\text{H}$	0.33	99.8
$^{12}\text{C}$	$3.4 \times 10^{-3}$	98.9
$^{14}\text{N}$	1.8	99.6
$^{16}\text{O}$	$1.8 \times 10^{-4}$	99.8
$^{23}\text{Na}$	0.43	100.0
$^{31}\text{P}$	0.18	100.0
$^{32}\text{S}$	0.53	95.0
$^{35}\text{Cl}$	43	76.0
(B)		
$^2\text{He}$	$5.3 \times 10^3$	$1.4 \times 10^{-4}$
$^6\text{Li}$	$9.4 \times 10^2$	7.5
$^{10}\text{B}$	$3.8 \times 10^3$	19.8
$^{113}\text{Cd}$	$2.0 \times 10^4$	12.2
$^{149}\text{Sm}$	$4.2 \times 10^4$	13.9
$^{155}\text{Gd}$	$6.1 \times 10^4$	14.8
$^{157}\text{Gd}$	$2.6 \times 10^5$	15.7
$^{235}\text{U}$	$5.8 \times 10^2$	$7.2 \times 10^{-1}$

[a] Daten aus G. Friedlander, J. W. Kennedy, E. S. Macias, J. M. Miller, *Nuclear and Radiochemistry*, 3. Auflage, Wiley, New York, 1981.

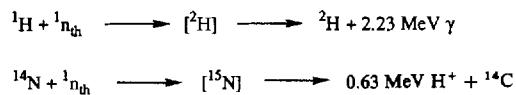
als Folge des Neutroneneinfangs möglicherweise der Doppelestrahl aufbricht<sup>[18]</sup>.

Zwei in Gewebe in großer Menge vorkommende Nuclide (Tabelle 1 A) sind Bestandteile wichtiger Nebenreaktionen bei der BNCT und damit Ursache einer beträchtlichen Hintergrundstrahlung. Die Bedeutung dieser beiden Neutroneneinfangreaktionen basiert nicht auf der Größe der Einfangquerschnitte der beteiligten Zielkerne, sondern auf ihrer sehr hohen Konzentration in Geweben. Bei diesen Nucliden handelt es sich um  $^1\text{H}$  und  $^{14}\text{N}$ , deren Neutroneneinfangreaktionen<sup>[19b]</sup> im Schema 3 wiedergegeben sind. Bei ih-

chen zum Beispiel etwa 0.01 mm lange Ionisationsspuren, was in etwa einem Zelldurchmesser entspricht. Es werden also vor allem die Zellen durch die LET der Teilchen geschädigt, in denen sie entstanden sind, weil dort die Energiedichte sehr hoch wird. Im Idealfall sollten Zellen, die eine große Zahl von  $^{10}\text{B}$ -Atomen enthalten, durch BNC zerstört werden, während benachbarte Zellen ohne  $^{10}\text{B}$ -Atome verschont bleiben. Solche  $^{10}\text{B}$ -freien Zellen sollten nur den Einfluß der  $^1\text{H}(\text{n},\gamma)^2\text{H}$ - und  $^{14}\text{N}(\text{n},\text{p})^{14}\text{C}$ -Reaktionen spüren.

Um den BNC-Effekt gezielt in Tumorzellen nutzen zu können, muß Bor so selektiv wie möglich zu ihnen und nicht zu gesunden Zellen des zu bestrahlenden Gewebes transportiert werden. Außerdem muß die  $^{10}\text{B}$ -Konzentration im Tumor hoch genug für eine lokalisierte binäre Therapie sein, d. h. für eine Strahlung, die erheblich über die Dosis der Hintergrundstrahlung durch die Reaktionen in Schema 3 liegt. Die allgemein akzeptierte Minimalkonzentration an  $^{10}\text{B}$ , die noch eine BNC-Wirkung hat, liegt nach mehreren Berechnungen zwischen 10 und 30 µg  $^{10}\text{B}$  pro g Tumor, je nachdem, wo genau sich das  $^{10}\text{B}$  relativ zu den lebenswichtigen Komponenten der Tumorzelle befindet. Verändert man die Position des  $^{10}\text{B}$ -Kerns von der externen Zellwand zum Cytoplasma und dann zum Zellkern, verringert sich wie erwartet die für eine wirksame BNCT nötige  $^{10}\text{B}$ -Konzentration. Daher könnten von  $^{10}\text{B}$ , wenn es an die Zellwand bindete, 30 ppm oder mehr erforderlich sein, während  $^{10}\text{B}$  im Kern einer Tumorzelle möglicherweise schon bei einer Konzentration von 10 ppm oder weniger eine Wirkung zeigte. Ein zusätzlicher Faktor ist natürlich die Gleichgewichtskonzentration thermischer Neutronen im zu behandelnden Gewebevolumen, da sehr niedrige Neutronenintensitäten proportional längere Bestrahlungszeiten erfordern, um die für eine wirksame Therapie erforderliche Zahl an BNC-Ereignissen zu erreichen.

Zur Quantifizierung der tödlichen Wirkung von Teilchen, die durch Neutroneneinfangreaktionen produziert werden, sowie der  $\gamma$ -Strahlung dient die relative biologische Wirksamkeit (RBE) dieser Verbindungen mit  $\gamma$ -Strahlung als Bezugspunkt. Die RBE von Verbindungen oder Photonen wird als Verhältnis der Energiemenge der  $\gamma$ -Strahlung zu der Energiemenge ausgedrückt, die von den betrachteten Teilchen oder Photonen abgegeben wird und die einen äquivalenten zelltödenden Effekt hat oder lebendem Gewebe einen äquivalenten physiologischen Schaden zufügt. Auch wenn die genauen RBE-Werte gängiger Verbindungen und Photonen in einem gewissen Umfang von den Meßbedingungen abhängen, haben die schweren  $^7\text{Li}^{3+}$ - und  $^4\text{He}^{2+}$ -Ionen aus der BNC zusammen, d. h. pro eingefangenem Neutron, einen allgemein akzeptierten Wert von etwa 2.5, obwohl auch schon viel höhere Werte vorgeschlagen worden sind. Analog wird den Produkten der  $^{14}\text{N}(\text{n},\text{p})^{14}\text{C}$ -Reaktion ein RBE-Wert von 2.7 zugeschrieben. Thermische (0.025 eV) Neutronen selbst sind relativ harmlos; sie haben einen sehr niedrigen RBE-Wert. Die  $^1\text{H}(\text{n},\gamma)^2\text{H}$ -Reaktion trägt hauptsächlich die Energie ihrer charakteristischen  $\gamma$ -Strahlung mit einem RBE-Wert von etwa 1.0 bei. In der Praxis errechnet sich die gesamte Strahlendosis, die an ein Gewebevolumen mit einer bestimmten Konzentration an homogen verteilt  $^{10}\text{B}$  abgegeben wird, aus der Summe der Energiemengen aus jeder der unabhängigen Reaktionen  $^1\text{H}(\text{n},\gamma)^2\text{H}$ ,  $^{14}\text{N}(\text{n},\text{p})^{14}\text{C}$  und  $^{10}\text{B}(\text{n},\alpha)^7\text{Li}$ , jeweils multipliziert mit dem entsprechenden RBE-Wert. Die  $^1\text{H}$ - und  $^{14}\text{N}$ -Neutronen-



Schema 3. Neutroneneinfangreaktionen von  $^1\text{H}$  und  $^{14}\text{N}$ . Aus  $^1\text{H}$  entstehen energiereiche  $\gamma$ -Photonen und Deuteronen, während  $^{14}\text{N}$  zu energiereichen Protonen und  $^{14}\text{C}$  reagiert.

rem Durchtritt durch wasserstofffreie Medien, zum Beispiel Gewebe, werden die Neutronen durch Zusammenstöße mit H-Atomkernen verlangsamt und gestreut. Gelegentlich wird ein so verlangsamtes Neutron dann von einem Proton eingefangen, bildet ein Deuteron und emittiert charakteristische  $\gamma$ -Strahlung, die die Gesamtstrahlendosis erhöht. In einer weiteren Konkurrenzreaktion können die N-Atome im Gewebe ein energiearmes Neutron einfangen und zu  $^{14}\text{C}$  sowie einem Proton mit 0.63 MeV kinetischer Energie reagieren. Die kinetische Energie, die auf das  $^7\text{Li}^{3+}$ - und das  $^4\text{He}^{2+}$ -Ion der BNC-Reaktion übertragen wird, und die des Protons und der  $\gamma$ -Photonen aus  $^{14}\text{N}$  bzw.  $^1\text{H}$  werden an das umgebende Medium abgegeben. Da alle diese energiereichen Produkte von Kernreaktionen mit Ausnahme der  $\gamma$ -Photonen schwere Teilchen sind, vollzieht sich die Energieübertragung schnell und auf einer sehr kurzen Wegstrecke. Die Lineare-Energieübertragungs(LET)-Geschwindigkeit ist bei diesen Spezies hoch, und die enorm hohe Energie, die bei den Neutroneneinfangreaktionen freigesetzt wird, ist daher in einem sehr kleinen Volumen konzentriert. Die bei der BNC-Reaktion produzierten  $^7\text{Li}^{3+}$ - und  $^4\text{He}^{2+}$ -Ionen verursa-

einfangreaktionen liefern offensichtlich eine Hintergrundstrahlung, der die Strahlung aus der von der  $^{10}\text{B}$ -Konzentration abhängigen (binären) BNC-Reaktion überlagert wird.

Die Diskussion hat sich bisher auf die Verwendung thermischer Neutronen als Neutronenquelle beschränkt, weil auf diese Weise genügend energiearme Neutronen verfügbar sind, die sofort vom Kern eingefangen werden können. Die Streuung thermischer Neutronen beim Auftreffen auf Wasserstoffatome im Gewebe verringert jedoch ihre Verfügbarkeit für Tumore unter der Geweboberfläche erheblich. Solche verdeckten Tumore können einer BNCT unterzogen werden, indem man energiereichere Neutronen (0.5 eV–1.0 keV) innerhalb des epithermischen<sup>[10]</sup> Bereichs (0.5 eV bis 10 keV) verwendet. Neutronen dieser Art sind nicht energiereich genug, um destruktive Ionisierung im Gewebe durch die Bildung von Rückstoßprotonen zu verursachen, aber sie werden durch fortwährendes Auftreffen auf H-Atome im Medium deutlich verlangsamt. Diese Kollisionen setzen Wärme frei, die aber das Gewebe nicht zerstört. Während solche epithermischen Neutronen tiefer und tiefer in das Gewebe eindringen, verlieren sie genug kinetische Energie, um zu thermischen Neutronen zu werden, die von  $^{10}\text{B}$ -,  $^{14}\text{N}$ - und  $^1\text{H}$ -Kernen eingefangen werden können. Während also direkt eingesetzte thermische Neutronen am Eintrittspunkt in das Gewebe (Nulltiefe) die höchste Dosis erzeugen, sind epithermische Neutronen bis zu einer gewissen Eindringtiefe in das Gewebe nicht langsam genug, um effektiv eingefangen zu werden<sup>[10]</sup>. Dies ist die notwendige Bedingung für eine nichtinvasive BNCT tiefliegender Tumore.

Schnelle Neutronen ( $E > 10$  keV) können bei Zusammenstößen Wasserstoffatome in wasserstoffhaltigen Substraten ionisieren und dabei ernsthafte Strahlenschäden verursachen (Erzeugung von Rückstoßprotonen)<sup>[11]</sup>. Dieser Vorgang ist biologisch so schädlich, daß für schnelle Neutronen ein sehr hoher RBE-Wert von 5 vorgeschlagen wurde<sup>[12b]</sup>. Schnelle Neutronen kommen als Verunreinigung in epithermischen Neutronenstrahlen vor, aber ihre Zahl kann zum Beispiel durch den Einsatz besonderer Bandfilter verringert werden<sup>[13b]</sup>. Wenn ein Neutronenstrahl für die BNCT schnelle Neutronen enthält, dann muß die wirksame Strahlendosis aus der Bildung von Rückstoßprotonen zu der übrigen Hintergrundstrahlung addiert werden.

## 2.3. Neutronenquellen für die BNCT

### 2.3.1. Kernreaktoren

Wie in Abschnitt 2.1 gesagt, hat die Idee einer BNCT schon existiert, bevor eine brauchbare Neutronenquelle zur Verfügung stand. Dieses Hindernis wurde als Folge der beginnenden Kernreaktortechnik in den vierziger Jahren beseitigt, und so führten Farr und Sweet 1954 die ersten klinischen BNCT-Versuche mit einem thermischen Neutronenstrahl durch<sup>[7e]</sup>. Aus den in Abschnitt 2.2 genannten Gründen werden inzwischen statt thermischer epithermische Neutronen verwendet.

Heutzutage geht die Überzeugung dahin, daß für eine erfolgreiche BNCT eine Dosis (Fluenz) von  $5 \times 10^{12}$  epithermischen Neutronen pro  $\text{cm}^2$  nötig ist<sup>[14]</sup>, wenn jedes epithermische Neutron in ein thermisches Neutron übergeht. Wenn man die Bestrahlungsdauer für den Patienten minimieren

will, dann braucht man Reaktoren mit einer Leistung von mindestens einem Megawatt, um einen klinisch nützlichen Fluß<sup>[14]</sup> von mindestens  $10^9$  Neutronen pro  $\text{cm}^2$  und s zu gewährleisten. Außerdem müssen diese epithermischen Neutronen durch möglichst wenige  $\gamma$ -Photonen und schnelle Neutronen ( $E > 10$  keV) verunreinigt und so stark wie möglich kollimiert sein. Diese Anforderungen in Bezug auf einen therapeutisch nützlichen Fluß werden derzeit allein in den USA von etwa 35 Kernreaktoren<sup>[15b]</sup> erfüllt, die für die BNCT umgerüstet werden könnten. Bereits für medizinische Forschungszwecke genutzte Reaktoren dieser Art sind der Brookhaven Medical Research Reactor, der MIT (= Massachusetts Institute of Technology) Research Reactor, der Georgia Institute of Technology Research Reactor und der European Collaboration Reactor in Petten in den Niederlanden. Der Reaktor der Power Burst Nuclear Reactor Facility des Idaho National Engineering Laboratory gehört mit nominell zwanzig Megawatt zu dieser Gruppe. Wenn er für BNC-Forschung und -Therapie umgerüstet wäre, könnte dieser Reaktor einen therapeutisch äußerst nützlichen Neutronenstrahl erzeugen. Die Verwendung epithermischer Neutronen für die nichtinvasive Therapie tiefliegender Tumore steckt noch in ihren Anfängen, obwohl derzeit laufende Forschungen solche Neutronenstrahlen von 1–1000 eV mit Intensitäten von mehr als  $10^9$  Neutronen pro  $\text{cm}^2$  und s in Aussicht stellen. Die vielen voneinander abhängigen Variablen, die bei einem wirklichen BNCT-Experiment auftreten, werden in gründlichen Studien untersucht, die von Strahlenphysikern, Strahlenbiologen und Spezialisten für Kernreaktoren, um nur einige zu nennen, durchgeführt werden. Der interessierte Leser wird auf ausführliche Modellrechnungen zur BNCT sowie deren experimentelle Bestätigung in der Literatur verwiesen. Pionierarbeiten dazu stammen von Fairchild et al.<sup>[16b]</sup> am BNL, von Wheeler und Nigg<sup>[17]</sup> am Idaho National Engineering Laboratory und schließlich von Harling et al.<sup>[18]</sup> am MIT.

Auch heute noch sind Kernreaktoren die einzigen Quellen für thermische und epithermische Neutronen für Forschung und klinische Studien. Die begrenzte Zahl potentiell verfügbarer, für klinische Anwendungen geeigneter Reaktoren und die Unbeweglichkeit dieser Reaktoren schränken den allgemeinen Nutzen der BNCT ein, selbst wenn heute noch wirksame Behandlungsmethoden für bestimmte Tumorarten entwickelt würden. Daher ist die Suche nach anderen Quellen für epithermische Neutronen aufgenommen worden<sup>[19, 20]</sup>.

### 2.3.2. Andere Neutronenquellen

Die Entwicklung der BNCT zu einer allgemein verfügbaren Therapie – das Ziel –, hängt letztendlich von der Existenz einer praktischen, sicheren und relativ kostengünstigen Quelle für epithermische Neutronen ab, die für Krankenhäuser und medizinische Zentren in dichtbesiedelten Gebieten geeignet ist. Zur Zeit laufen Forschungen in diese Richtung<sup>[19–21]</sup>.

Stöße zwischen energiearmen Protonen aus einem Teilchenbeschleuniger und Lithium erzeugen epithermische Neutronen. Um auf diese Weise epithermische Neutronen für die BNCT zu gewinnen, müßte der Protonenstrom hoch sein, und es würden erhebliche Probleme beim Kühlen des beschossenen Lithiums auftreten. Außerdem müßten die er-

zeugten energiereichen Neutronen durch Substanzen wie D<sub>2</sub>O thermisch gebremst werden. Alternativ kann durch den Beschuß schwerer Elemente mit energiereichen Protonen ein ganzes Spektrum von Neutronen erzeugt werden, deren Energieverteilung im allgemeinen einen höheren Anteil energiereicher Neutronen aufweist als die von Kernspaltungsneutronen. Diese sehr energiereichen Neutronen könnten durch Neutronenmoderatoren in die gewünschten epithermischen Neutronen umgewandelt werden.

Das synthetische Nuclid <sup>252</sup>Cf ist der einzige praktikable spontane Neutronenemitter<sup>[14, 22]</sup>. Dieses Isotop hat eine Halbwertszeit von 2.65 Jahren. Das Neutronenspektrum seines Zerfalls ähnelt dem eines Kernreaktors mit einer Leistung von einem Megawatt. Da <sup>252</sup>Cf isotrop  $2.3 \times 10^6$  Neutronen pro s und µg emittiert, würde man große Mengen (im Grammbereich) dieses Nuclids brauchen, um einen Neutronenstrahl zu erzeugen, der nach thermischer Abbremsung, Fokussierung etc. noch die gewünschte Stärke hätte. Die kontinuierliche Synthese von großen Mengen <sup>252</sup>Cf für den weltweiten Bedarf an epithermischen Neutronen für die BNCT wäre eine technisch äußerst schwierige und sehr teure Aufgabe. Gleichzeitig würde dieses Vorgehen neue Probleme hinsichtlich der Sicherheit der Kernenergie und andere Sicherheitsprobleme von internationalem Ausmaß hervorrufen.

Die verfügbaren Quellen für epithermische Neutronen auf der Basis von Protonenbeschleunigern sind inzwischen im Prinzip gut verstanden, und die noch ungelösten Probleme sind technischer Art. Man kann hoffen, daß diese Schwierigkeiten beseitigt und gefahrlose und bezahlbare Neutronenstrahlen vielen klinischen Einrichtungen zur Verfügung gestellt werden können.

#### 2.4. Überlegungen zu und Bedingungen für eine klinische BNCT

Die Wechselwirkung zwischen den Komponenten eines Neutronenstrahls und den <sup>10</sup>B-Kernen in einem Tumor, im gesunden Gewebe in der Nähe des Tumors und im Blut wirft Fragen auf, die geklärt sein müssen, bevor ein vollständiges BNCT-System wirklich getestet werden kann. Diese Fragen betreffen die räumliche Verteilung und die Wirkungsdosis (physikalische Dosis in rad × RBE = Wirkungsdosis in rad oder cGy) jedes einzelnen Strahlungsvorgangs im Experiment sowie prozeßbezogene Fragen wie die Wahl zwischen einer Therapie durch eine einzige Dosis und der Verabreichung der nötigen Strahlendosis in Teileinheiten<sup>[10]</sup> (Fraktionierung). In letzterem Fall können Strahlenschäden durch Prozesse niedriger LET (hauptsächlich durch Wechselwirkungen mit γ-Photonen) im Gewebe immer wieder ausgeheilt werden. Da epithermische Neutronen bevorzugt werden, weil sie tiefer in das Gewebe eindringen, muß man in der Lage sein, die Wirkungsdosen, die auf die Prozesse von Schema 3, auf die Verunreinigung durch schnelle Neutronen sowie auf die <sup>10</sup>B(n,α)<sup>7</sup>Li-Einfangreaktionen im Tumor und im gesunden Gewebe zurückgehen, in Abhängigkeit von der Tiefe und dem radialen Abstand von der hypothetischen Mittelachse des Neutronenstrahls zu quantifizieren<sup>[10, 23]</sup>. Diese Berechnungen verlangen Genauigkeit, damit man nicht gesundes Gewebe einer Gesamtwirkungsdosis aussetzt, die seine Resistenz übersteigt. Die Gesamtwirkungsdosis für

den Tumor ist begrenzt durch die Dosis, mit der gesundes Gewebe während einer Tumorthерапie bestrahlt werden kann. Das Blut und das Gefäßsystem, durch das es in dem bestrahlten Volumen verteilt wird, verursachen zusätzliche Probleme, die derzeit untersucht werden. Eine generelle Vorgabe ist, den <sup>10</sup>B-Gehalt des Blutes während der Therapie möglichst niedrig zu halten und ein möglichst großes <sup>10</sup>B(Tumor)/<sup>10</sup>B(Blut)-Verhältnis zu erreichen. Unter bestimmten Umständen darf aber die Konzentration an <sup>10</sup>B im Blut seiner Konzentration im Tumor gleichkommen<sup>[24]</sup>. Es würde jedoch den Rahmen dieser Übersicht sprengen, die Gründe für diese Befunde und ihre Konsequenzen darzulegen.

Zur Quantifizierung der Wirkungsdosis an jedem einzelnen Punkt in dem aus gesundem und aus Tumorgewebe bestehenden bestrahlten Raum sind sehr genaue mikrodosimetrische Messungen in Phantomgeweben bei gleichzeitiger Bestrahlung mit Neutronenstrahlen durchgeführt worden. Zum Beispiel sind Hirntumore (Gliome) ein beliebter Forschungsgegenstand, und daher sind menschliche (und Hund-) Phantomköpfe aus Acrylpolymeren gebaut und mit Meßgeräten versehen worden, um die Wirkungsdosen jeder einzelnen Strahlungsquelle, die während der Neutronenbestrahlung auftritt, bestimmen zu können<sup>[25]</sup>. Wegen der Besonderheiten jedes einzelnen Neutronenstrahls muß dieser Vorgang für jeden Strahl wiederholt werden, um den Fluß und die Eigenschaften seiner Neutronen sowie die Dosisleistung der darin vorkommenden γ-Photonen und schnellen Neutronen im Detail zu charakterisieren. Nachdem man den Neutronenstrahl und seine Wechselwirkung mit Gewebe mit Hilfe des Phantoms vollständig beschrieben hat, kann man diese Daten verwenden, um den Neutronentransport mit Monte-Carlo-Methoden zu beschreiben<sup>[26]</sup>. Die daraus resultierende Berechnung der therapeutischen Eigenschaften definierter <sup>10</sup>B-Konzentrationen an mehreren Stellen im Phantom dient zur Simulation der selektiven Anreicherung von <sup>10</sup>B im Tumor<sup>[27]</sup>. Man nimmt an, daß normalerweise das Verhältnis der <sup>10</sup>B-Konzentration im Tumor zu der im gesunden Gewebe im bestrahlten Volumen konstant ist und daß der <sup>10</sup>B-Anteil im gesunden Gewebe homogen verteilt ist. Man geht also davon aus, daß eine Borverbindung oder ein „Borliersystem“ mit einem Selektivitätsfaktor von 10:1 für Tumorgewebe zu gesundem Gewebe in normalem Gewebe homogen verteilt ist und eine Konzentration von 2.5 µg <sup>10</sup>B pro g Gewebe erreicht, sofern die Konzentration im Tumor 25 µg <sup>10</sup>B pro g beträgt. Die Wirkung des therapeutischen Systems ist zeitabhängig, weil jedes Borliersystem eine charakteristische biologische Halbwertszeit hat und weil die <sup>10</sup>B-Konzentration im Tumor, im Gewebe und im Blut mit unterschiedlicher Geschwindigkeit abnimmt.

Abbildung 1 ist eine graphische Darstellung der Ergebnisse einer typischen BNCT-Simulationsrechnung, gestützt durch Mikrodosimetriedaten, die mit einem menschlichen Phantomkopf erhalten wurden<sup>[28]</sup>. Der hier verwendete epithermische Strahl ist ein typisches Beispiel für einen von einem großen Multimegawattreaktor erzeugten Strahl. Die in ihm enthaltenen schnellen Neutronen erzeugen eine beträchtliche Strahlendosis aufgrund von Rückstoßprotonen, während kein sehr großer Beitrag von γ-Photonen festzustellen ist. Die Austrittsöffnung des Strahls ist ein Quadrat mit einer Seitenlänge von 10 cm. Den Rechnungen wurde das oben definierte hypothetische Borliersystem zugrunde ge-

legt. Das Blut wurde nicht als eigene Gewebeart behandelt, sondern als Teil des gesunden Gewebes betrachtet. Vor kurzem wurden komplizierte Analysen der zu erwartenden Schäden an Epithelzellen in den Kapillaren der Schädeldecke infolge der Anwesenheit von  $^{10}\text{B}$  im Blut durchgeführt<sup>[24]</sup>. Sie ergaben überraschenderweise, daß hinreichend kleine Kapillaren mit einem Durchmesser im Bereich der Länge der  $^{10}\text{B}$ -Spaltrümmerspuren aufgrund der aus geometrischen Gründen in ihnen reduzierten wirksamen  $^{10}\text{B}$ -Konzentration nicht angegriffen werden. Dies ist auch eine Folge der Blut-Hirn-Schranke, die  $^{10}\text{B}$ -haltige Verbindungen daran hindert, an Stellen hinter den kapillären Endothelzellen zu wandern. Dieser Effekt kann genutzt werden, um die Wirkungsdosis (rad  $\times$  RBE) in gesundem Gewebe abzuschätzen. Dazu verwendet man einen reduzierten Wert für die RBE der  $^{10}\text{B}(\text{n},\alpha)^7\text{Li}$ -Reaktion in gesundem Hirngewebe, d. h. man geht von 0.33 anstelle von 2.5 aus. Der höhere RBE-Wert wurde für Abbildung 1 verwendet, so daß diese für eine Gliomtherapie den schlimmsten Fall simuliert, für eine Tumorthерапie außerhalb des Schädels aber die zu erwartenden Befunde ziemlich gut wiedergibt.

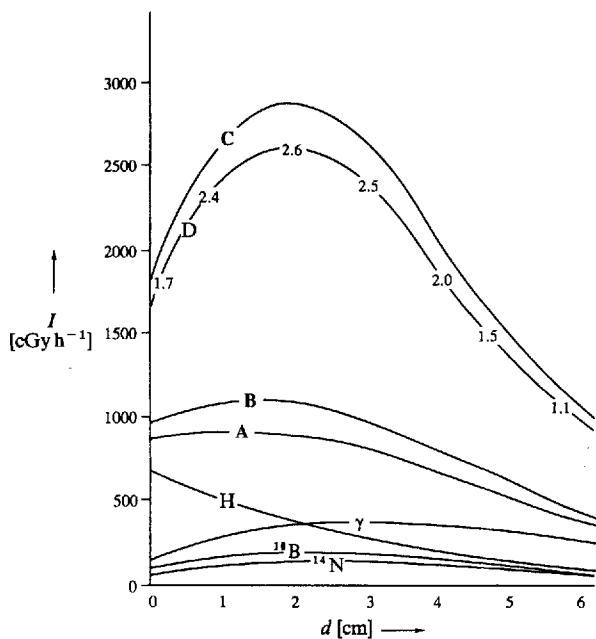


Abb. 1. Graphische Darstellung der relativen effektiven Dosisleistung  $I$  der Strahlkomponenten in Abhängigkeit von der Gewebetiefe  $d$  entlang der Mittelachse eines hypothetischen epithermalen Neutronenstrahls, der auf einem menschlichen Kopf austrifft. Die RBE-Werte dieser Berechnungen waren:  $^{10}\text{B}(\text{n},\alpha)^7\text{Li}$ : 2.5;  $^{14}\text{N}(\text{n},\text{p})^{14}\text{C}$ : 2.7; H (Rückstoßprotonen aufgrund schneller Neutronen als Verunreinigung): 5.0;  $\gamma$ -Photonen: 1.0. Die mit  $^H\text{N}$ ,  $\gamma$  und H bezeichneten Kurven stellen die Einzelbeiträge der jeweiligen Vorgänge zur Hintergrundstrahlung dar. Die mit  $^{10}\text{B}$  gekennzeichnete Kurve ist der Beitrag von  $2.5 \mu\text{g}^{10}\text{B}$  pro g Gewebe, homogen im gesunden Gewebe verteilt. Die Kurve A ist die Summe der Kurven  $^{14}\text{N}$ ,  $\gamma$  und H, während für die Kurve B zusätzlich noch die  $^{10}\text{B}$ -Kurve in die Summe einbezogen wurde. Kurve C ist die Summe aus der Dosisleistung von  $25 \mu\text{g}^{10}\text{B}$  pro g Gewebe, homogen im Tumor verteilt, und der Kurve A. Der therapeutische Gewinn (Kurve D) als Funktion der Tiefe errechnet sich durch Division der Kurve C durch das Maximum der Kurve B ( $1100 \text{ cGy h}^{-1}$ ). Für weitere Einzelheiten siehe Text.

Die Kurve C für die effektive Gesamtdosisleistung, die auf den Tumor wirkt, in Abbildung 1 zeigt deutlich, daß die maximale Leistung in 2 cm Tiefe erreicht ist. Auch die effektive Gesamtdosisleistung, die auf gesundes Gewebe wirkt, hat ihr Maximum in etwa 2 cm Tiefe. Ihr Wert beträgt dann etwa  $1100 \text{ cGy h}^{-1}$ , d. h. die höchstzulässige effektive Gesamtdo-

sis für gesundes Hirngewebe von etwa  $1300 \text{ cGy}$  (oder 13 Gy) würde in ungefähr 71 min erreicht, wenn sich die  $^{10}\text{B}$ -Konzentration im gesunden Gewebe während der Bestrahlung nicht ändert. Unabhängig von der Tumortiefe würden die 71 min Bestrahlungszeit und die angemessene effektive Gesamtdosisleistung, die auf den Tumor wirkt (Kurve C), die effektive Gesamtdosis bestimmen, der die Tumorstelle ausgesetzt werden kann. Bei einer Tumortiefe von 4 cm beträgt diese Dosis zum Beispiel  $2200 \text{ cGy} \times 71/60 \approx 2600 \text{ cGy}$ , während der entsprechende Wert bei 2 cm Tiefe  $3500 \text{ cGy}$  ist.

Die Wirksamkeit einer BNCT ist als ein dimensionsloser Parameter, der als therapeutischer Gewinn<sup>[27c]</sup> bezeichnet wird, definiert und durch die Kurve D in Abbildung 1 wiedergegeben. Der therapeutische Gewinn in einer Tiefe von 2 cm ist also  $2900 \text{ cGy h}^{-1}/1100 \text{ cGy h}^{-1} \approx 2.6$ . Bei einem Tumor in 4 cm Tiefe ist dieser Wert  $2200/1100 \approx 2.0$ . In der Praxis würde man einen therapeutischen Gewinn von weniger als 1.2 wahrscheinlich als nicht mehr ausreichend ansehen; in dem Beispiel von Abbildung 1 wäre das ab einer Tiefe von mehr als 5.5 cm der Fall. Da die effektiven Dosiseleistungen und die Bestrahlungszeiten vor Beginn der Therapie berechnet werden müssen, muß man die Position des Tumors und die  $^{10}\text{B}$ -Konzentration im Tumor und im gesunden Gewebe zuerst genau bestimmen. Mit diesen Daten und der biologischen Halbwertszeit des  $^{10}\text{B}$ -Lieferystems kann man dosimetrische Berechnungen durchführen, die die Dauer der Neutronenbestrahlung ergeben. Die Sicherheit und das Wohlbefinden des Patienten sowie der  $^{10}\text{B}$ -Verlust im Tumor mit der Zeit machen es notwendig, die Bestrahlungszeit so kurz wie möglich zu halten. Daher werden große Reaktoren gebraucht, die den notwendigen optimierten Fluß von mehr als  $10^9$  epithermalen Neutronen pro  $\text{cm}^2$  und s erzeugen können. Nach Berechnungen würde durch eine einzige Bestrahlung mit  $5 \times 10^{12}$  thermisierten<sup>[14]</sup> epithermalen Neutronen pro  $\text{cm}^2$  die benötigte therapeutische Dosis erreicht.

Thermische Neutronen sind hier nicht als Strahlenmaterial behandelt worden, weil klar ist, daß die zu Abbildung 1 analoge Abbildung Kurven ergeben würde, deren Maxima an der Oberfläche sind und die mit zunehmender Gewebetiefe schnell abnehmen. Während thermische Neutronenstrahlen, deren Fluß dem des epithermalen Strahls, der Abbildung 1 zugrundeliegt, ähnelt, an der Oberfläche einen therapeutischen Gewinn von mehr als 2 erreichen, nimmt dieser Parameter schnell ab und erreicht bereits in etwa 2 cm Tiefe die Grenze für praktische Anwendungen von 1.2. Diese Befunde begründen deutlich den Bedarf an epithermalen Neutronenstrahlen mit einem hohen Fluß aus einem großen Kernreaktor oder einem bislang nicht verfügbaren Protonenbeschleuniger, wie er in Abschnitt 2.3.2 beschrieben wurde.

An dieser Stelle sei nun der Mechanismus der Strahlenschädigung durch den  $^{10}\text{B}(\text{n},\alpha)^7\text{Li}$ -Prozeß mit dem einer Schädigung verglichen, die durch eine klassischere Strahlenquelle wie  $\gamma$ -Photonen verursacht wird<sup>[29]</sup>. Therapeutisch signifikante klassische  $\gamma$ -Photonendosen entstehen aus im Mittel Zehntausenden von Ionisationen pro Zelle, und stochastische Prinzipien gelten hier nicht, weil die  $\gamma$ -Photonen homogen auf die beschossenen Tumorzellen auftreffen. BNCT dagegen produziert eine therapeutische Dosis von 10 Gy durch etwa 25 Ereignisse mit schneller LET pro Zelle. Der Schaden, der durch nichttödliche Dosen an  $\gamma$ -Photonen ver-

ursacht wird, kann repariert werden, während der extreme Schaden aufgrund eines BNC-Ereignisses nicht reparabel ist, weil dabei schwere  $\alpha$ - und  $^7\text{Li}$ -Spaltprodukte mit schneller LET entstehen. Die mittlere Zahl von BNC-Ereignissen pro Zelle während einer bestimmten Bestrahlungsdauer hängt von der Tiefe, in der sich die Zelle befindet, sowie von der räumlichen Verteilung und der Konzentration der  $^{10}\text{B}$ -Kerne in der Zelle ab<sup>[30]</sup>. Da die Spaltprodukte  $^4\text{He}^{2+}$  und  $^7\text{Li}^+$  in Gewebe nur eine geringe mittlere freie Weglänge von etwa einem Zelldurchmesser haben, hängt die Reaktion der einzelnen Zellen auf die Bestrahlung von der intra-interzellulären  $^{10}\text{B}$ -Verteilung und von der Geometrie der beschossenen Zellen ab. Deswegen spielen stochastische Effekte bei der BNCT eine wichtige Rolle. Wenn man das  $^{10}\text{B}$  in oder nahe an eine lebenswichtige Zellkomponente bringen kann, zum Beispiel in den Zellkern, dann wird die Zahl von BNC-Ereignissen, die für den Zelltod notwendig ist, erheblich kleiner. Im interzellulären Raum oder an äußeren Zellwänden ist  $^{10}\text{B}$  viel weniger wirksam. Daher sind Borverbindungen und die zugehörigen Liefersysteme am attraktivsten, wenn sie in die Zelle eindringen und sich mit intrazellulären Komponenten verbinden können. Außerdem wird die Suche nach geeigneten Borverbindungen stark dadurch beeinflußt, daß das Bor im Innern der Zellen sichtbar gemacht werden soll.

Zusätzlich zur heterogenen  $^{10}\text{B}$ -Verteilung in und um einzelne Tumorzellen muß die Heterogenität aufgrund der Morphologie des Tumors berücksichtigt werden. Große Tumore haben ein schlecht ernährtesnekrotisches Zentrum, umgeben von Gefäßen, die Nährstoffe für ein schnelles peripheres Tumorwachstum zuführen können. Diese peripheren Blutgefäße werden so schnell genutzt, wie sie geschaffen werden können. Wegen dieser Art des Wachsens und der Morphologie von Tumoren weist das BNC-Zielvolumen eine erhebliche makroskopische Heterogenität auf. Die daraus folgende Brutto-Inhomogenität der  $^{10}\text{B}$ -Verteilung muß quantitativ ausgewertet und in die therapeutischen Experimente und die in-vivo-Bewertung neuer Borverbindungen und der zugehörigen Liefersysteme einbezogen werden.

## 2.5. Für die BNCT geeignete Boranalysen

Die für die BNCT nötigen Boranalysen, die Bewertung von Borverbindungen und schließlich die klinischen Anwendungen umfassen ein breites Spektrum wertvoller, zum Teil noch unvollkommener Methoden. Dazu gehören die makroskopische und nichtinvasive Abschätzung der  $^{10}\text{B}$ -Konzentration im Tumor und im umgebenden Gewebe durch  $^{10}\text{B}$ -NMR-Imaging, das derzeit entwickelt wird, und die mikroskopische Sichtbarmachung der Aufenthaltsorte von  $^{10}\text{B}$  im Tumor und in Gewebeschnitten durch Autoradiographie von  $\alpha$ -Spuren. Die intrazelluläre Verteilung und Quantifizierung der Borverbindungen ist ein weiteres Thema, zu dem es neuerdings interessante Ergebnisse gibt. Diese und ähnliche Themen werden in den folgenden Abschnitten diskutiert.

### 2.5.1. Nichtinvasive makroskopische Abschätzung der $^{10}\text{B}$ -Konzentration *in vivo*

Wie bereits erwähnt, erfordert eine sichere und wirksame BNCT, daß der Ort des Tumors, die  $^{10}\text{B}$ -Konzentration im

Tumor, im Blut und im gesunden Gewebe sowie die Geschwindigkeit, mit der  $^{10}\text{B}$ -haltige Spezies aus diesen biologischen Systemen entfernt werden, bekannt sind. Nicht-invasive Methoden werden sowohl für die Visualisierung des Tumors als auch für die Bestimmung der  $^{10}\text{B}$ -Konzentration gebraucht. Im Prinzip könnte man dazu eine chemisch inerte, radioaktiv markierte Substanz verwenden, die für Bildgebung geeignet ist und die an einen kleinen Teil der  $^{10}\text{B}$ -Zielverbindung gebunden ist<sup>[31]</sup>. Durch zweidimensionale Abbildung sowie Einphotonenemissions-Computertomographie (SPECT) könnte diese Verbindung dann sowohl in primären als auch in sekundären metastatischen Tumoren sichtbar gemacht werden<sup>[32]</sup>. Jedes doppelt markierte  $^{10}\text{B}$ -Liefersystem bringt aber Komplikationen und zeitliche Beschränkungen mit sich, die man besser vermeidet.

Kürzlich ist die Eignung der NMR-aktiven Kerne  $^{11}\text{B}$  und  $^{10}\text{B}$  für direktes NMR-Imaging und für die Bestimmung des Borgehalts von mit dem richtigen Isotop beladenen Tumoren untersucht worden.  $^1\text{H}$ -NMR-Imaging könnte zur Unterstützung verwendet werden. Die Weiterentwicklung dieser Technik<sup>[33–36]</sup> hat bei dem besser geeigneten  $^{11}\text{B}$ -Kern einige Erfolge gezeigt, und der  $^{10}\text{B}$ -Kern kann eventuell in der nahen Zukunft von Nutzen sein. Vielleicht ist es irgendwann möglich, durch  $^{10}\text{B}/^1\text{H}$ -Imaging Tumore nicht nur zu orten, sondern auch die lokalen  $^{10}\text{B}$ -Konzentrationen im Tumor und im gesunden Gewebe quantitativ sichtbar zu machen. Solche Analysen wären nichtinvasiv und relativ schnell durchzuführen, und sie würden die  $^{10}\text{B}$ -Zielkerne für die BNCT als signalerzeugende Spezies nutzen. Bezuglich der Einzelheiten dieser in der Entwicklung befindlichen Technik wird der Leser auf die Originalarbeiten<sup>[33–36]</sup> verwiesen.

### 2.5.2. Makro- und mikroskopische Borbestimmung in biologischen Proben

Es besteht die Notwendigkeit, die Borkonzentration in biologischen Forschungsproben aus Biopsien und in Geweben von Bioverteilungsexperimenten mit Tieren genau zu bestimmen. Solche Proben sind oft in makroskopischen Mengen von 50 bis 100 mg und mehr erhältlich. Nach der oxidativen Auflösung der gewogenen Gewebeproben wird der Borgehalt in der wäßrigen Probelösung durch die neu entwickelten Plasmaatomemissionsspektroskopien (ICP-AES<sup>[37]</sup> und DCP-AES<sup>[38]</sup>) bestimmt. Mit diesen Methoden kann der Borgehalt im Gewebe bis zu etwa 1 ppm verlässlich bestimmt werden. Die Methode kann, wenn man die Proben etwas anders präpariert, auf mikroskopische Gewebeproben von 1 mg aus Nadelbiopsien ausgeweitet werden.

Statt mit ICP-AES und DCP-AES kann man die biologischen Proben auch analysieren, indem man die spontan während des Einfangs thermischer Neutronen durch  $^{10}\text{B}$  in der Probe emittierten  $\gamma$ -Photonen quantitativ mißt<sup>[39–41]</sup> und das Ergebnis mit Eichmessungen vergleicht. Diese Methode erfordert aber eine Quelle für thermische Neutronen und ist bei niedrigen  $^{10}\text{B}$ -Konzentrationen nicht so genau wie die Plasma-AES-Methoden.

### 2.5.3. Sichtbarmachung und Mikrodosimetrie von Bor in biologischen Proben

Die Diskussion der stochastischen Natur der inter- und intrazellulären BNC-Prozesse in Abschnitt 2.4 zeigte, daß

man experimentelle Methoden braucht, mit denen man die räumliche Verteilung von Bor in Schnitten von Tumorgewebe und umgebendem Gewebe aus Biopsien an Versuchstieren oder Menschen bestimmen kann. Wegen der inhomogenen Struktur eines Tumors sind solche Untersuchungen wesentlich für das Verständnis der Fähigkeit borhaltiger Testverbindungen, einzelne Tumorzellen in der Tumorstruktur zu erreichen. Die Autoradiographie von  $\alpha$ -Spuren<sup>[42, 43]</sup> ist dafür ideal geeignet. Dazu werden sehr dünne (6–10 µm) Gewebeschnitte auf Nitrocellulosefilme gelegt und diese Anordnung mit thermischen Neutronen beschossen. Die bei der dadurch ausgelösten  $^{10}\text{B}(\text{n},\alpha)^7\text{Li}$ -Reaktion gebildeten Produkte, die eine hohe Geschwindigkeit der LET haben, sensibilisieren die Nitrocellulose für den hydrolytischen Angriff durch eine starke wäßrige Base. Aufgrund der geringen mittleren freien Weglänge dieser Teilchen und ihrer LET-Charakteristik werden einzelne Neutroneneinfangereignisse aufgezeichnet und auf dem mit Base entwickelten Nitrocellulosefilm in sichtbare Spuren verwandelt. Überlagerung dieser Spurdaten mit einer optischen Abbildung desselben Gewebeschnitts ergibt die relative Dichte der  $^{10}\text{B}$ -Kerne in bezug auf die Histologie der Probe. Wenn man Eichproben verwendet, eignet sich diese Methode bis herab zu  $^{10}\text{B}$ -Konzentrationen von nur 1 µg pro g Probe<sup>[44]</sup>.

Die Radiographie von  $\alpha$ -Spuren wurde nicht nur für konventionelle histologische Tumorproben verwendet, sondern auch für Ganzkörperschnitte von Versuchsmäusen und -ratten.

#### 2.5.4. Subzelluläres Sichtbarmachen von Bor

Der Entwicklung von neuen borhaltigen Medikamenten und der Aufklärung der Tumorselektionsmechanismen wäre geholfen, wenn die Wanderung und die relative Konzentration des Wirkstoffes in den Tumorzellen zeitabhängig verfolgt werden könnte. Die Wichtigkeit solcher Informationen für die Entwicklung von Medikamenten ergibt sich aus der Tatsache, daß die wirkungsvollsten Medikamente diejenigen sein werden, die in die Tumorzellen eindringen und sich mit dem Cytoplasma, den Organellen oder sogar mit dem Zellkern verbinden können. Wenn man zum Beispiel ein an DNA bindendes Borliefersystem synthetisieren möchte, dann wäre es wichtig, das Erreichen des intrazellulären Ziels durch direkten Nachweis des Bors im Zellkern zu bestätigen. Solche subzellulären Sichtbarmachungen haben bisher ihren Nutzen nur in Spezialfällen demonstriert und müssen noch weiter entwickelt werden.

Die erste hier zu erwähnende Methode ist die Sekundärionen-massenspektroskopische (SIMS-) Mikroskopie<sup>[45, 46]</sup>, die sich für die quantitative Bestimmung des Borgehalts in einfachen, durch Gefriertrocknung zerlegten borhaltigen Zellen aus einer Zellkultur eignet. Auf diese Weise konnten Zellen sichtbar gemacht werden, die mit Bormedikamenten behandelt worden waren; die räumliche Auflösung betrug 1 µm.

Die zweite Methode ist das Imaging durch Elektronen-Energieverlust-Spektroskopie (EELS)<sup>[47]</sup>, bei der mit einem analytischen Elektronenmikroskop oder einem energiefilternden Transmissionselektronenmikroskop eine Karte der Elemente erstellt wird. Erste Ergebnisse zur Boranalyse mit EELS sind bekannt<sup>[48]</sup>, aber diese Methode muß wie die SIMS-Methode noch weiterentwickelt werden, bevor sie für

die Beurteilung von Wirkstoffen allgemein nützlich werden kann.

### 3. Frühe klinische Versuche zur BNCT und die Suche nach geeigneten borhaltigen Zielverbindungen

#### 3.1. Erste klinische Untersuchungen (1951–1962)

Die Idee, Lochers Konzept der binären BNCT<sup>[61]</sup> tatsächlich in der Medizin einzusetzen<sup>[49]</sup>, stammt von William H. Sweet, Neurochirurg am MGH in Boston, und L. E. Farr von der medizinischen Abteilung des BNL. Sweet und Farr wollten die Heilungsaussichten für Patienten mit Hirntumor verbessern, indem sie die Fibrillen von Tumorzellen, die auch nach Radikaloperationen zur Entfernung des Tumors verblieben, durch BNCT zerstörten<sup>[50, 51]</sup>, denn ausgehend von diesen Fibrillen entwickelt sich der Tumor neu. Die Lebenserwartung von Patienten mit solchen bösartigen Gliomen betrug sogar nach einer Operation normalerweise weniger als sechs Monate. Die Tatsache, daß Gliome keine Metastasen entwickeln, der Schutz des gesunden Gehirns durch die Blut-Hirn-Schranke sowie die Resistenz dieser bösartigen Geschwulste gegenüber allen bekannten Formen der Chemo- und Radiotherapie machten sie zu sehr geeigneten Kandidaten für BNCT-Versuche.

Die ersten Versuche zur Erhöhung des Verteilungsverhältnisses der Borverbindungen in Tumor und Hirn ergaben sich aus der Tatsache, daß zerebrale Gliome der Blut- oder „nassen“ Seite der Blut-Hirn-Schranke zugänglich sind und die Aufnahme hydrophiler Spezies begünstigen, während gesundes Hirn relativ „trocken“ und weniger hydrophil ist. Daher wurde die Suche nach hydrophilen und ungiftigen Substanzen aufgenommen<sup>[52]</sup>.

An Freiwilligen, die sich einer neurochirurgischen Biopsie oder Resektion unterzogen, wurde festgestellt, daß Natriumborat  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  in Konzentrationen bis zu 200 mg pro kg Körpergewicht ohne schwere Nebenerscheinungen toleriert wurde<sup>[53]</sup>. Die Bioverteilung und die zeitabhängigen Daten zeigten, daß die Borkonzentration im Tumor kurz nach der intravenösen Boratinfektion dreimal so hoch war wie in gesundem Hirn; sie konnte bis zu 50 µg pro g Tumor erreichen. Im Blut fand sich bei diesen Versuchen Bor in ebenso hohen oder sogar noch höheren Konzentrationen als im Tumor.

1954 begannen Farr und Sweet erste klinische Versuche an zehn Patienten mit Glioblastoma multiforme. Sie verwendeten dazu thermische Neutronen aus dem Brookhaven Graphite Research Reactor und  $^{10}\text{B}$ -angereichertes Natriumborat<sup>[54]</sup>. Fünf Patienten erhielten eine einzige Strahlendosis und fünf wurden mehrmals mit kleinen Dosen bestrahlt. Eine statistisch signifikante Lebensverlängerung konnte nicht nachgewiesen werden. 1959 wurde der damals neu errichtete Brookhaven Medical Research Reactor genutzt, um sechzehn weitere Patienten<sup>[55, 56]</sup> zu bestrahen, denen  $^{10}\text{B}$ -angereicherte Borate als Zielverbindungen verabreicht worden waren. Auch dieses Experiment verlängerte die Überlebensdauer nicht, und bei der Autopsie wurden keine durch  $\alpha$ -Teilchen verursachten Strahlenschäden in den Hirnen der Patienten gefunden.

Zu Beginn der sechziger Jahre wurde der MGH/MIT-Reaktor in Betrieb genommen, der auch einen Operationsaal unterhalb einer Öffnung für thermische Neutronen-

strahlen enthielt. Im Lauf der fünfziger und Anfang der sechziger Jahre stellten außerdem mehrere Arbeitskreise Borverbindungen her, deren Wirkung auf Versuchsmäuse Soloway et al. am MGH untersuchten<sup>[57]</sup>. Sie verwendeten zum Beispiel eingepflanzte Ependymblastome zur Bestimmung der Bioverteilung und für zeitabhängige Studien. Viele der etwa 140 Verbindungen, die Soloway et al. untersuchten, waren substituierte Phenylboronsäuren, einschließlich 4-Dihydroxyborylphenylalanin (BPA), das heute ins Zentrum der Aufmerksamkeit gerückt ist (siehe Abschnitt 7.9.1). Ebenfalls in dieser Zeit wurden die polyedrischen Boran-Anionen  $B_{10}H_{10}^{2-}$ <sup>[58]</sup> und  $B_{12}H_{12}^{2-}$ <sup>[59]</sup> entdeckt und die Chemie ihrer Derivate gründlich untersucht. Außerdem wurden die ikosaedrischen Carborane<sup>[60]</sup> *cis*-1,2- und *cis*-1,7- $C_2B_{10}H_{12}$  synthetisiert und Derivate von ihnen hergestellt. Die kinetische Stabilität dieser polyedrischen Ionen und Carborane machte sie und ihre Derivate sofort zu attraktiven Kandidaten als BNCT-Zielverbindungen; dies fiel zusammen mit dem Beginn einer neuen Ära der anorganischen Clusterchemie. Auf dieses Thema geht Abschnitt 5 ausführlicher ein.

Soloway untersuchte die Eignung des Salzes  $Na_2B_{10}H_{10}$  als mögliche Zielverbindung für die BNCT an Tieren und Menschen. Große Mengen an  $Na_2B_{10}H_{10}$  wurden Menschen in die Halsschlagader injiziert ( $LD_{50} = 1.0$  g pro kg in C3H-Mäusen), später aus Urinproben wiedergewonnen und  $^{11}B$ -NMR-spektroskopisch charakterisiert. In einem anderen Experiment an (männlichen) schweizerischen CD1-Mäusen<sup>[61]</sup> betrug der  $LD_{50}$ -Wert von  $Na_2B_{12}H_{12}$   $1025 \pm 15$  mg pro kg Körpergewicht. Die polyedrischen Ionen hatten eine geringe Toxizität, während die substituierten Phenylboronsäuren bei den Versuchstieren oft toxische Reaktionen hervorriefen.

Zwei  $^{10}B$ -angereicherte Borverbindungen, nämlich 4-Carboxyphenylboronsäure und  $Na_2B_{10}H_{10}$ , wurden 1961/1962 für eine neue Serie von Untersuchungen an Menschen am MGH/MIT-Reaktor und am MGH verwendet. Achtzehn Patienten<sup>[62]</sup> wurde dabei der Schädel geöffnet und das Tumorgewebe möglichst vollständig operativ entfernt. Ersteres war auch deshalb nötig, um die Durchlässigkeit für den sonst schlecht eindringenden thermischen Neutronenstrahl zu verbessern. Bei zwei Patienten wurde  $Na_2^{10}B_{10}H_{10}$  in die Halsschlagader injiziert, und sechzehn Patienten erhielten  $^{10}B$ -angereicherte 4-Carboxyphenylboronsäure<sup>[\*]</sup>. Nach erneuter Öffnung der provisorisch verschlossenen Kraniotomiestelle wurden die Patienten bestrahlt. Auch hier konnte kein therapeutischer Effekt nachgewiesen werden; die Patienten starben innerhalb von 10 Tagen bis 11.5 Monaten nach der Bestrahlung. Eine neuropathologische Untersuchung von 14 Patienten, bei denen eine Autopsie durchgeführt wurde, zeigte Strahlennekrose mit mehreren Arten von Gefäßverletzungen in den Hirnen von 9 der Patienten<sup>[62]</sup>. Als Ursache wurden die hohen Borkonzentrationen im Blut zum Zeitpunkt der Bestrahlung angenommen. Für die weiteren Untersuchungen schien es deshalb sinnvoller, Borreagente zu verwenden, die vom Tumor selektiv aufgenommen würden, so daß das Blut während der Bestrahlung nur eine minimale Borkonzentration aufwies. Daher wurde sowohl von Soloway als auch von Forschern am Du Pont Central Research Laboratory eine zweite Generation von möglicherweise ge-

eigneten Verbindungen synthetisiert. Die meisten dieser Verbindungen leiteten sich von polyedrischen Boran-Anionen<sup>[58, 59]</sup> und Carboranen<sup>[60]</sup> ab und waren als cytostatische Alkylierungsmittel ausgelegt oder waren Verbindungen, die andere kovalente Bindungen mit Proteinen eingehen konnten. Die Abschnitte 5 und 7.1 gehen genauer auf die Beschreibung dieser Spezies ein. Von den Verbindungen, die von Soloway et al. in Bioverteilungsexperimenten auf ihre selektive Anreicherung im Tumor und ihr weitgehendes Fehlen im Gefäßsystem untersucht wurden, zeichneten sich besonders die Natriumsalze von  $B_{12}H_{11}SH^{2-}$  und  $1,10-B_{10}Cl_8(SH)_2^{2-}$  aus<sup>[61]</sup>, aber nur das erstgenannte Salz war hinreichend ungiftig ( $LD_{50}$  in männlichen schweizerischen CD1-Mäusen  $73 \pm 4$  mg pro kg), um in weiteren Untersuchungen eingesetzt zu werden. Es erhielt die Kurzbezeichnung BSH.

### 3.2. Die Entwicklung einer BNCT in Japan: Hiroshi Hatanaka und $Na_2B_{12}H_{11}SH$

Im Anschluß an eine mehrjährige Tätigkeit am MGH als Mitarbeiter des BNCT-Teams unter Sweet kehrte der Neurochirurg Hiroshi Hatanaka 1968 nach Japan zurück und begann dort ein neues Kapitel in der BNCT-Geschichte zu schreiben. Er verwendete in klinischen Untersuchungen mit japanischen Glioblastompatienten  $^{10}B$ -angereichertes BSH und thermische Neutronenstrahlen niedriger Intensität, die ihm im Raum Tokio zur Verfügung standen. Die Shionogi Research Laboratories in Osaka lieferten für diese Studien  $Na_2^{10}B_{12}H_{11}SH$  sowie die Na-Salze sowohl des 1- als auch des  $2-B_{10}H_9SH^{2-}$ -Isomers als Alternativen (siehe Abschnitt 7.1).

Die in Japan erarbeitete Behandlung ähnelte der von Sweet in seinen klinischen Versuchen von 1961/1962 verwendeten. Patienten mit Tumoren in der Nähe der Hirnperipherie wurde der Schädel geöffnet und der Tumor möglichst vollständig operativ entfernt. Ein bis zwei Wochen nach dieser Behandlung wurde den Patienten innerhalb von ein bis zwei Stunden  $^{10}B$ -angereichertes BSH in Dosierungen zwischen 30 und 80 mg pro kg Körpergewicht in die Halsschlagader injiziert. Ungefähr 12 Stunden später wurden die Patienten mit thermischen Neutronenstrahlen bei geöffnetem Schädel an der Operationsstelle behandelt. Dafür standen nur Reaktoren mit einem niedrigen Fluß zur Verfügung ( $10^9 \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), so daß die Bestrahlungszeiten 3–5 h betrugen. Während dieser Zeit befand sich der Patient in von außen überwachter Anästhesie. Die Kopfhaut mußte aus dem Strahlengang genommen werden, um Strahlenschäden zu vermeiden, weil sie  $^{10}B$  in geringer Konzentration enthielt. Während der Bestrahlung entnommene Tumorproben enthielten 13–60 µg  $^{10}B$  pro g Tumor. Die Borkonzentration im gesunden Hirn wurde nicht bestimmt<sup>[63]</sup>. Da diese Untersuchungen mit thermischen Neutronen durchgeführt werden mußten, betrug die Eindringtiefe des Strahls in das Gewebe weniger als 6 cm.

Hatanakas Arbeiten wurden publiziert und ausführlich diskutiert<sup>[63–66]</sup>. Die Tatsache, daß nur in einem Fall – bei einem atypischen Patienten, der eine enorm große Neutronendosis erhalten hatte, – eine Nekrose des gesunden Hirns beobachtet wurde, ist bemerkenswert. Dies belegt, daß das BSH noch vor Beginn der Bestrahlung aus dem Blut verschwunden war. Jüngere Untersuchungen von Gavin et al.<sup>[24]</sup> zeigten, daß der geringe Durchmesser der Kapillarge-

[\*]  $^{10}B$  in Summenformeln bedeutet, daß die Verbindung 95–96 %  $^{10}B$  enthält, siehe Abschnitt 5.1.

fäße im gesunden Hirn und die an allen Stellen außer an der Tumorgrenzschicht intakte Blut-Hirn-Schranke den blutbahnschützenden Mechanismus aktivieren, der die Borkonzentration im Blut effektiv herabsetzt. BSH enthält ein kleines, hydrophiles Anion, das die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden kann. Dies ist wohl auch eine Folge seiner relativ guten Komplexbildung mit hochmolekularen Proteinen im Blutserum<sup>[67]</sup>, die die Blut-Hirn-Schranke auch nicht überwinden können. Dieser Vorgang wurde in Abschnitt 2.4 besprochen. Hatanakas Patienten ging es nach der Behandlung im allgemeinen recht gut, wenn man bedenkt, daß sie bereits tödlich erkrankt waren<sup>[14]</sup>. Die achtunddreißig Patienten mit Glioblastoma multiforme dritten und vierten Grades und die zwölf Patienten mit Tumoren im Pallium, die weniger als 6 cm von der Rindenoberfläche entfernt waren, lebten im Mittel noch 44 Monate, wobei der Median bei etwa 26 Monaten lag, d. h. 50% der Patienten lebten länger als 26 Monate. Unter ihnen gibt es auch einige Langzeitüberlebende: Ein heute 65jähriger Mann lebt zwanzig Jahre nach der Operation immer noch beschwerdefrei, und Ähnliches gilt für eine siebzigjährige Frau und ein dreizehnjähriges Mädchen, die anscheinend vollständig geheilt sind.

Hatanakas Befunde sind bemerkenswert, aber sie sind in medizinischen Kreisen auch auf einige Kritik gestoßen. Die Konsistenz der Ermittlung der Behandlungsdaten an den Patienten ist in Frage gestellt worden, und auch wegen der notwendigerweise schlechten Qualität der verwendeten Neutronenstrahlen sind Zweifel geäußert worden. Man muß sich darüber im klaren sein, daß Hatanaka die Wirksamkeit des BNC für die Gliomtherapie unter Bedingungen gezeigt hat, die vom Idealzustand weit entfernt waren. Unter besseren Voraussetzungen wäre sicherlich eine genauere Dokumentation möglich gewesen.

Als Folge der erfolgreichen Verwendung als Zielverbindung für die BNCT von Glioblastoma multiforme hat BSH internationales Interesse gefunden. Arbeitskreise in den EG-Ländern und am Idaho National Engineering Laboratory haben begonnen, BSH detailliert pharmakokinetisch zu untersuchen, um den Mechanismus seiner Ansammlung in zerebralen Gliomen aufzudecken. Andere Forschungsvorhaben konzentrieren sich auf die Verwendung von BSH in Neutronenbestrahlungsexperimenten an großen Tieren und auf seine pharmakokinetischen Eigenschaften im Menschen. Klinische Versuche sind jetzt geplant, für die die europäischen Gruppen den Reaktor in Petten und BSH verwenden wollen.

Die Verwendung von BSH in der Therapie wird durch seine Tendenz zur Oxidation an Luft erschwert. Diese Oxidation wird vielleicht durch Spuren redoxaktiver Metall-Ionen katalysiert und führt zum Disulfid-Dimer  $[B_{12}H_{11}S]_2^{4-}$  und zum entsprechenden Oxidisulfid<sup>[68, 69]</sup>. Tierschäfte haben gezeigt, daß sich das Disulfid besser im Tumor anreichert als BSH<sup>[70]</sup>, aber es ist auch viel giftiger. Angesäuerte wäßrige Lösungen des Disulfids enthalten ein blaues, reaktives Radikal<sup>[68, 69]</sup>. Diese Oxidationen sind möglicherweise in vivo erforderlich, um die angenommene kovalente Bindung von BSH an Cysteinreste zu ermöglichen. Abschnitt 7.1 geht genauer auf dieses Thema ein. Diese Reaktionen verlangen eine gründliche Reinigung des BSH für medikamentöse Zwecke. Im Moment ist BSH aber die einzige akzeptable Bor-Zielverbindung, die in klinischen Versuchen in Europa oder den USA verwendet werden kann. Wie wir sehen wer-

den, schreitet die Entwicklung anderer geeigneter Zielverbindungen schnell voran, aber in der nahen Zukunft wird BSH wahrscheinlich die Basisverbindung für klinische Untersuchungen bleiben.

#### 4. Chemisches Intermezzo

Mit Ausnahme des einen oder anderen von Hatanakas Patienten hat die BNCT bisher noch keinen bedeutenden Erfolg zu verbuchen. Abgesehen von den vielleicht vorzubringenden Überlegungen, die einen möglichen Erfolg der BNCT auf die Entwicklung der Strahlenonkologie, die Eigenschaften der verfügbaren Neutronenstrahlen und die Genauigkeit der Dosimetrie zurückführen, war und ist der Schlüssel zum Erfolg die Verfügbarkeit ungiftiger Bor-Zielverbindungen, die sich selektiv in Neoplasmen und nicht in gesundem Gewebe anreichern. Der Synthesechemiker trifft bei der logischen Entwicklung dieser nützlichen Zielverbindungen für Neutronen auf erhebliche Schwierigkeiten, denn es gibt wenig quantitative und sogar wenig qualitative Informationen über die chemischen und biologischen Unterschiede zwischen bösartigen und gesunden Zellen. Diese müßte man aber kennen, weil sie mögliche Wege zur selektiven Aufnahme und Retention von Bor durch Tumorzellen aufzeigen können.

Zwei wichtige Gebiete der existierenden klinischen Praxis differenzieren zwischen gesunden und Tumorzellen, die Chemotherapie und die radioimmunologische Bildgebung von Tumoren. Chemotherapeutika werden auf ihre Fähigkeit geprüft, Krebszellen selektiv zu töten, ohne daß man den Konzentrationsunterschieden in bösartigem und benachbartem gesundem Gewebe besondere Aufmerksamkeit schenkt. Die wirksame Differenzierung zwischen bösartigen und gesunden Zellen basiert auf den Unterschieden in der Zellreproduktions- und Metabolismusgeschwindigkeit. Die inzwischen erreichte Präzision bei radioimmunologischem Imaging beruht auf der Tatsache, daß Radiopharmazeutika durch Bindung an monoklonale Antikörper mit einer so enormen Selektivität zwischen gesundem und Tumorgewebe unterscheiden können, daß das Konzentrationsverhältnis von Tumor zu gesundem Gewebe hoch ist, während die tatsächliche Konzentration des Radiopharmazeutikums im Tumor sehr gering bleibt.

Im Idealfall braucht man für die BNCT Verbindungen, die die Tumorselektivität immunovermittelter Radiopharmazeutika aufweisen und zugleich in höheren Konzentrationen als bei der Chemotherapie im Tumor vorliegen und dort hinreichend lange verbleiben, um eine wirksame Neutronenbestrahlung zu gewährleisten. Auch Toxizitätsfragen müssen geprüft werden. Daher bestehen die wichtigsten Herausforderungen an den Chemiker darin, 1) Arten der Bioverwertung zu finden, die wirksam zwischen dem zu behandelnden Tumor und dem übrigen Gewebe unterscheiden, und 2) Borverbindungen zu entwerfen und zu synthetisieren, die in diese Bioverwertungssysteme integriert werden können, ohne deren Funktion zu sehr zu beeinträchtigen. Dabei muß bedacht werden, daß die niedrigste gerade noch therapeutisch wirksame  $^{10}\text{B}$ -Konzentration im Tumor etwa  $10^9$  Zielatome pro Zelle beträgt. Außerdem muß das Bor im Tumor angereichert werden und zugleich die Borkonzentration im Blut minimal bleiben. Wenn diese Bedingungen erfüllt sind,

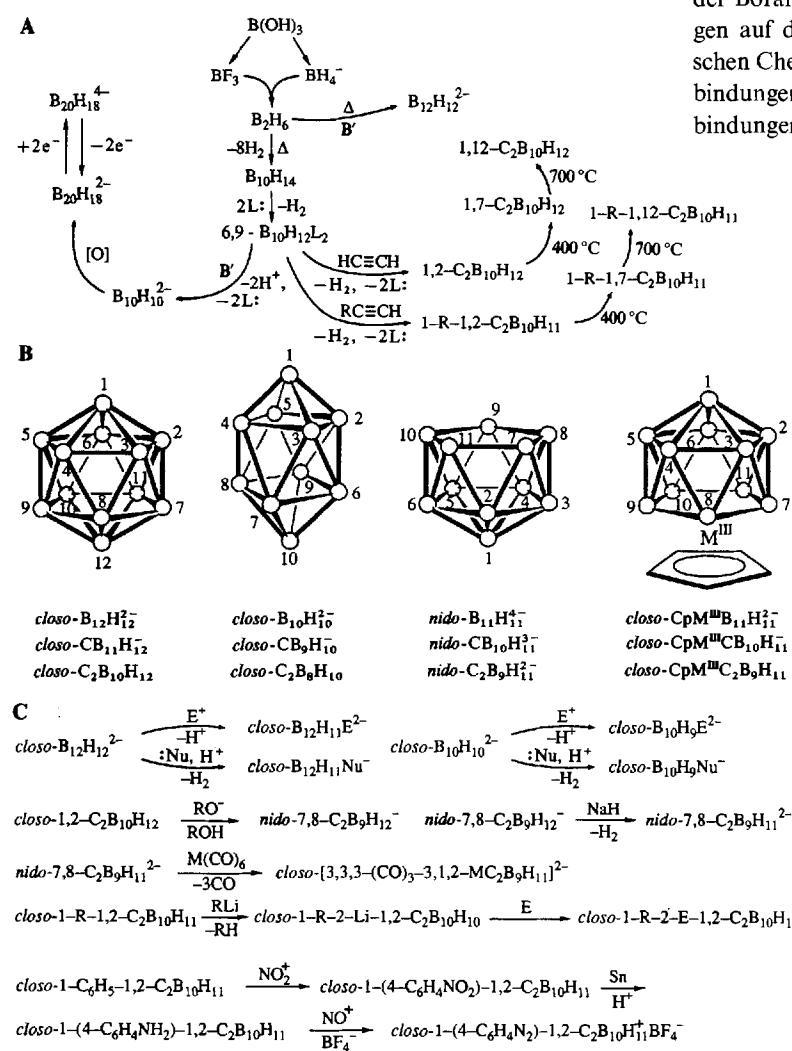
ist es nicht mehr nötig, die Blut-Hirn-Schranke zur Verbesserung der Tumorerkennung zu nutzen, und die BNCT kann dann auch bei anderen bösartigen Tumoren als bei cerebralen Gliomen eingesetzt werden. Tumore wie Melanome, Lymphome, Sarkome und andere sowie die zugehörigen Metastasen werden damit zu Kandidaten für eine BNCT mit epithermischen Neutronen.

## 5. Die Entdeckung der modernen Boranchemie zur rechten Zeit

Die Entwicklung der BNCT-Forschung über die Möglichkeiten der fünfziger Jahre hinaus beruht auf der Entdeckung einer neuen Borchemie in den späten fünfziger und frühen sechziger Jahren. Die Möglichkeiten dieser Chemie überstiegen die gewagtesten Vorstellungen der Chemiker, die an den ersten klinischen BNCT-Versuchen mitarbeiteten. Die Entdeckung ganzer neuer Familien polyedrischer Boranerivate, die durch dreidimensionale Elektronendelokalisierung stabilisiert wurden und auch als Substituenten in organische Moleküle eingebaut werden konnten, bewirkte, daß das Konzept der BNCT die ersten klinischen Versuche mit ungeeigneten Borverbindungen überdauerte und die BNCT ihren derzeitigen erfolgversprechenden Status erreichte.

Bei den ersten neuen polyedrischen aromatischen Boranverbindungen handelte es sich um das aufgrund theoreti-

scher Überlegungen vorhergesagte ikosaedrische *closo*- $B_{12}H_{12}^{2-}$ -Ion<sup>[59]</sup> und um das nicht vorhergesagte *closo*- $B_{10}H_{10}^{2-}$ -Ion<sup>[58, 71]</sup>, das die Struktur eines quadratischen archimedischen Antiprismas mit zwei Kappen hat. Auf diese Ionen folgten schon bald die ikosaedrischen Carboranisomere *closo*- $C_2B_{10}H_{12}$ <sup>[72, 73]</sup>, die mit dem *closo*- $B_{12}H_{12}^{2-}$ -Ion isoelektronisch und isostrukturell sind. Auch andere polyedrische Anionen der allgemeinen Formel *closo*- $B_nH_n^{2-}$  wurden erhalten, bis die ganze Serie mit  $n = 6-12$  zugänglich war<sup>[74]</sup>. Analog dazu wurden andere *closo*- $C_2B_{n-2}H_n$ -Carborane synthetisiert, ebenfalls mit  $n = 6-12$ <sup>[75]</sup>. Diese Carborane zeigten eine Reaktivität wie organische Verbindungen, und Isomere entstanden durch Verschiebung der Polyeder-Kohlenstoffatome relativ zueinander über die Polyederoberfläche<sup>[72, 75]</sup> (polytope Umlagerungen). Später wurde die Serie von *closo*- $CB_{n-1}H_n^-$ -Carboranen erhalten<sup>[76, 77]</sup>, deren Mitglieder ebenfalls organische Derivate bilden. Auch Metallcarborane, d. h. Carborane, in denen eine oder mehrere BH-Gruppen durch Metallkomplexfragmente ersetzt sind<sup>[78, 79]</sup>, sowie die entsprechenden Metallaborane<sup>[80]</sup> wurden bald darauf synthetisiert. Die Verwandtschaftsverhältnisse dieser und vieler anderer Boranclusterderivate wurden mit der chemischen Bindungstheorie in Einklang gebracht<sup>[81]</sup> und dienten als Grundlage für die Entwicklung der anorganischen Clusterchemie<sup>[82]</sup>. Die Bandbreite der modernen Borchemie erstreckt sich weit über den hier beschriebenen Bereich hinaus, und der interessierte Leser sei auf spezielle Übersichten über die vielen Aspekte der Boranclusterchemie verwiesen<sup>[83, 84]</sup>. Diese Entdeckungen auf dem Gebiet der anorganischen und metallorganischen Chemie haben die Suche nach wirksamen BNCT-Verbindungen sehr erleichtert, weil sich Boranclusterverbindungen durch hohen Borgehalt, sehr gute kinetische Sta-



Schema 4. Eine vereinfachte Darstellung einiger Höhepunkte der Boranclusterchemie, die für die BNCT interessant sein könnten. A: Synthesen; B: Strukturen; C: Reaktionen.  $B'$  = Base, E = Elektrophil, L = Ligand.

bilität und relativ einfache Derivatisierung für den Einbau in organische Moleküle auszeichnen. Schema 4 zeigt mehrere wichtige Aspekte von Boranclusterumwandlungen und einige der Numerierungskonventionen.

### 5.1. Die Synthese von $^{10}\text{B}$ -angereicherten Verbindungen für die BNCT

Schema 4 ist eine vereinfachte Darstellung der Verwandschaftsverhältnisse der am besten zugänglichen Borane und Carborane, die zur Synthese von BNCT-Reagentien bereits genutzt wurden oder dafür genutzt werden könnten. Um ihre Vorteile als  $^{10}\text{B}$ -Lieferanten voll auszuschöpfen, müssen diese Moleküle mit dem Isotop  $^{10}\text{B}$  angereichert werden. Diese Anreicherung erreicht im allgemeinen 95–96%  $^{10}\text{B}$ , weil Borsäure als Ausgangssubstanz in dieser Isotopenreinheit käuflich erhältlich ist. Die entscheidende Zwischenstufe bei der Synthese der drei wichtigsten Familien von  $^{10}\text{B}$ -angereicherten Boranderivaten  $^{10}\text{B}_{10}\text{H}_{10}^2$ , 1,2-C<sub>2</sub> $^{10}\text{B}_{10}\text{H}_{12}$  und  $^{10}\text{B}_{12}\text{H}_{12}^2$ , ist das Diboran  $^{10}\text{B}_2\text{H}_6$  (siehe Schema 4). Da die Mehrzahl der Verbindungen, die zum Instrumentarium der BNCT-Forschung gehören, von einer der drei oben genannten Verbindungen ableitbar ist, bedeutet  $^{10}\text{B}$ -Anreicherung keine unmögliche Aufgabe, aber aus dem Kauf  $^{10}\text{B}$ -angereicherter Verbindungen können sich erhebliche zusätzliche Kosten ergeben. Die Notwendigkeit der  $^{10}\text{B}$ -Anreicherung sollte daher bei der Planung von Synthesewegen zu neuen Verbindungen bedacht werden.

## 6. Borverbindungsklassen und wichtige Bioverwertungswege

Obwohl es vielleicht möglich ist, Menschen und Tieren borhaltige Zielverbindungen oral oder nahe der Schädigung zuzuführen, werden die meisten Daten zur Bioverteilung des Bors nach intravenöser Injektion der Versuchsverbindung erhoben. Schema 5 zeichnet den möglichen Weg einer hypothetischen borhaltigen Verbindung nach, die sich einer Tumorzelle nähert, damit eine Bindung eingeht und später in sie eindringt. Wie bereits erwähnt, wächst das letale Potential eines  $^{10}\text{B}$ -Zielkerns mit dem Eindringen in die Zelle erheblich an, und es wird noch größer, wenn er sich dem Zellkern nähert. Kern-DNA ist das begehrteste Ziel, weil ein einziges

Neutroneneinfangereignis mit schneller LET in der DNA die Zelle töten würde.

Die ersten Versuche, die molekulare Struktur und die Bioverteilung von Borverbindungen zu korrelieren<sup>[57]</sup>, bezogen sich auf cerebrale Gliome, gesundes Hirngewebe, Blut und den Einfluß der Blut-Hirn-Schranke. Jetzt, da auch an Tumoren außerhalb des Hirns die BNCT getestet wird, müssen für die Entwicklung neuer Borliefersysteme auch andere Tumormorphologien und metabolische Eigenschaften untersucht werden.

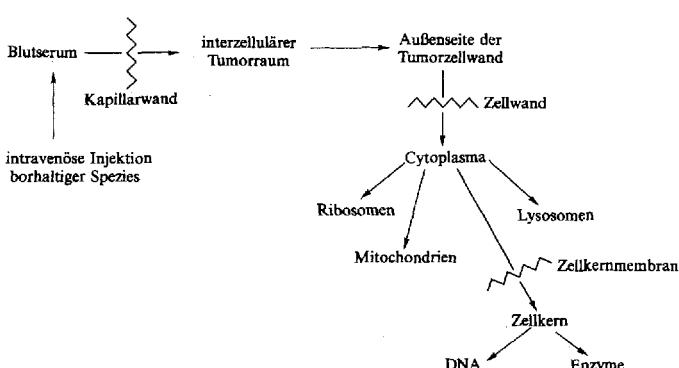
Ein Ansatz ist, Liefersysteme zu entwickeln, die Bor an eine bestimmte Stelle der zu behandelnden Tumorzelle abgeben, indem sie als Analoga bekannter Zellbausteine oder Stoffwechselprodukte einen spezifischen Bioverwertungsweg einschlagen. Eine andere Möglichkeit ist, Moleküle wie monoklonale Antikörper und ihre Fragmente zu nutzen, die selektiv an Rezeptoren in der Plasmamembran binden, die entweder überwiegend oder ausschließlich bei Tumorzellen vorkommen. Solche rezeptorabhängigen Verbindungen können mit borhaltigen Reagentien konjugiert und in sehr selektive Borliefersysteme umgewandelt werden. Kleine Vesikel wie synthetische Liposomen oder modifizierte Lipoproteine niedriger Dichte (LDLs) können, obwohl sie nicht von molekularer Dimension sind, ebenfalls als Borliefersysteme verwendet werden. Schließlich haben einige einfache Moleküle, z.B. Porphyrine, ihre Eignung für die Borplazierung im Tumor gezeigt, ohne daß die biologische Basis für diese Funktion schon eindeutig geklärt worden ist. In Schema 6 sind wichtige borhaltige Verbindungen der Biosynthese spezifischer Zellbausteine oder der Verwendung charakteristischer Zellrezeptoren für die BNCT zugeordnet.

### 6.1. Eine kurze Übersicht über biologische Liefersysteme

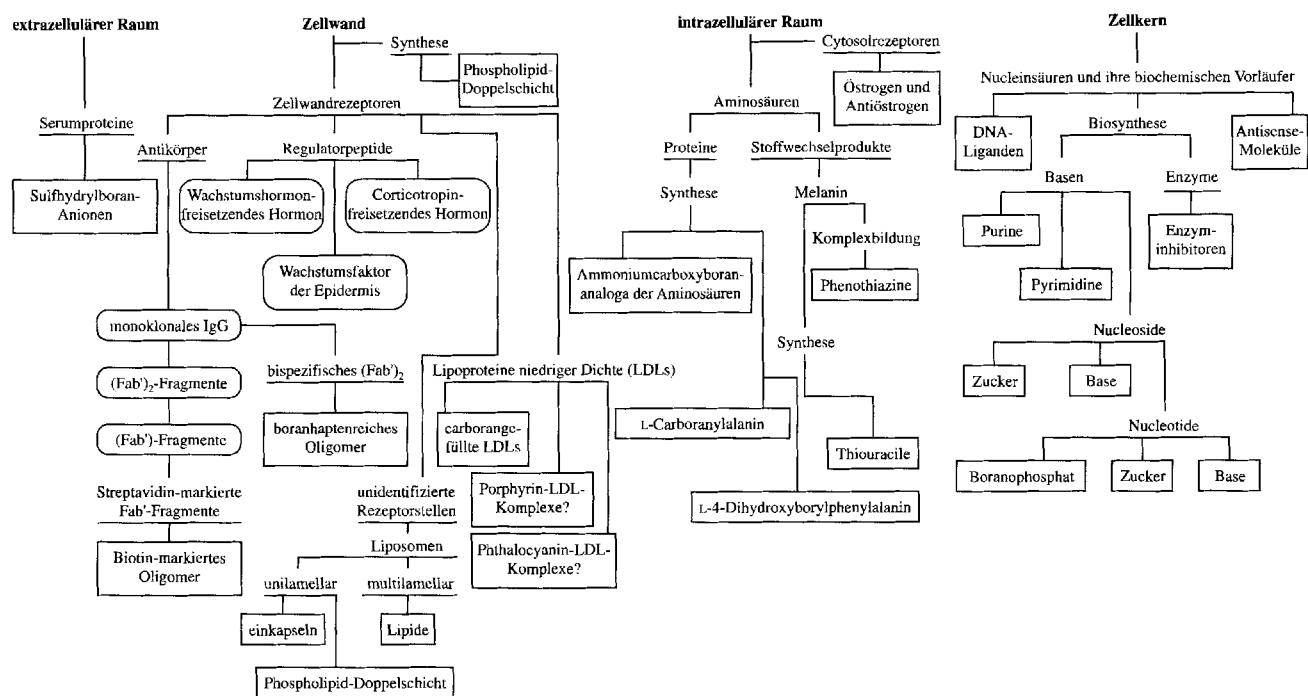
Borhaltige Substanzen als Ersatz für normalerweise bei Zellaufbau und Metabolismus verwendete Verbindungen werden als Nachbildungen dieser Verbindungen geplant und wurden bereits für die Synthese zellulärer Phospholipide<sup>[85]</sup> und Proteine<sup>[86]</sup> verwendet oder für diesen Zweck vorgeschlagen. Außerdem werden Ersatzverbindungen für L-Dopa<sup>[87]</sup> auf ihre mögliche Integration in die Melaninsynthese durch melanotische Melanomzellen untersucht.

Die Fortschritte in der Nucleinsäurechemie haben dazu geführt, daß versucht wurde, borhaltige Nucleobasen, Nucleoside und Nucleotide bei der Biosynthese in die DNA der Zielzellen oder in geeignete DNA-Vorläufer einzubauen<sup>[88]</sup>. Die Wechselwirkung borhaltiger Antisense-Nucleotide und DNA-Liganden<sup>[89]</sup> mit existierenden Kern-DNA-Molekülen eröffnet analoge Möglichkeiten, den radiologisch verletzlichen Kern zu sprengen.

Man nimmt an, daß bestimmte Moleküle, die, nachdem sie mit Bor „dotiert“ wurden, an spezifische Rezeptoren an den Tumorzellwänden binden, meistens in die Tumorzelle aufgenommen werden; in einigen Fällen wird der Rezeptor anschließend regeneriert. Diese selektive Boraufnahme wäre breit anwendbar und machte es möglich, auf eine bestimmte Art von Tumorzellen mit mehr als einer Art von receptorspezifischen Borliefersystemen entweder sukzessiv oder simultan einzuwirken. Ein Beispiel dafür wären zwei oder mehr Immunglobuline für unterschiedliche Antigene, die von derselben Tumorzelle exprimiert werden. Ein solcher Angriff



Schema 5. Eine sehr vereinfachte Darstellung des Transportweges, den eine borhaltige Verbindung vom Ort der intravenösen Injektion bis zum Innern eines Zellkerns zurücklegen muß.



Schema 6. Eine Klassifizierung der Borliefersysteme, die Zellbausteine oder deren charakteristische Rezeptoren nutzen, in vier Gruppen nach der Art des Boreinbaus: extrazellulärer Raum, Zellwand, intrazellulärer Raum und Zellkern. Die Zuordnung kann sich mit weiteren Erkenntnissen ändern. □: borhaltige Verbindung; ○: Konjugat einer borhaltigen Verbindung.

auf mehreren Ebenen erhöhte die wirksame Konzentration an  $^{10}\text{B}$ -Kernen in der speziellen Zellart.

Die Deckung des Bedarfs von  $10^9$  B-Atomen pro Zielzelle für eine wirksame BNCT ist eine mit einzelnen Molekülen als Trägerverbindungen schwierig, aber nicht unmöglich zu lösende Aufgabe. Eine Alternative wären organisierte Aggregate von borreichen Molekülen, die in Tumorzellen über spezifische Abgabemechanismen Eingang finden und so mit jedem Abgabeeignis den Zielzellen relativ große Bormengen zuführen könnten. Beispiele derzeit bekannter „Supertanker“-Systeme dieser Art sind unilamellare Liposomen<sup>[90]</sup> mit polyedrischen Boran-Anionen im wäßrigen Kern der Liposomen gelöst, die aus LDLs bestehen, in denen die natürlichen Cholesterylester durch hydrophobe, von Carboranen abgeleitete Ester ersetzt sind<sup>[91]</sup>. Die modifizierten LDLs können immer noch an LDL-Rezeptorenstellen der Tumorzellen binden und mit Hilfe des noch immer funktionierenden Apoproteins B-100, das an das ursprüngliche LDL bindet, in die Zelle aufgenommen werden. Eine Differenzierung bezüglich der Tumorzellen ist gegeben, weil die LDL-Rezeptorenstellen von wachsenden Tumorzellen sehr viel stärker exprimiert werden als von gesunden Zellen. Auch wenn der genaue Mechanismus der selektiven Liposomenpositionierung noch nicht bekannt ist, kann man doch davon ausgehen, daß Rezeptorenstellen, die sich für die Bindung und Aufnahme von Liposomen in die Zelle eignen, mit Sicherheit existieren. Man kann nämlich in Tumorzellen fluoreszierende Verbindungen<sup>[92]</sup> nachweisen, die durch Liposomen in vivo eingebracht worden sind. Außerdem sind die Befunde mit borhaltigen Liposomen nur als Folge einer selektiven Aufnahme der Liposomen in Tumorzellen verstehtbar. Man nimmt an, daß die Unterscheidung der Zellen durch Liposomen auf dem unvollkommenen ad-hoc-Gefäß-

system beruht, das nur in schnell wachsenden Tumoren vor kommt. Die Kapillaren in solchen Tumoren lassen, wie gezeigt wurde, sehr kleine Liposomen durch (Durchmesser  $< 80 \text{ nm}$ ), die somit selektiv in das Tumorbett eindringen können<sup>[93]</sup>. Diese Selektion nach der Größe kann noch dadurch verstärkt werden, daß die Endocytose der Tumorzellen schneller ist als die gesunder Zellen.

Der Porphyrin-Makrocyclus dringt äußerst selektiv und in sehr hohen Konzentrationen in Tumorzellen ein. Obwohl ein spezifischer, rezeptorgesteuerter Vorgang, wie im Fall der Liposomen, die Ursache dafür zu sein scheint, sind keine diskreten Rezeptorenstellen gefunden worden. Es ist aber möglich, daß die LDL-Rezeptorenstellen die Porphyrinderivate zunächst hydrophob in LDL-Vesikel einschließen und dann die gebildete LDL-Porphyrin-Einschlußverbindung nach bekanntem Muster aufnehmen<sup>[94]</sup>.

## 7. Borhaltige Verbindungen und ihre Lieferung an Tumorzellen

Im folgenden werden einige Arten von borhaltigen Verbindungen und Liefersystemen beschrieben, und zwar gegliedert nach den anvisierten Stellen in der Tumorzelle, wie sie in Schema 6 zusammengestellt sind (Abschnitt 6). Bemerkenswerterweise folgte die Entwicklung der Borverbindungen tatsächlich der in Schema 6 gezeigten Route, und zwar von links nach rechts. Im Lauf der Zeit näherten sich die Chemiker dem Zellkern also immer mehr, und die Chemie wurde immer komplizierter. Dies wurde durch die stetige Weiterentwicklung der Boranclusterchemie und ihre enge Verwandtschaft mit der organischen und der bioorganischen Chemie möglich.

## 7.1. Spezies für den extrazellulären Raum

Wie in den Abschnitten 3.1 und 3.2 erwähnt, ist die ernsthafte Beschäftigung mit der BNCT für andere Tumore als cerebrale Gliome noch relativ jung. Die Blut-Hirn-Schranke, die gesundes Hirngewebe vor sehr hydrophilen Verbindungen schützt und die am Ort des Tumors weitgehend fehlt, hatte im Fall der Gliome eine einfache Gewebedifferenzierung ermöglicht. Man suchte nach ungiftigen und sehr hydrophilen Borverbindungen, die sich möglichst selektiv im Tumor anreichern sollten<sup>[57]</sup>. Anfang der fünfziger Jahre waren weder die Borchemie noch die Analysenmethoden weit genug entwickelt, um die gezielte Planung von Borverbindungen, die sich im Innern der Zellen von Tumoren oder anderen Geschwulsten anreichern, zu ermöglichen. Die damals am einfachsten zugänglichen Borverbindungen waren die von Soloway et al. untersuchten Arylboronsäuren<sup>[57]</sup>. Aus der Vielzahl der möglicherweise geeigneten Verbindungen wurde für die klinischen Versuche der Jahre 1959–1961 an Krebspatienten im Endstadium <sup>10</sup>B-angereicherte 4-Carboxyphenylboronsäure ausgewählt; DL-4-(Dihydroxyboryl)phenylalanin (BPA), das in jüngerer Vergangenheit von sich reden machte<sup>[87]</sup>, wurde damals nicht beachtet. Im allgemeinen waren die Arylboronsäuren wegen ihrer relativ hohen Toxizität und ihres geringen Borgehalts weniger attraktiv als andere, die im Zuge der in den Abschnitten 3.1 und 5 beschriebenen Entwicklung der Borchemie auftauchten.

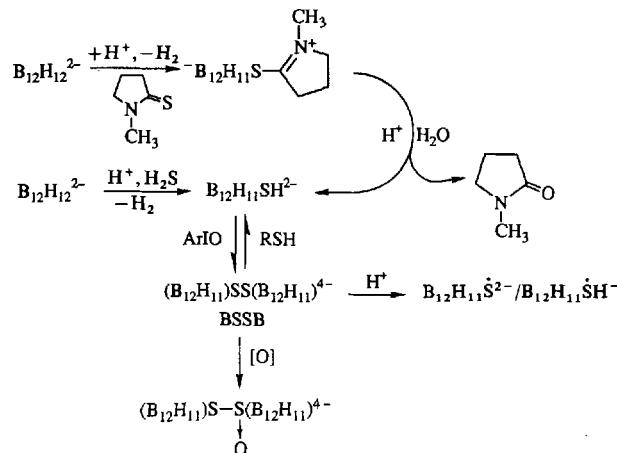
Die Merkmale der Ionen  $\text{B}_{10}\text{H}_{10}^{2-}$  und  $\text{B}_{12}\text{H}_{12}^{2-}$ <sup>[58, 59]</sup> legten die Vermutung nahe, daß ihre Natriumsalze hydrophil sein würden, was damals für die BNCT wichtig schien. Tierversuche zeigten, daß diese Salze nicht sehr toxisch waren, daß sie die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden konnten und daß sie sich recht selektiv und schnell im Tumor anreichern sollten<sup>[57]</sup>. Das Salz  $\text{Na}_2\text{B}_{10}\text{H}_{10}$  wurde auch beim Menschen eingesetzt (siehe Abschnitt 3.1). Spätere Arbeiten führten zur Synthese der polyedrischen Boranderivate  $\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}^{2-}$ <sup>[69, 95]</sup> und  $1,10\text{-B}_{10}\text{Cl}_8(\text{SH})_2$ <sup>[96]</sup>. Das Octachloriderivat erwies sich als zu toxisch, das  $\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}^{2-}$ -Ion dagegen hat unter dem Namen BSH Berühmtheit erlangt. Die Thiogruppe wurde eingeführt, um eine kovalente Bindung an Thiogruppen von Serum- und Tumorproteinen zu ermöglichen. Untersuchungen zeigten, daß etwa 60 % des injizierten  $\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$  schwach und nichtkovalent an Serumproteine gebunden sind<sup>[67]</sup>. Weder freies noch gebundenes BSH überwindet die intakte Blut-Hirn-Schranke, während der Tumor für beide zugänglich ist. Hatanakas Befunde an menschlichen Gliomen<sup>[63]</sup> und andere Befunde beim Menschen<sup>[97]</sup> zeigen, daß im Tumor therapeutisch nützliche Mengen an BSH (> 20 ppm) vorhanden sind, während das gesunde Hirn nur wenig BSH enthält. Die Borkonzentration im Blut ist ähnlich wie oder sogar höher als die gleichzeitig im Tumor vorliegende Konzentration.

Die Thiolderivate der Boran-Anionen sind oxidationsempfindlich. BSH zum Beispiel wird leicht zum Disulfid  $\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SSB}_{12}\text{H}_{11}^{4-}$  und dessen Oxid  $\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SS(O)}\text{B}_{12}\text{H}_{11}^{4-}$  oxidiert<sup>[68, 69]</sup>, was die Verwendung von  $\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$  als Medikament erschwert hat. Lösungen des Disulfids in Säuren werden schnell blau<sup>[68, 69]</sup>, was die Bildung des Radikalions  $\text{B}_{12}\text{H}_{11}\dot{\text{S}}\text{H}^-$  und/oder des damit verwandten Radikaldianions  $\text{B}_{12}\text{H}_{11}\dot{\text{S}}^{2-}$  anzeigen.

Es hat sich herausgestellt, daß das aus BSH gebildete Disulfid von Tumoren kleiner Tiere in vivo besser aufgenom-

men wird als BSH selbst<sup>[98]</sup>. In-vitro-Daten von Fairchild et al. zeigen, daß das Disulfid, genau wie BSH selbst, nicht von der Zelle aufgenommen wird, sondern sich extrazellulär ansammelt<sup>[99]</sup>. In jüngster Zeit haben Coderre et al.<sup>[100]</sup> gezeigt, daß das Disulfid bei in-vitro-Experimenten mit Neutronenstrahlen an 9L-Gliosarkomzellen zu physikalisch unrealistischen RBE-Werten von 1.1 bis 1.4 führt. Daraus folgt, daß die Strahlenschäden, die den Tumor zerstören, in Wirklichkeit extrazellulärer Art sind und sich wahrscheinlich in den Endothelzellen des Tumorgefäßsystems ereignen. Der genaue Mechanismus der BNCT mit BSH ist noch nicht bekannt und wird wohl auch unbekannt bleiben, bis detaillierte pharmakokinetische Untersuchungen durchgeführt sind. Vielleicht verbindet sich BSH ziemlich schnell mit dem reich verzweigten Tumorgefäßsystem, verläßt dieses aber dann recht langsam, wenn die BSH-Konzentration im Blut zurückgeht. Das Verhältnis der Borkonzentrationen im Tumor und im Blut erreicht somit einen Maximalwert, der den optimalen Zeitpunkt für die BNCT markiert.

Die Shinogi Research Laboratories in Osaka haben zwei isomere  $\text{B}_{10}\text{H}_{10}^{2-}$ -Derivate hergestellt, die BSH entsprechen, nämlich 1- und 2- $\text{B}_{10}\text{H}_9\text{SH}^{2-}$ <sup>[101]</sup>. Diese Verbindungen sind noch nicht vollständig untersucht, und die  $\text{B}_{10}\text{H}_{10}^{2-}$ -Struktur bietet wahrscheinlich keinen wirklichen Vorteil gegenüber der  $\text{B}_{12}\text{H}_{12}^{2-}$ -Struktur. Schema 7 zeigt die Synthese des  $\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}^{2-}$ -Ions sowie seine wichtigeren Reaktionen.



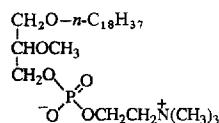
Schema 7. Zusammenfassung der Synthesen von  $\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$  (BSH) und seiner Reaktionen. Ar = Aryl.

## 7.2. Borpositionierung in Tumorzellwänden mit Hilfe von Carboranderivaten von Phospholipiden

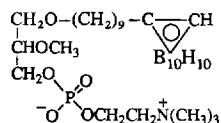
Aus Schema 6 läßt sich folgern, daß Bor über Mechanismen, mit denen borhaltige Phospholipide selektiv in die Plasmamembran-Doppelschicht von Krebszellen eingeführt werden, an Tumorzellen geliefert werden kann. Die selektive Anreicherung von Bor in den Tumorzellen basiert dann darauf, daß sich Tumorzellen schneller vermehren als gesunde Zellen.

Carboranderivate von Phosphocholinglycerylethern sind als Borlieferanten vorgeschlagen worden<sup>[85]</sup>, weil man festgestellt hat, daß sich natürlich vorkommende Lipidether wie

1 selektiv in der Plasmamembran von Tumorzellen anreichern und ihre Verteilung zwischen Tumor und gesundem Gewebe daher einen attraktiven Wert annimmt. In der Tat kann das Phospholipid in der Plasmamembran von Zellen aus in-vitro-Kulturen zu 8–18% aus dem synthetischen Phospholipidether **1** bestehen. Daher haben Lemmen und Werner<sup>[105]</sup> **DL-2** mit einer Carboraneinheit in der Seitenkette synthetisiert. Untersuchungen zur Wirkung von **2** wurden noch nicht veröffentlicht.



**1**



**2**

### 7.3. Borpositionierung durch selektiven Angriff von Immunglobulinen auf Antigene in der Tumorzellwand

#### 7.3.1. Borkonjugierte Antikörper und ihre Fragmente als Borlieferanten

Wie Schema 6 verdeutlicht, weisen Tumorzellwände eine Vielzahl von Rezeptorstellen (Antigenen) für die Erkennung und Bindung spezifischer Immunglobuline auf. Das Auftreten von Antigenen, die für bestimmte Typen von Tumorzellen charakteristisch sind, oder die Tatsache, daß andere Antigene durch Tumorzellen sehr viel stärker exprimiert werden als durch gesunde Zellen, machen es möglich, mit den entsprechenden Antikörpern selektiv auf die Antigene in Tumorzellwänden zu zielen. 1967 wiesen Bale und Spar<sup>[102]</sup> erstmals darauf hin, daß solche tumorgerichteten Antikörper mit geeigneten <sup>10</sup>B-Verbindungen konjugiert und so die Boratome selektiv an die entsprechenden Antigenorte der Tumorzellwände gebracht werden könnten. Das sehr selektive Immunglobulin würde dann als Lieferant für therapeutisch nützliche Bormengen fungieren. Da sich auf jeder Tumorzelle maximal etwa  $10^6$  Antigenorte eines Idiotyps befinden und jede Krebszelle mit ungefähr  $10^9$  <sup>10</sup>B-Atomen belegt sein muß, um therapeutisch angreifbar zu sein, wird deutlich, daß jeder an ein Antigen gebundener Antikörper etwa  $10^3$  <sup>10</sup>B-Atome enthalten muß, vorausgesetzt<sup>[103]</sup>, die Gleichgewichtskonstante der Antikörper-Antigen-Komplexbildung beträgt mindestens  $10^9 \text{ M}^{-1}$ . Die Tatsache, daß die Bindungskonstanten derzeit verfügbarer Antikörper  $10^{11}$  erreichen können, ist vielversprechend. Außerdem legt die beobachtete Aufnahme von an der Zelloberfläche entstandenen Antikörper-Antigen-Komplexen in das Zellinnere die Hoffnung nahe, daß das an die Zelloberfläche gebrachte Bor zu Bereichen der Zelle wandert, deren Schädigung unter therapeutischen Gesichtspunkten effizienter ist, und damit die bei ausschließlicher Oberflächenpositionierung erforderliche hohe Dichte an Boratomen erniedrigt wird<sup>[104]</sup>. Das gleichzeitige Vorliegen mehrerer Arten möglicherweise nützlicher Antigenorte auf Tumorzellen legt die Verwendung von „Cocktails“ aus borkonjugierten Antikörpern nahe, die dann mehrere Antigene gleichzeitig angreifen könnten. Dies würde die wirksamen antigenen Bindungsstellen effektiv vermehren, wodurch wiederum weniger <sup>10</sup>B-Atome pro Antikörpermolekül nötig wären.

Diese immunchemischen Richtlinien konnten erst Anfang der achtziger Jahre entwickelt werden, nachdem Milstein und Köhler<sup>[105]</sup> Hybridome als eine Quelle für unbegrenzte Mengen chemisch homogener monoklonaler IgG-Antikörper (Mabs) hergestellt hatten. Vorher war man bei dem Versuch, Immunglobuline als Borlieferanten einzusetzen, auf chemisch heterogene polyklonale IgG-Antikörper angewiesen, die mühsam aus den Seren immunisierter Tiere isoliert werden mußten<sup>[106]</sup>.

Entwicklungen in der Gentechnik haben viele Arten von Antikörpern wie IgG-, (Fab')<sub>2</sub>- und Fab'-Verbindungen nahezu unbegrenzt zugänglich gemacht, die große Segmente menschlicher Immunglobuline sowie maßgeschneiderte funktionelle Gruppen für die direkte Konjugation mit Medikamenten, Radioisotopen und Toxinen enthalten können. Die Behandlung von Menschen mit derartigen chimären Immunglobulinen verringert das Risiko einer unerwünschten Immunreaktion<sup>[107]</sup>. Abbildung 2 zeigt die allgemeinen Beziehungen zwischen IgG-Mabs und ihren (Fab')<sub>2</sub>- und Fab'-Fragmenten, die durch enzymatische und chemische Spaltung von Ausgangs-IgG-Mabs oder, noch einfacher, aus künstlichen Quellen hergestellt werden.

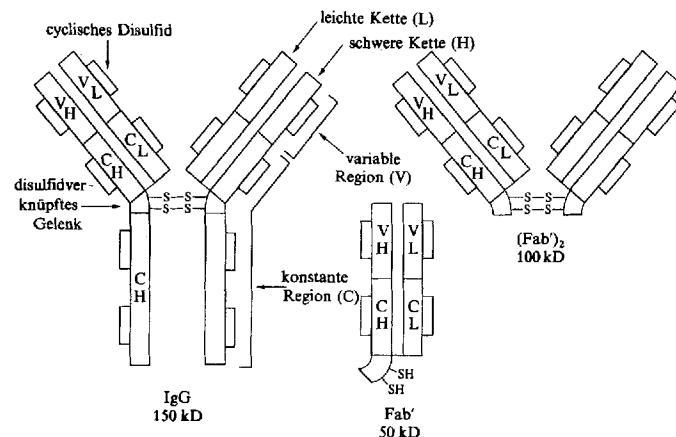
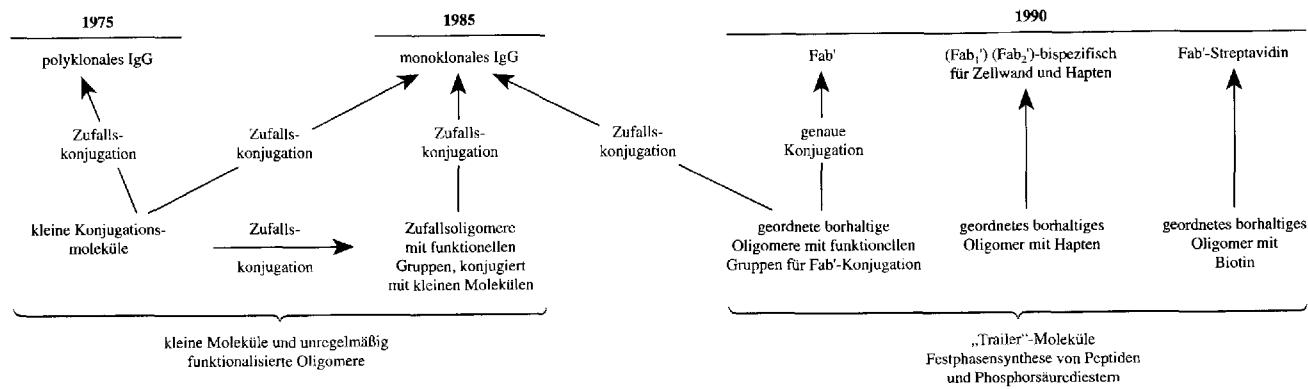


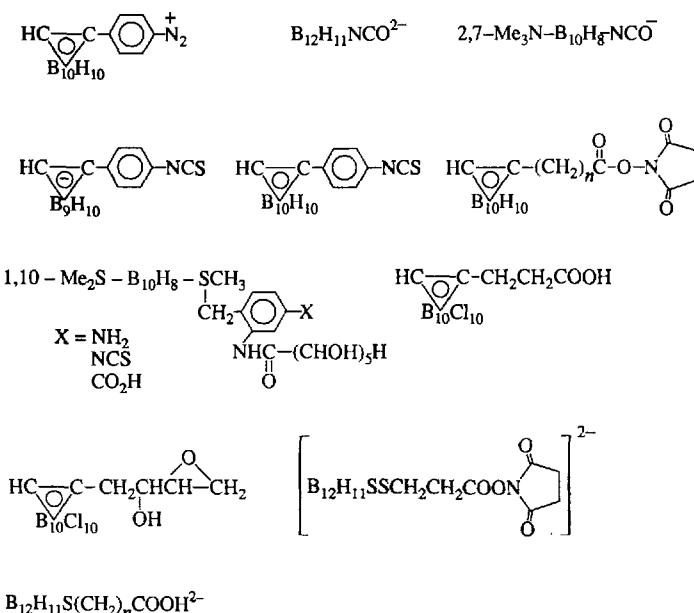
Abb. 2. Vereinfachte Darstellungen der Immunglobuline IgG, (Fab')<sub>2</sub> und Fab' und ihrer Strukturbeziehungen. Jedes dieser Immunglobuline bindet am Ende der VH- und VL-Ketten an das Antigen. Leichte und schwere Kette sind jeweils durch eine S-S-Einheit verknüpft, die als einfacher Strich dargestellt ist.

Schema 8 gibt einen Überblick über die historische Entwicklung der Antikörper-Konjugation und der Methoden zur Borlieferung. Die Untersuchung der Borkonjugationschemie anhand von Modellproteinen wie Rinderserumalbumin und menschlichem  $\gamma$ -Globulin ist in den siebziger Jahren in mehreren Labors fast gleichzeitig aufgenommen worden. Das erste chemische Ziel war die Synthese borhaltiger Reagenzien mit 9–10 Boratomen pro Molekül und einer hohen Reaktivität gegenüber den  $\epsilon\text{-NH}_2$ - oder  $\text{-SH}$ -Gruppen von Lysin- bzw. Cysteinresten in der Antikörperstruktur<sup>[108]</sup>. Schema 9 zeigt mehrere dieser ersten Reagenzien sowie einige, die zu einem späteren Zeitpunkt entwickelt wurden. Die Arbeiten mit mehreren Arten von polyklonalen IgG-Antikörpern und mit großen Proteinmolekülen wie Rinderseumalbumin als Modellsubstraten verzeichneten nur einen langsamem Fortschritt<sup>[109]</sup>.

Die ersten Versuche, den Nutzen der Antikörpermethode anhand von polyklonalen Antikörpern und einfachen Konjugationsreagentien aufzuzeigen, z.B. mit dem aus dem Ami-

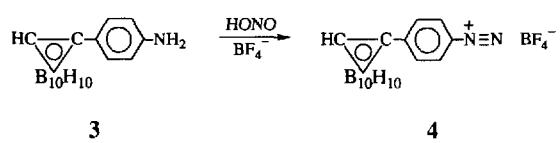


Schema 8. Die Entwicklung von Konjugationsmethoden für Immunglobuline und die Entdeckung hoch bispezifischer Antikörper, die möglicherweise für die Lieferung von <sup>10</sup>B an Tumorzellen nützlich sein können, ohne daß eine kovalente Konjugation nötig ist.



Schema 9. Eine Zusammenstellung von Reagentien, die in Studien zur Immunglobulinkonjugation eingesetzt wurden. Einige davon werden in dieser Übersicht ausführlicher besprochen.  $n = 1-4$ .

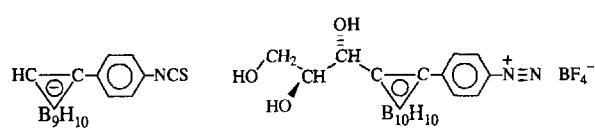
nophenylcarboran **3** erhältlichen Diazoniumsalz **4**<sup>[110]</sup>, schienen erfolgreich. **4** wurde mit polyklonalen Antikörpern konjugiert, die gegen die Histokompatibilitätsantigene von Menschen und Mäusen gerichtet waren. Das Konjugat wur-



de dann für in-vitro-Abtötungen peripherer Blutzymphozyten mit thermischen Neutronen verwendet. Es zeigte sich eine spezifische antikörperbestimmte Cytotoxizität, obwohl jedes Antikörpermolekül nur etwa 30–50 Boratome in der natürlichen Isotopenverteilung (20% <sup>10</sup>B) enthielt. Ein weiteres Experiment ergab einen Zelltod gleichen Ausmaßes (30% überlebende Zellen nach 2 min Bestrahlung) bei Lymphozyten, die mit einer Lösung von  $K_2B_{10}H_{10}$ , die 2 µg B pro µL enthielt, oder mit einer Lösung, die  $3.8 \times 10^{-3}$  µg B pro µL, konjugiert mit 1.9 µg Antikörper pro µL, (0.2% B in natürlicher Isotopenverteilung) aufwies, behandelt wurden.

Die Wirksamkeit von Bor in Verbindung mit einem für die Zelle spezifischen Antikörper scheint also 500mal höher zu sein, als wenn es als  $K_2B_{10}H_{10}$  in Lösung vorliegt.

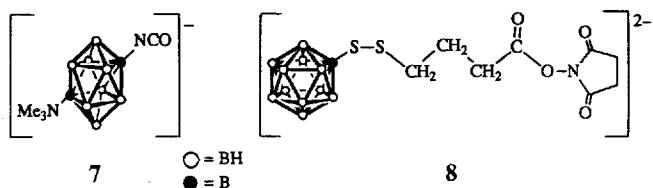
Später wurde **4** mit polyklonalen Antikörpern aus Ziegen für carcinoembryonales Antigen (CEA) konjugiert. Die Konjugate, die bis zu achtzig B-Atome pro Antikörpermolekül enthielten, wurden sowohl *in vitro*<sup>[106a]</sup> als auch in Bioverteilungsstudien an Transplantaten von menschlichem Dickdarmtumor in Goldhamstern untersucht<sup>[106b]</sup>. Die Belege dieser Experimente belegten die immunologische Integrität der Borkonjugate, da die Selektivität bezüglich des Tumors bei den *in-vivo*-Experimenten gut war. In all diesen Experimenten war aber die injizierte Antikörperkonjugatdosierung sehr niedrig und der Borgehalt des Konjugats relativ gering. Wenn versucht wurde, den Borgehalt der Antikörperkonjugate durch eine Intensivierung der Konjugationsreaktion zu erhöhen, dann wurde das Protein denaturiert, ein Niederschlag bildete sich, und die Immunreaktivität nahm ab<sup>[106, 111]</sup>. Später wurden Reagenzien wie das Anion **5**<sup>[112]</sup> und Carboranderivate einfacher Zucker, z.B. **6**<sup>[113]</sup>, synthetisiert, um die Wasserlöslichkeit der Carboranderivate durch hydrophile Substituenten zu verbessern. Diese Versuche waren aber nicht erfolgreich.



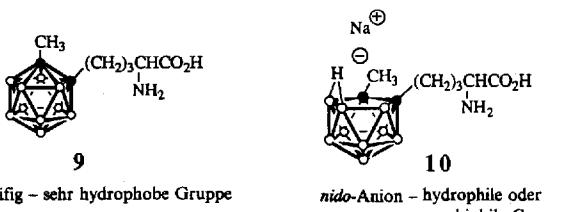
5 6

Die Komplexität und Heterogenität hochbeladener Antikörperkonjugate polyklonaler oder monoklonaler Abstammung führten zu einem alternativen Ansatz, borhaltige Mabs mit mindestens  $10^3$  B-Atomen pro Molekül herzustellen. Bei dieser neuartigen Taktik wurde bedacht, daß Mabs mit sehr vielen Boratomen beladen werden können, ohne daß sich ihre Struktur und Funktion signifikant ändern, wenn borreiche oligomere Moleküle an nur wenige willkürlich gewählte Stellen auf der Mab-Oberfläche gebunden werden. Zum Beispiel können etwa fünf Oligomermoleküle, die jeweils 200 Boratome enthalten, nach dem Zufallsprinzip an verfügbare NH<sub>2</sub>- oder SH-Gruppen des Mab angelagert werden, und die so entstandene Konjugatmischung kann dann von nicht reagiertem Mab getrennt werden.

Wie aus Schema 8 zu entnehmen, begannen Untersuchungen zu dieser Methode Anfang der achtziger Jahre in mehreren Arbeitskreisen<sup>[114, 115]</sup>. Mit Ausnahme der auf Dextran basierenden Systeme von Gabel et al.<sup>[116]</sup> wurden die oligomeren borreichen Konjugationsreagentien selbst nach dem Zufallsprinzip hergestellt, indem man poly-DL-Lysin<sup>[114]</sup> oder poly-L-Ornithin<sup>[115]</sup> mit Reagentien wie DL-7 oder 8 umsetzte. Die dabei gebildeten konjugierten Oligomere hatten eine nicht genau bekannte Kettenlänge und enthielten unterschiedlich viele unverbrauchte NH<sub>2</sub>-Gruppen. Die Kopplung derartiger Oligomere mit Mabs unterschiedlicher Idiotypen führte zu konjugierten Mabs mit im Mittel  $1 \times 10^3$ – $2 \times 10^3$  Boratomen. Leider waren die Immunreaktivitäten dieser konjugierten Mabs erheblich schlechter als die der Stamm-Mabs. Außerdem haben Experimente an Mäusen gezeigt, daß die modifizierten Mabs sehr stark von der Leber und in geringerem Maße als die Stamm-Mabs vom Tumor aufgenommen wurden. Kürzliche Untersuchungen mit einem Starburst-Dendrimer mit 48 Aminogruppen als Substrat für die Reaktion mit DL-7 ergaben nach der Konjugation mit einem Mab analoge Befunde<sup>[117]</sup>.



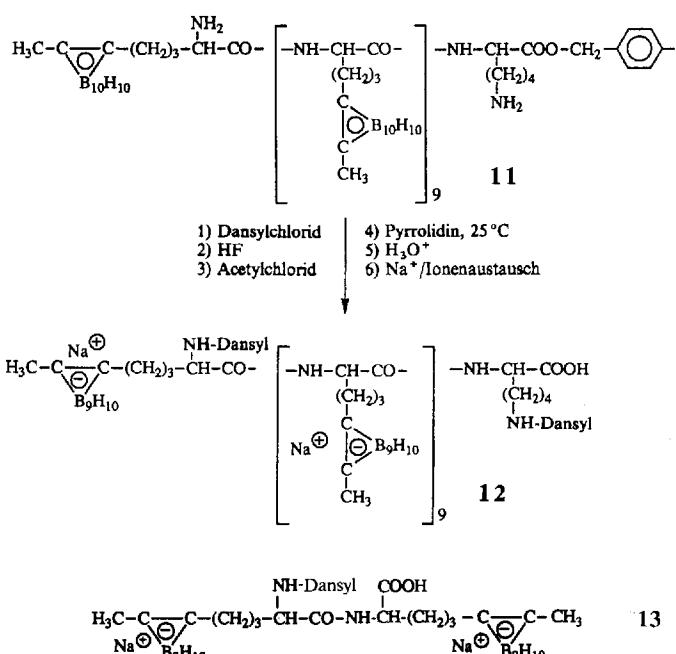
Parallel zu diesem Ansatz mit nach dem Zufallsprinzip aufgebauten Oligomeren begannen wir<sup>[118, 119]</sup> mit der Untersuchung gezielt durch Merrifield-Festphasensynthese hergestellter oligomerer Peptide aus borreichen  $\alpha$ -Aminosäuren (Bor-, „Trailer“). Schema 10 enthält die Aminosäurederivate, die in diese ersten Studien Eingang fanden<sup>[120, 121]</sup>, nämlich die hydrophobe *creso*-Verbindung 9 und deren amphiphiles *nido*-Derivat 10.



● C, ○ BH

Schema 10. DL-9 und ein Diastereomer von 10, die Aminosäurederivate, die in der Synthese von Peptidoligomeren für die Antikörperkonjugation eingesetzt wurden.

Schema 11 zeigt die Fluoreszenzmarkierung des Undecapeptids 11, das aus 9 erhältlich war, und seine Umwandlung in die hydrophilere Verbindung 12 mit *nido*-10-Resten. Ein ähnlich fluoreszenzmarkiertes *nido*-Dipeptid, 13, wurde ebenfalls hergestellt. Die Zufallskonjugation von 13 und 12 mit anti-carcinoembryonalem Antigen IgG-Mab T84.66 über aktivierte Ester führte zu konjugierten Mab-Molekülen mit im Mittel 63 bzw. 490 Boratomen<sup>[121]</sup>. Die Daten zur Bioverteilung wurden an Nacktmäusen mit LS-174T-

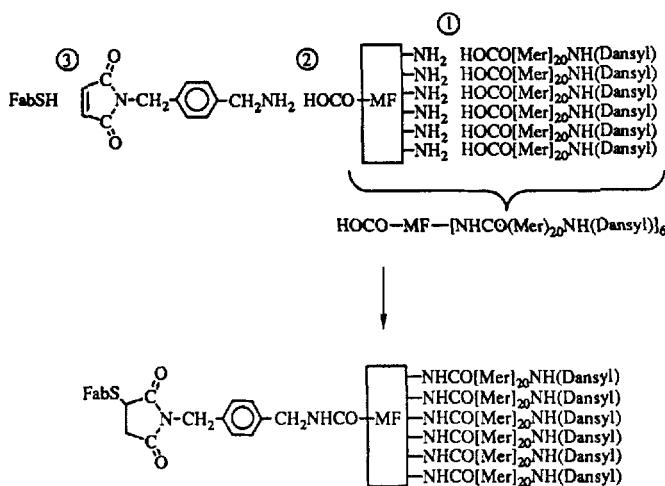


Schema 11. Das durch Festphasensynthese erhaltene Peptid 11 und sein *nido*-Derivat 12. Das Peptid 12 wurde mit Antikörpern konjugiert und das entstehende Konjugat in Bioverteilungsstudien eingesetzt (siehe Abschnitt 7.3.1). In 12 und 13 kann Dansyl (= 5-Dimethylamino-1-naphthylsulfonyl) teilweise durch Acetyl ersetzt sein.

Fremdgewebetransplantaten und mit <sup>125</sup>I-markierten Mab-Konjugaten ermittelt. Während die Bioverteilungsergebnisse für das Dipeptidkonjugat denen des ursprünglichen Mab ähnelten, zeigte das Undecapeptidkonjugat eine erheblich verstärkte Aufnahme durch die Leber und eine verringerte Aufnahme durch den Tumor. Daraus folgt<sup>[121]</sup>, daß der Verlust an zirkulierendem Konjugat an die Leber wirksam mit dessen Positionierung im Tumor konkurriert, wenn der Bor Gehalt des Konjugats erhöht wird. Ein kleineres Immunglobulin, das spezifisch mit einer kleinen Menge an hydrophilen oligomeren Reagensmolekülen markiert ist, würde die Heterogenität und Komplexität des Konjugats herabsetzen und so vielleicht zu seiner selektiveren Positionierung im Tumor führen<sup>[119]</sup>.

Das verallgemeinerte Fab'-Molekül in Abbildung 2 steht für eine Klasse von Immunglobulinen, die aus der reduktiven Spaltung der beiden Disulfidbindungen im Gelenk der entsprechenden (Fab')<sub>2</sub>-Verbindung entstehen oder vielleicht auch aus künstlichen Hybridomen, die so ausgelegt sind, daß sie Fab' oder maßgeschneiderte Varianten seiner Basisstruktur wie monofunktionelles FabSH exprimieren. Das Fab', das sich aus einem IgG-Mab mit einer Antigenbindungs konstante von  $10^{11} \text{ M}^{-1}$  herleitet, kann eine Bindungskonstante von etwa  $10^9$ – $10^{10} \text{ M}^{-1}$  erreichen und damit ein nützliches Trägermolekül sein. Die zwei SH-Gruppen eines Fab'- oder die eine SH-Gruppe eines FabSH-Moleküls können zur Konjugation mit einer ganzen Reihe gezielt synthetisierte borreicher Trailer-Moleküle herangezogen werden<sup>[119]</sup>, von denen jeweils mehrere an kleine, ebenfalls gezielt synthetisierte, als Bindungsmultiplikatoren dienende poly-L-Lysin-Moleküle gebunden sind, wie Schema 12 zeigt.

Die ersten Trailer-Moleküle, z.B. 12, waren diastereomere Mischungen aus kleinen amphiphilen Peptiden, die von DL- $\alpha$ -Aminosäuren mit anionischen *nido*-Carboranresten und fluoreszierenden Markierungsgruppen abstammten<sup>[119–121]</sup>.

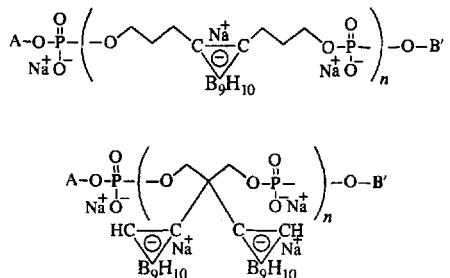


Schema 12. Schematische Darstellung der Synthese eines Konjugats aus FabSH, Linker-Molekül, Polylysin-Molekül als Bindungsmultiplikator (MF) und borreichen Oligomer mit fluoreszierenden Dansylgruppen. Die Zahlen stehen für die Reihenfolge der Verknüpfungen. Mer = Wiederholungseinheit. Das Konjugat enthält etwa  $10^3$  Boratome.

Es ist jedoch auch möglich, Oligomere aus Phosphorsäure-diesteren borhaltiger Diole<sup>[122]</sup> aufzubauen, wie in Schema 13 gezeigt. Die hydrophilen Estereinheiten garantieren

### 7.3.2. Bindung bor- und haptoreicher Oligomere an Zellwandantigene mit bispezifischen Antikörpern oder über andere Wirt-Gast-Wechselwirkungen

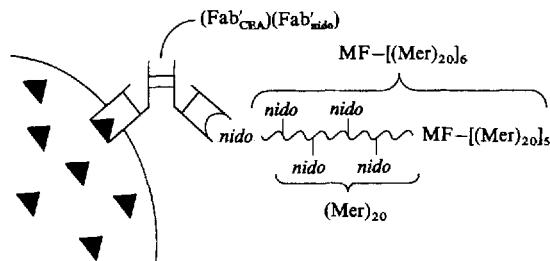
Bispezifische Antikörper<sup>[124]</sup> wie das unsymmetrische (Fab')<sub>2</sub>-Molekül (Fab'<sub>nido</sub>)(Fab'<sub>CEA</sub>) können ein Zellwandantigen wie CEA mit einer *nido*-Carboran-Anionen-Haptengruppe verknüpfen, die in hoher Konzentration in einer borreichen, hydrophilen Trailer-Substanz vorliegt. Immunchemische Wechselwirkungen dieser Art machen es möglich, große Bormengen ohne Zuhilfenahme kovalenter Bindungen an Zellwandantigenen zu konzentrieren. In der Praxis würde der bispezifische Antikörper dem tumorösen Versuchstier intravenös injiziert. Dann erfolgte Bindung des Fab'<sub>CEA</sub>-Segments des bispezifischen Antikörpers an CEA-Orte; das Blut würde sich von überschüssigen zirkulierenden Antikörpern reinigen und schließlich würde die bor- und haptoreiche Trailer-Verbindung injiziert. Eine Trailer-Hapten-Fab'<sub>nido</sub>-Bindung würde gebildet und damit wäre die selektive (Antigen-Fab'<sub>CEA</sub>)(Fab'<sub>nido</sub>-Hapten-Trailer)-Bindung abgeschlossen. Schema 14 zeigt den fertigen Antigenkomplex. Das borreiche Trailer-Molekül könnte in jeder Monomereinheit eine anionische *nido*-Carboran-Haptengruppe und insgesamt mindestens  $10^3$  Boratome enthalten.



- A = Thymidin, B' =  $(CH_2)_6NH_2$ , n = 10  
 A = Biotin-C(O)NH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>, B' =  $(CH_2)_6NH_2$ , n = 20  
 A = Thymidin, B' =  $[CH_2CH(Fluorescein)CH_2OP(O)_2O(CH_2)_6NH_2]^-$ , n = 40  
 A = [ThymidinOP(O)<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH(Fluorescein)CH<sub>2</sub>]<sup>-</sup>, B' =  $(CH_2)_6SH$ , n = 50

Schema 13. Beispiele für nur einige der unzähligen Strukturen, die durch die automatisierte Oligonucleotidsynthese als oligomere, borhaltige Phosphorsäure-diester zugänglich sind.

zusammen mit den anionischen *nido*-Carboranresten die hydrophilen Eigenschaften dieser oligomeren Reagentien. Die Phosphatoligomere werden noch interessanter dadurch, daß sie mit den für die DNA-Synthese entwickelten automatisierten Verfahren schnell synthetisiert werden können. Dazu kommt noch die Leichtigkeit, mit der UV-absorbierende Nucleosidreste, fluoreszierende Markierungsgruppen, Biotin, Segmente von Polynucleotiden und endständige Linker-Gruppen in die Oligomerstruktur eingebaut werden können<sup>[123]</sup>. Innerhalb eines Tages kann man einen Phosphat-Trailer herstellen, der im Prinzip Hunderte von Boratomen enthalten und direkt oder indirekt an die SH-Gruppen eines Fab'-Moleküls binden kann<sup>[119]</sup>. Schema 13 zeigt nur einen kleinen Ausschnitt aus den strukturellen Möglichkeiten dieser Trailer-Chemie und schlägt ein Phosphatoligomer für die Bindung an Fab'-Moleküle über ein passendes Linker-Molekül vor. Forschung auf diesem Gebiet wird derzeit intensiv betrieben.

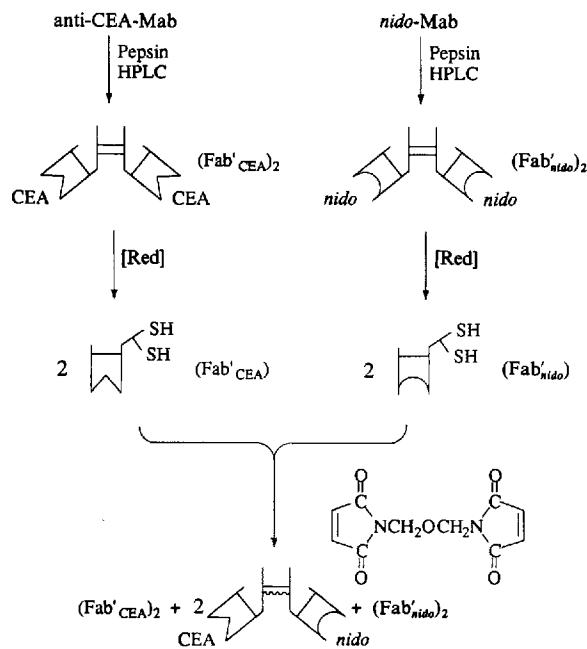


Schema 14. Schematische Darstellung der Verwendung eines bispezifischen Antikörpers (Fab'<sub>CEA</sub>)(Fab'<sub>nido</sub>) für die gleichzeitige Bindung an ein Antigen einer Tumorzellwand und an ein bor- und *nido*-Hapten-reiches Oligomer mit ca.  $10^3$  Boratomen, analog dem in Schema 12 gezeigten.

Die Synthese eines bispezifischen Antikörpers des hier beschriebenen Typs verlangt letztlich eine Quelle für das Fab'<sub>nido</sub>-Fragment, z.B. das Stamm-IgG<sub>nido</sub>. Ein solches Mab kann inzwischen mit einem Mäusehybridom gewonnen werden<sup>[125]</sup>. Schema 15 zeigt einen Weg zur Synthese eines bestimmten bispezifischen Antikörpers. Dieser Antikörper könnte auch aus Quadromquellen gewonnen werden, die durch Fusion verfügbarer anti-CEA-Mab- und -IgG<sub>nido</sub>-Hybridome entstehen<sup>[126]</sup>.

Eine Variante des Konzepts bispezifischer Antikörper ist die Nutzung der starken Streptavidin-(Biotin)<sub>4</sub>-Komplexbierung<sup>[127]</sup>. In diesem Fall wird das Fab'<sub>CEA</sub> mit zwei Streptavidinmolekülen konjugiert (ein Molekül pro SH-Gruppe) und dem tumorösen Versuchstier intravenös injiziert. Nach der Konzentration des Fab'<sub>CEA</sub> am Tumor und seiner Entfernung aus dem Blut wird eine borreiche Trailer-Verbindung mit einem terminalen Biotinrest in der gleichen Weise zugeführt. Die folgende in-vivo-Komplexbildung würde das borreiche Trailer-Molekül an Fab'<sub>CEA</sub>-belegten Antigenstellen konzentrieren.

Neue Fortschritte bei der immunologischen Borpositierung an Tumoren zeigen, daß solche Liefermethoden



Schema 15. Synthese eines bispezifischen Antikörpers aus seinen IgG-Vorläufermolekülen anti-CEA-Mab und IgG<sub>nido</sub>-Mab. Ein solches bispezifisches System ist auch im Schema 14 zu sehen.

möglicherweise bei einigen Tumoren von Nutzen sind. Antikörper-„Cocktails“, d.h. Mischungen aus Immunglobulinen, von denen jedes ein anderes Antigen auf der gleichen Tumorzelle ansteuert, können die Borkonzentrationen im Tumor erhöhen. Schwierigkeiten, die z.B. aus der Heterogenität von Tumoren oder einer uneinheitlichen Gefäßbildung resultieren, bleiben bestehen. Bei der Suche nach Abhilfe könnten die Immuntransportmethoden jedoch mit ganz anderen Borliefermethoden kombiniert werden.

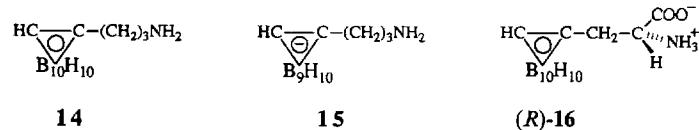
#### 7.4. Rezeptorabhängige Regulatorpeptide als Borlieferanten

Der Transport von Bor zu Tumorzellantigenen mit Hilfe der Immunglobuline ist verwandt mit dem durch ausgewählte Regulatorpeptide zu Rezeptorstellen, von denen die Tumorzellmembran sehr viel mehr aufweist als die Membran gesunder Zellen<sup>[128, 129]</sup>. Die Zahl dieser Rezeptoren auf einer Tumorzelle beträgt möglicherweise nur 10<sup>4</sup>–10<sup>5</sup>. Doch da sie ihr gebundenes Regulatorpeptid ins Zellinnere abgeben und dabei regeneriert werden, liegt eine Art Pumpenwirkung für die Peptidaufnahme vor, die von der intrazellulären Peptidkonzentration reguliert wird. Eine akzeptable Regenerierungsgeschwindigkeit der Rezeptoren und eine dichtere Annäherung des aufgenommenen Bors an den Zellkern machen dieses Lieferkonzept attraktiv. Peptide wie der epidermale Wachstumsfaktor (EGF)<sup>[128]</sup> und das Corticotropin-freisetzungshormon (CRH)<sup>[129]</sup> mit 53 bzw. 41 Aminosäureresten kommen dafür in Frage. Beide werden derzeit auf ihre Eignung als rezeptorabhängige relativ niedermolekulare Borlieferanten untersucht. EGF-Rezeptoren werden von vielen Tumoren in Lunge, Brust, Blase, Kopf und Hals des Menschen überexprimiert. CRH wiederum ist für Hypophysentumore mit corticotrophen Zellen (Cushing-Syndrom) geeignet. Ein drittes interessantes Peptid ist das Wachstumshormon-freisetzungshormon (GHRH). Wie CRH hy-

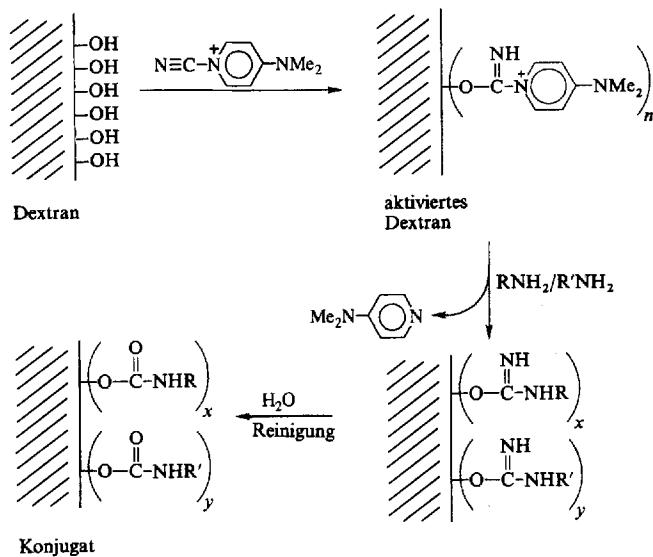
pophysengerichtet, reagiert dieses aus 40 Aminosäuren bestehende Peptid spezifisch auf somatotrophe Zellen (Akromegalie). Die erfolgreiche Verwendung der CRH- und GHRH-Liefersysteme für die BNCT würde nichtinvasive Behandlungsmethoden für das Cushing-Syndrom und die Akromegalie eröffnen.

#### 7.4.1. EGF-Konjugation

Carlsson, Sjöberg et al.<sup>[128]</sup> sowie Barth, Carlsson et al.<sup>[130]</sup> haben begonnen, EGF-Konjugation mit primären Carboranylaminen<sup>[131]</sup> wie **14** und dessen *nido*-Analogon **15** sowie mit (*R*)- und (*S*)-Carboranylalanin **(R)-16**<sup>[86]</sup> zu untersuchen. Ihre Konjugationsmethode basiert auf der Verknüp-



fung von Dextran mit den Aminogruppen im EGF und den Aminogruppen des Carboranylaminlderivats unter Verwendung von 1-Cyan-4-dimethylaminopyridiniumtetrafluoroborat als Aktivator nach Schema 16. Die so erhaltenen Kon-



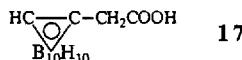
Schema 16. Mechanismus der Konjugation von EGF (RNH<sub>2</sub>) und einem aminofunktionalisierten Carboranderivat R'NH<sub>2</sub> mit Hilfe von Dextran.

jugate sind relativ klein (20–30 kD) und werden bezüglich ihrer Eignung als Borlieferanten für Gliomzellen getestet.

#### 7.4.2. Boreinbau in CRH- und GHRH-Strukturen

CRH und GHRH sind ähnlich groß, unterscheiden sich aber in ihren biologisch wichtigen Endgruppen; CRH kann ohne wesentlichen Verlust der Corticotropinaktivierung durch Hinzufügen einer Aminosäure an seinem Aminoende modifiziert werden<sup>[129]</sup>. GHRH dagegen kann ohne wesentlichen Verlust seiner biologischen Aktivität nur am Carboxy-

ende modifiziert werden. Loriaux und Albertson<sup>[129]</sup> haben carboranmodifizierte GHRH- und Schaf-CRH-Spezies untersucht, die von Chen et al. hergestellt worden waren<sup>[132]</sup>. Die CRH-Spezies wurde durch normale Merrifield-Synthese erhalten, wobei das Serin-Aminoende mit Carboranylessigsäure **17** acyliert wurde. GHRH wurde durch Zugabe eines Lysinrests, dessen  $\varepsilon$ -Aminogruppe mit **17** acyliert war, an seinem Carboxyende modifiziert. Beide modifizierten Pep-



tide lösten biologische Reaktionen in vitro aus, die denen der nichtmodifizierten Peptide entsprachen<sup>[129]</sup>. Ihre Wirksamkeit als Borlieferanten muß noch untersucht werden. Der Borgehalt der Peptide könnte am sinnvollsten durch Verwendung kleiner Bor-Trailer-Moleküle anstelle von **17** erhöht werden. Größe, Ladung und Hydrophobie des Trailer-Moleküls erfordern eine sorgfältige Auswahl, um die Rezeptorkennung und die Bindung im Konjugat beizubehalten.

### 7.5. Zellwandrezeptorabhängige LDL-Vesikel als Borlieferanten

Das in Abbildung 3 schematisch wiedergegebene und in Abschnitt 6.1 kurz behandelte LDL-Vesikel<sup>[133–135]</sup> besteht aus einer Phospholipid/Cholesterinhülle mit einem Durchmesser von etwa 15–20 nm, die mit Cholesterylestern langkettiger Fettsäuren gefüllt ist. An die Vesikelaußenseite

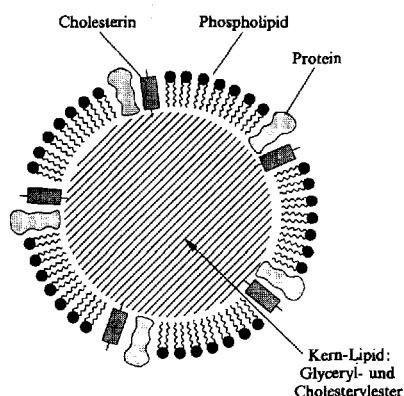
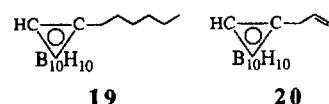
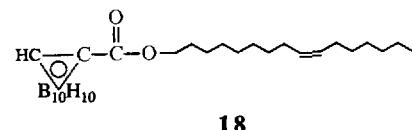


Abb. 3. Stilisierter Querschnitt eines mit Glyceryl- und Cholesterylestern von Fettsäuren gefüllten LDL-Vesikels. Das auf der Vesikeloberfläche exponierte Protein reagiert auf die LDL-Rezeptorstellen der Plasmamembran von Zellen.

bindet das Apoprotein B-100 und dient als spezifischer Anker für Rezeptorstellen der äußeren Zellwände von bösartigen und von gesunden Zellen. Rezeptor-LDL-Komplexe gelangen durch Endozytose ins Zellinnere; dort wird das LDL durch Lysosome zu Cholesterin abgebaut, und der Rezeptor kehrt an die äußere Zellwand zurück. Auf diesem Weg werden etwa 90 % des Cholesterins erhalten, das für die Synthese der Zellmembranen gebraucht wird<sup>[136]</sup>. Man geht davon aus, daß Krebszellen wegen ihrer höheren Zellteilungsgeschwindigkeit und daher höheren Rezeptorumwandlungsgeschwindigkeit Cholesterin (und LDL) viel schneller verbrau-

chen als gesunde Zellen. Aufgrund dessen kann zwischen diesen Zellen unterschieden werden und in Tumorzellen kann Bor angereichert werden, wenn man die Cholesterylester im Vesikelkern durch eine borreiche Substanz ersetzt. Dieses Konzept wurde ursprünglich von Kahl et al.<sup>[91, 137]</sup> vorgeschlagen. Sie setzten es in die Tat um, indem sie von Fettalkoholen abgeleitete Ester von Carborancarbonsäuren, z.B. **18**, statt der ursprünglichen Cholesterylester verwendeten<sup>[138]</sup>, nachdem sie letztere durch Lösungsmittelextraktion aus „geernteten“ LDL-Vesikeln entfernt hatten. Die neuen LDL-Vesikel enthielten jeweils etwa  $12 \times 10^3$  Borgeatome<sup>[91, 137]</sup>. Spätere Arbeiten<sup>[91b]</sup> ergaben, daß auch mit einfachen hydrophoben Carboranderivaten wie dem 1-Hexylderivat **19** und dem 2-Propenylderivat **20** LDL-Vesikel gut rekonstituiert werden können. In-vitro-Tests mit die-



sen neuen Borlieferanten an CHO- und V-79-Zellen von chinesischen Hamstern bei Beschuß mit thermischen Neutronen am Brookhaven Medical Research Reactor zeigten, daß intrazelluläre Borkonzentrationen bis zu 240 µg pro g Zellen erreicht wurden<sup>[91a]</sup>. Das ist ein spektakuläres Ergebnis! Kahl und seine Mitarbeiter haben kürzlich Bioverteilungsstudien an kleinen Tieren begonnen, aber noch sind keine Befunde bekannt.

### 7.6. LDL-Komplexe mit Porphyrinen und Phthalocyaninen als rezeptorabhängige Borlieferanten

Es ist schon lange bekannt, daß Porphyrin, Phthalocyanin und verwandte heterocyclische Moleküle dazu neigen, sich in festen Tumoren anzureichern und dort lange zu bleiben. Auf dieser Eigenschaft der Porphyrine basiert die photodynamische Therapie (PDT)<sup>[139]</sup>. Dies ist eine weitere binäre Therapie, bei der im Tumor vorhandene Porphyrinderivate als *in situ*-Photosensibilisatoren fungieren, um mit Hilfe von rotem Licht Singulett-Sauerstoff herzustellen<sup>[140]</sup>. Porphyrinderivate, die Bor für BNCT-Zwecke enthalten, sind auch hinsichtlich einer möglichen Verwendung in der PDT interessant. Wie in Abschnitt 6.1 erwähnt, ist der Mechanismus dieser Positionierungen noch nicht bekannt, obwohl die differenzierte Aufnahme durch gesundes und bösartiges Gewebe die Vermutung nahelegt, daß hier ein rezeptorabhängiger Mechanismus vorliegt, der vom sehr hohen Turnover in Tumorzellen profitiert. Am effektivsten sammeln sich im Tumorgewebe die Porphyrine an, die wasserlösliche amphiphile Verbindungen mit hydrophoben Substituenten sind, z.B. BOPP **23**. An einem plausiblen rezeptorabhängigen Mechanismus könnten LDL-Vesikel<sup>[94]</sup> beteiligt sein, deren hydrophobe Bestandteile zirkulierendes Porphyrin solvatisieren und einschließen. Schnelle Aufnahme der porphyrinbelade-

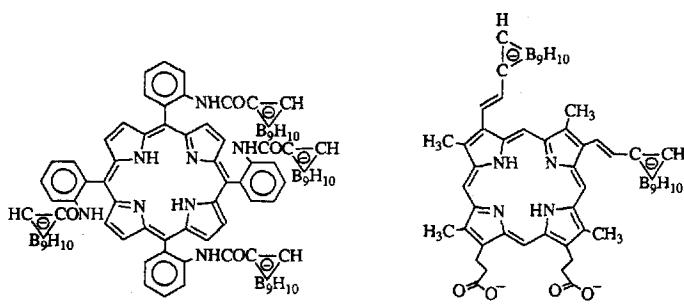
nen LDLs durch die Tumorzellen würde dann zur Anreicherung des Heterocyclus im Zellinnern führen.

Die Eignung von borhaltigen Porphyrinen als BNCT-Reagenzien wird seit Anfang der achtziger Jahre untersucht. Repräsentative bereits synthetisierte Derivate sind Abkömmlinge des Tetraphenylporphyrins, z.B. BTPP **21**<sup>[141]</sup>, und des Hämatoporphyrins, z.B. VCDP **22**<sup>[142]</sup> und BOPP **23**<sup>[143]</sup>. Die *nido*-7,8-C<sub>2</sub>B<sub>9</sub>H<sub>11</sub>-Reste in **21** und **22** sind nötig, um diese Spezies wasserlöslich zu machen. Da der anionische *nido*-Carboranylsubstituent eher ein amphiphiler<sup>[119]</sup> als ein hydrophiler Substituent ist, zerstört dieses Vorgehen zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit die hydrophoben Eigenschaften von **21** und **22** nicht völlig. Es liegt nahe zu vermuten, daß **23** hydrophober ist als **21** und **22**, weil es vier sehr hydrophobe *cis*-Carboranylgruppen trägt<sup>[144a]</sup> und nur zwei hydrophile Carboxylatgruppen die hydrophilen Eigenschaften verbessern. Die größere Hydrophobie von **23** bedingt vielleicht direkt seine verglichen mit **21** und **22** selektivere Positionierung und längere Verweilzeit im Tumor<sup>[144b, c]</sup>. Die Bioverteilung von BTPP **21**<sup>[145]</sup>, VCDP **22**<sup>[142a, 146]</sup> und BOPP **23**<sup>[143, 147]</sup> ist mit einer Reihe von Tumoren in Mäusen untersucht worden. Dabei handelte es sich um Gliome und

Porphyrinderivate wurde **23**<sup>[147]</sup> am besten durch den Tumor aufgenommen und hatte eine akzeptable Verweildauer in ihm.

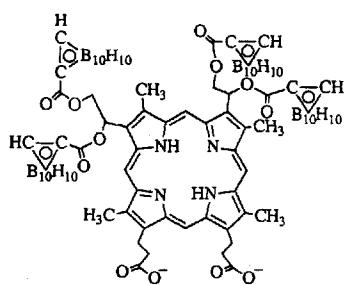
Bei kürzlichen Untersuchungen an intracerebralen Gliomgewebetransplantaten in CBA-Mäusen fanden Hill, Kahl et al.<sup>[148]</sup>, daß **23**, intravenös oder intraperitoneal injiziert (30 mg B pro kg Körpergewicht), in Konzentrationen von > 20 µg B pro g Tumor angereichert wurde, während die Konzentrationen im Blut weniger als halb so groß und die im gesunden Hirn nicht messbar niedrig waren. Fluoreszenzuntersuchungen mit **23** und einem konfokalen Laser-Rastermikroskop zeigten auch, daß diese Verbindung intrazellulär und sowohl in vitro als auch in vivo fast nur in Organellen angereichert wurde. Ultrazentrifugieren ergab, daß es sich bei diesen Organellen um Mitochondrien handelte. Es wurde berechnet, daß eine solche intrazelluläre Anreicherung von **23** die für eine Tumornekrose durch BNCT nötige Bormenge auf etwa ein Zehntel (2–3 µg B pro g Gliom) reduzieren könnte. **23** ist eindeutig eine interessante Verbindung für die Behandlung einer Vielzahl von Tumoren, und Untersuchungen zum Zweck seiner baldigen Akzeptanz in BNCT-Kreisen schreiten schnell voran.

Radiometallkomplexe der Phthalocyanine sind als diagnostische Reagentien verwendet worden, weil sie sich ähnlich wie die Porphyrine in Tumoren anreichern<sup>[149]</sup>. Soloway et al.<sup>[149]</sup> haben offenbar durch Reaktion von 1-(4-Aminophenyl)-*cis*-1,2-C<sub>2</sub>B<sub>10</sub>H<sub>10</sub> mit Kupfer-tetra(chlorsulfonyl)phthalocyanin und nachfolgende Hydrolyse ein sulfonierte, wasserlösliches Kupferphthalocyaninderivat hergestellt. Einzelheiten bezüglich der Reinigung, Charakterisierung und Anreicherung dieser Verbindung in Tumoren sind noch nicht bekannt.



**21** BTPP

**22** VCDP



**23** BOPP

Melanome. Die Porphyrinderivate wurden entweder intravenös oder intraperitoneal injiziert. Alle drei Verbindungen wurden vom Tumor aufgenommen und blieben dort mehrere Tage, die genauen Daten zur Boranreicherung hingen jedoch von experimentellen Einzelheiten und vom Porphyrinderivat ab. **23** wurde noch nach Wochen im Tumor nachgewiesen. Die Borkonzentrationen in der Leber waren im allgemeinen etwa zweimal so hoch wie die gleichzeitig im Tumor bestimmten, und der Borgehalt in der Milz und in den Nieren war ebenfalls erhöht. Aus dem Blut verschwand das Bor mit der Zeit. Es wurden oft Dosen von 25–50 mg B pro kg Körpergewicht injiziert und in den Carcinomen Borkonzentrationen von 15 bis 40 µg pro g Tumor gefunden. Von den

## 7.7. Synthetische Liposomen als tumordifferenzierende „Supertanker“ für die Borlieferung

Die Abschnitte 6.1 und 7.5 behandelten LDLs<sup>[91]</sup> und ihre Zellwandrezeptoren als mögliche Systeme für die Lieferung von Bor an Tumorzellen in relativ großen Mengen. Die LDLs sind mit einer Klasse von Vesikeln verwandt, die als synthetische unilamellare Liposomen bezeichnet werden<sup>[90]</sup> und die aus einer Phospholipid-Doppelschicht als sphärischem Mantel und einem wäßrigen Kern bestehen. Die wäßrigen Zentren der Vesikel der meisten in der BNCT verwendeten Liposomen enthielten hydrophile Natriumsalze von polyedrischen Boran-Anionen gelöst, obwohl die Phospholipid-Doppelschicht im Prinzip auch eingebettete lipophile Verbindungen enthalten könnte. Kleine, multilamellare Liposomen mit mehreren Phospholipidschichten könnten vielleicht mit borhaltigen Lipiden als Bestandteilen verwendet werden. Abbildung 4 zeigt rechts einen Querschnitt durch ein typisches unilamellares Liposom und links Einzelheiten der Doppelschichtstruktur. Die für die Borpositionierung am Tumor verwendeten unilamellaren Liposomen<sup>[90]</sup> haben Durchmesser zwischen 30 und 80 nm und cholesterinreiche Doppelschichten aus rein synthetischen Phospholipiden, die ihnen die mechanische Festigkeit verleihen, die sie für eine lange Verweilzeit im Gefäßsystem brauchen. Das in Abbildung 4 gezeigte Liposom besteht aus einem Phospholipid ohne Nettoladung an seinem polaren Ende, doch es können auch Liposomen mit negativen<sup>[150]</sup> oder positiven<sup>[151]</sup> Net-

### Lecithin (Phosphatidylcholin)

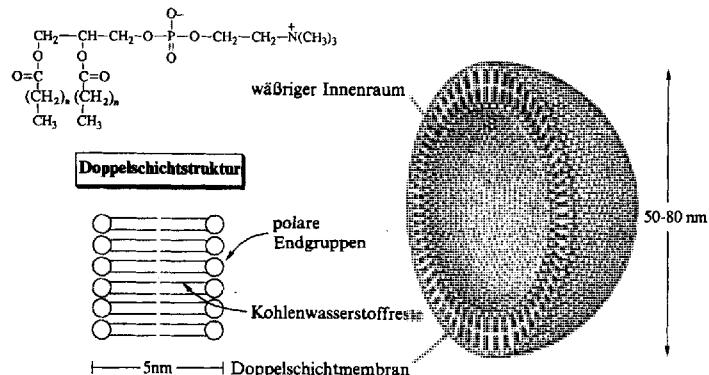


Abb. 4. Schnitt durch ein Liposom von der Art, wie es sich für die Borlieferung an Tumore in Mäusen als wirksam erwiesen hat. Synthetisches Phosphatidylcholin bildet gemeinsam mit Cholesterin die Doppelschichtmembran dieser synthetischen Liposomen.

toldungen hergestellt werden. Eine derartige Oberflächenladung beeinflußt die Bioverteilung und die Pharmakokinetik. Wie in Abschnitt 7.7.1 gezeigt wird, können sich Liposomen von der Art, wie sie für die Borlieferung gebraucht werden, nach intravenöser Injektion sehr gut in einer Vielzahl von Tumoren anreichern. Sie sind schon früher als tumorselektive Lieferanten von Radiopharmazeutica in Tierversuchen<sup>[152]</sup> und für die Diagnose beim Menschen<sup>[153]</sup> verwendet worden. Im Gegensatz zu den LDLs enthalten synthetische Liposomen keine rezeptorschürenden Komponenten, obwohl sie, wie in Abschnitt 6.1 erwähnt, von Tumorzellen selektiv aufgenommen werden. Man nimmt an, daß diese Selektivität zumindest großteils auf das nicht ausgereifte und daher unüblich poröse Gefäßsystem von schnellwachsenden Tumoren zurückzuführen ist<sup>[93]</sup>. Die Aufnahme ins Zellinnere selbst könnte durch eine unspezifische Endozytose des Typs Coated Pit → Coated Vesicle erfolgen<sup>[92, 154]</sup>. Alternativ könnten LDL-Rezeptorstellen für kleine Liposomen zugänglich sein und so eine selektive Aufnahme wie bei den LDLs ermöglichen.

#### 7.7.1. Unilamellare Liposomen

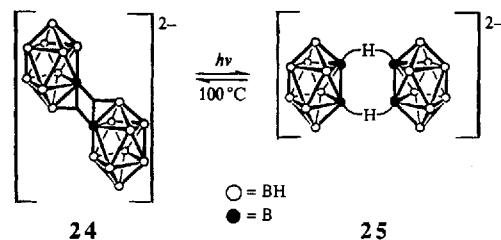
Wir haben unilamellare Liposomen des in Abbildung 4 gezeigten Typs intensiv auf ihre Eignung als Borlieferanten untersucht<sup>[90, 155]</sup>. Frühere Befunde von Forschern bei Vestar hatten gezeigt, daß derartige Liposomen ihren Inhalt bevorzugt an die Tumorzellen in Tieren und Menschen abgeben. Dabei ist der Gehalt an Effektormolekülen im Tumor fünf- bis zehnmal so hoch wie im gesunden Gewebe und im Blut<sup>[151–153]</sup>. Aus den Natriumsalzen polyedrischer Boran-Anionen, die sich von  $B_{10}H_{10}^{2-}$ , seinem Oxidationsprodukt  $n\text{-}B_{20}H_{18}^{2-}$ <sup>[\*]</sup> und deren Derivaten ableiten, konnten wässrige Lösungen (250–300 mM) mit sehr geringer Hydrolyseempfindlichkeit erhalten werden, die als wässrige Kerne von 40–80 nm großen Liposomen verwendet wurden<sup>[90, 155]</sup>. Diese hyperosmotischen Vesikel haben sich im allgemeinen als stabil erwiesen. Sie sind monatelang lagerbar und bleiben 3–4 Tage im Kreislauf. Die in-vivo-Stabilität hing dabei aber immer von der im Vesikelkern gelöst vorliegenden Substanz

[\*] n und i bezeichnen hier das zuerst synthetisierte „normale“ bzw. sein Photoisomer.

ab. Untersuchungen zur Bioverteilung vieler borhaltiger Liposomen des hier besprochenen Typs zeigten, daß die Leber und die Milz (Reticuloendothelzellen) erhebliche Mengen an Liposomen anreicherteren und darin mit dem Tumor konkurrirten. Das Verhältnis der Borkonzentrationen von Leber und Tumor war zu Beginn oft etwa 2:1, nahm aber mit der Zeit meist ab. Das Blut wurde mit der Zeit immer von den Liposomen gereinigt, und ein Verhältnis der Borkonzentrationen von Tumor und Blut von 5:1 und mehr war nicht ungewöhnlich, wenn die Konzentration des Bors im Tumor im therapeutisch sinnvollen Bereich lag (20–40 µg B pro g Tumor). Es gibt Methoden, die Liposomenaufnahme durch Reticuloendothelzellen zu unterdrücken<sup>[151]</sup> und so die Anreicherung in der Milz zu unterbinden. Die effektive Toxizität aller von Liposomen gelieferten Verbindungen<sup>[90, 155]</sup> sollte durch die Einkapselung verringert sein. Detaillierte Toxizitätsdaten für die Mehrzahl der interessanteren unter den untersuchten Verbindungen sind noch nicht bekannt, doch wurden zumindest bei Mäusen mit Tumoren, die therapeutisch nützliche Bormengen anreicherteren, keine akuten Wirkungen beobachtet. Die meisten Untersuchungen zur Bioverteilung wurden an BALB/c-Mäusen mit implantierten EMT6-Mäuse-Adenocarcinomen durchgeführt<sup>[90, 155]</sup>.

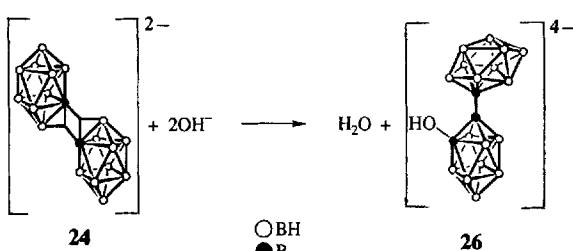
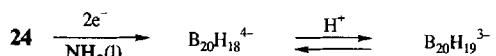
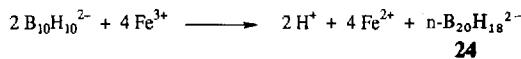
$Na_2B_{10}H_{10}$  war das erste polyedrische Boran-Anion, das wie oben beschrieben eingekapselt wurde<sup>[90, 155]</sup>. Untersuchungen mit geringen injizierten Gesamtbormengen (6 mg B pro kg Körpergewicht) zeigten, daß die  $B_{10}H_{10}^{2-}$ -Ionen in den Tumor, die Leber und die Milz eindrangen, daß aber alle diese Gewebe mit etwa der gleichen Geschwindigkeit wieder gereinigt wurden und kein Bor im Tumor verblieb. BSH ( $Na_2B_{12}H_{11}SH$ ) wurde als nächstes untersucht (7 mg B pro kg Körpergewicht) und lieferte nahezu die gleichen Ergebnisse wie  $Na_2B_{10}H_{10}$ . Dies zeigte, daß ein Boranderivat nur wirksam sein kann, wenn es mit Bestandteilen des Cytoplasmas wie den allgegenwärtigen Aminogruppen in intrazellulären Proteinen reagieren kann.

Die Umwandlung der isomeren Ionen  $n\text{-}B_{20}H_{18}^{2-}$  **24**<sup>[157]</sup> und  $i\text{-}B_{20}H_{18}^{2-}$  **25**<sup>[158]</sup> ineinander nach Schema 17 und ihre Chemie<sup>[156]</sup>, die in Schema 18 am Beispiel von **24** gezeigt ist<sup>[90, 155]</sup>, ließen die Aufnahme dieser Verbindungen in Zellen nach Schema 19 möglich scheinen. Die  $B_{20}H_{18}^{2-}$ -Ionen



Schema 17. Reversible Umwandlung des thermodynamisch günstigeren  $n\text{-}B_{20}H_{18}^{2-}$  **24** in sein weniger stabiles Photoisomer  $i\text{-}B_{20}H_{18}^{2-}$  **25**.

stellen pro jeweils drei Ionen zweimal so viele Boratome zur Verfügung wie  $Na_2B_{10}H_{10}$ , so daß bei gleichem osmotischen Stress des Liposoms die doppelte Menge Bor verfügbar ist. In Schema 4 ist die günstigste Synthese von  $B_{10}H_{10}^{2-}$ <sup>[71]</sup> aus  $B_{10}H_{14}$  beschrieben, die nach entsprechender Anpassung auch die Synthese von  $^{10}\text{B}$ -angereichertem  $B_{10}H_{10}^{2-}$  ermöglicht, das als Vorläufer für eine ganze Reihe



Schema 18. Synthese von  $\text{n-B}_{20}\text{H}_{18}^{2-}$  24 und dessen Zwei-Elektronen-Reduktion zu  $\text{e}^2\text{-B}_{20}\text{H}_{18}^{2-}$  ( $\text{e} = \text{äquatorial}$ ), das durch säurekatalysierte Umlagerung die  $\text{ae}$ - und  $\text{a}^2$ -Isomere ( $\text{a} = \text{apical}$ ) ergibt. Die  $\text{B}_{20}\text{H}_{19}^{3-}$ -Intermediate dieser Umlagerungen kann man nachweisen, und das stabile Isomer,  $\text{a}^2\text{-B}_{20}\text{H}_{19}^{3-}$ , läßt sich leicht isolieren. Die  $\text{B}_{10}\text{H}_{18}^{2-}$ -Käfige sind in  $\text{B}_{20}\text{H}_{18}^{2-}$  und  $\text{B}_{20}\text{H}_{19}^{3-}$  durch eine normale Zwei-Elektronen-Bindung zwischen apicalen und/oder äquatorialen Boratomen miteinander verbunden, was zu den drei möglichen isomeren Strukturen  $\text{e}^2$ ,  $\text{ae}$  und  $\text{a}^2$  führt. Reaktion von 24 mit  $\text{OH}^-$  ergibt kinetisch kontrolliert das  $\text{ae}$ -2-Hydroxyisomer 26, das mit  $\text{B}_{20}\text{H}_{18}^{4-}$  isoelektronisch ist.

von Verbindungen, darunter  $\text{n}$ - und  $\text{i}$ - $\text{B}_{20}\text{H}_{18}^{2-}$  (24 bzw. 25), dient.

Wie erwartet, wiesen  $\text{Na}_2(\text{n-B}_{20}\text{H}_{18})$ -haltige Liposomen (15 mg B pro kg Körpergewicht) bessere Eigenschaften auf, denn die Menge des verfügbaren Bors in einer Standardliposomendosis war höher. Noch wichtiger ist die Tatsache, daß das  $\text{n-B}_{20}\text{H}_{18}^{2-}$ -Ion 24 im Tumor verblieb und zugleich aus anderem Gewebe schneller verschwand. 24 Stunden nach der Injektion betrug die Borkonzentration im Tumor 24 µg B pro g Tumor, und das Verhältnis der Borkonzentrationen in Tumor und Blut war 1.2:1. Nach 48 Stunden lauteten die entsprechenden Werte 3.3 bzw. 14:1.

Das reaktivere Photoisomer  $\text{Na}_2(\text{i-B}_{20}\text{H}_{18})$  (11 mg pro kg Körpergewicht) war ziemlich persistent. Die Borkonzentration im Tumor betrug nach 48 Stunden (14 µg/g) immer noch 71 % des nach 6 Stunden bestimmten Wertes. In dieser Zeit erhöhte sich das Verhältnis der Borkonzentrationen in Tumor und Blut auf 12:1. Freies  $\text{Na}_2(\text{i-B}_{20}\text{H}_{18})$  in einer Pufferlösung dagegen blieb nach der Injektion (11 mg B pro kg Körpergewicht) nicht lange im Körper, sondern wurde schnell ausgeschieden. Nach 24 Stunden betragen die Borkonzentrationen in Tumor, Blut und Leber nur noch 1.9, 1.9 bzw. 8.9 µg/g. In einem weiteren Experiment wurden  $\text{Na}_2(\text{i-B}_{20}\text{H}_{18})$ -haltige Liposomen (15 mg B pro kg Körpergewicht) zweimal (nach 0 und nach 24 h) injiziert. Die Ergebnisse nach 24 Stunden glichen den früheren. Nach der zweiten Injektion und einer Gesamtdauer von 48 Stunden betrug die Borkonzentration im Tumor 27 µg/g, und das Konzen-

trations-Verhältnis für Tumor zu Blut war 2.6:1. Dies sind therapeutisch sinnvolle Werte. Die Borkonzentration in der Leber war etwa 60 µg/g.

Ausgehend von diesen Untersuchungen mit Liposomen, die Derivate der isomeren  $\text{B}_{20}\text{H}_{18}^{2-}$ -Ionen enthielten, wurden weitere Anreicherungskonzepte entwickelt. Die isomeren Hydrolyseprodukte  $\text{B}_{20}\text{H}_{17}\text{OH}^{4-}$ <sup>[156a]</sup> von 24 (26 in Schema 18) und 25 sind isoelektronisch zu den  $\text{B}_{20}\text{H}_{18}^{4-}$ -Ionen<sup>[159]</sup> aus der Zwei-Elektronen-Reduktion von 24 bzw. 25. Das Kaliumsalz von 26 wurde nach den gängigen Verfahren auf seine BNCT-Eignung untersucht. Es zeigte sich, daß es, wie  $\text{Na}_2\text{B}_{10}\text{H}_{10}$ , schnell aus dem Tumor verschwindet. Mit  $\text{Na}_3\text{B}_{20}\text{H}_{19}$ <sup>[159]</sup> aus der Protonierung von  $\text{a}^2\text{-B}_{20}\text{H}_{18}^{4-}$  dagegen wurden 6 Stunden nach der Injektion (8 mg B pro kg Körpergewicht) noch fast 30 µg B pro g Tumor nachgewiesen. Die Borkonzentration im Tumor nahm langsam ab, während die in der Leber 30 Stunden lang zunahm. Nach 48 Stunden hatte der Borgehalt im Blut 7.5 µg/g erreicht, während der im Tumor auf 12 µg/g gesunken war. Diese Befunde leiteten die Entdeckung des wirksamsten polyedrischen Boran-Anions ein, das bisher getestet wurde.

Das ammoniaksubstituierte  $\text{ae-B}_{20}\text{H}_{18}^{4-}$ ,  $\text{B}_{20}\text{H}_{17}\text{NH}_3^-$  27 (siehe Schema 20), ähnelt dem Stammanion, nur daß ein Hydridoligand formal durch ein ungeladenes  $\text{NH}_3$ -Molekül ersetzt wurde, so daß die Ionenladung nur noch -3 beträgt. Tests mit  $\text{Na}_3\text{B}_{20}\text{H}_{17}\text{NH}_3$  in Liposomen (11 mg B pro kg Körpergewicht) ergaben spektakuläre Resultate, wie in Abbildung 5 zu sehen ist<sup>[160, 161]</sup>. Sogar bei dieser niedrigen

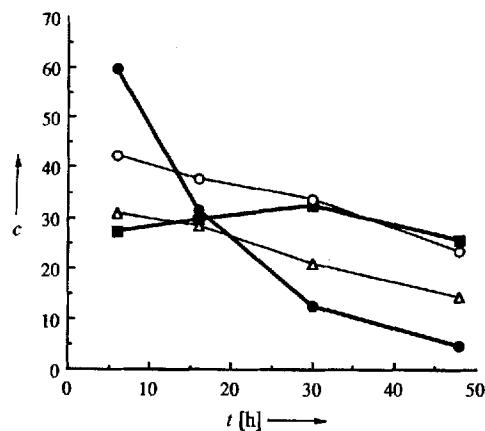
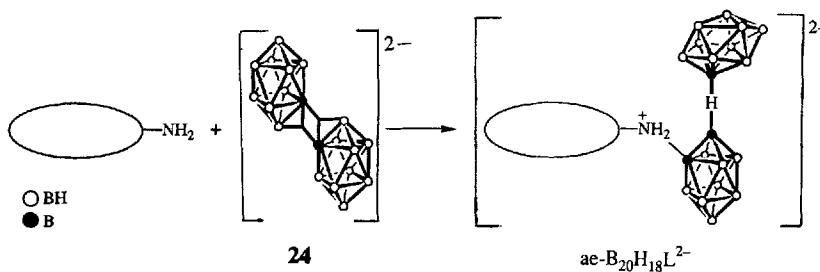


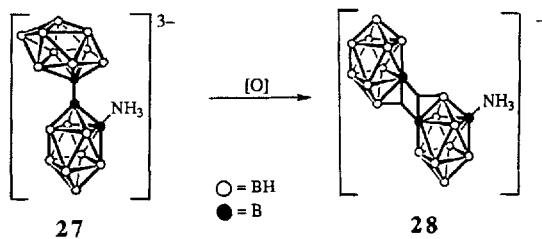
Abb. 5. Daten aus einer Untersuchung zum zeitlichen Verlauf der Verteilung von liposomalem  $\text{Na}_3\text{B}_{20}\text{H}_{17}\text{NH}_3$  (11 mg B pro kg Körpergewicht) in BALB/c-Mäusen mit EMT6-Brust-Adenocarcinomen. c = Borkonzentration im Gewebe in µg/g. ● = im Blut, ■ = im Tumor, ○ = in der Leber, △ = in der Milz.

injizierten Dosis lag die Borkonzentration im Tumor nach 48 Stunden mit 25 µg/g im therapeutisch sinnvollen Bereich. Zugleich waren mit 23 bzw. 5 µg/g die Borkonzentrationen



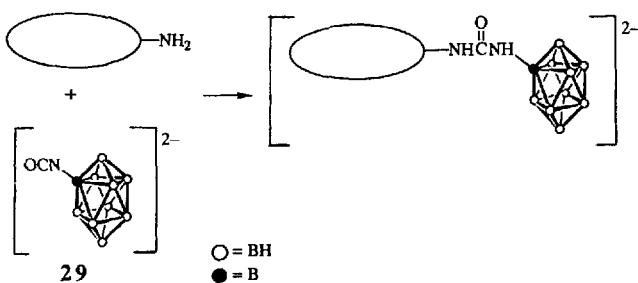
Schema 19. Vorgeschlagener Mechanismus der Reaktion eines intrazellulären Proteinmoleküls, symbolisiert als  $\text{-NH}_2$  mit 24 zu einem  $\text{ae-B}_{20}\text{H}_{18}^{2-}$ -Derivat. Das  $\text{i-B}_{20}\text{H}_{18}^{2-}$ -Isomer 25 würde analog, aber leichter reagieren.

in Leber und Blut gering. Tatsächlich hatte die Borkonzentration im Tumor in den ersten 30 Stunden zugenommen und einen Höchstwert von 35 µg/g erreicht. Eine mögliche Erklärung dafür geht davon aus, daß **27** in einer intrazellulären Zwei-Elektronen-Oxidation  $B_{20}H_{17}NH_3^-$  **28** liefern könnte (Schema 20), das wegen seiner nur einfach negativen Ladung elektrophiler als die  $B_{20}H_{18}^2-$ -Ionen wäre und stärkere intrazelluläre Bindungen gemäß Schema 19 eingehen könnte. Außerdem verhindert irgendeine weitere Eigenschaft die Aufnahme großer Mengen an **27** durch die Leber und bewirkt zugleich einen niedrigen Bor-Endgehalt im Blut. **27** wird derzeit sorgfältig untersucht, weil seine Kombination mit Liposomen eines der wirksamsten Borliefersysteme ist, das bisher für kleine Tiere gefunden wurde.



Schema 20. Vorgeschlagener Mechanismus der intrazellulären Oxidation von **27** zum sehr reaktiven, aber hypothetischen  $B_{20}H_{17}NH_3^-$  **28**, das schnell mit intrazellulären Proteinen reagieren sollte.

Ein weiteres reaktives polyedrisches Boran-Anion-Derivat ist vor kurzem synthetisiert und auf seine BNCT-Eignung untersucht worden<sup>[162]</sup>. Hierbei handelt es sich um 2-Isocyanato-closo- $B_{10}H_9^2-$  **29**<sup>[163]</sup>, dessen Isocyanatgruppe durch intrazelluläre Reaktion mit Aminogruppen von Proteinen nach Schema 21 das entsprechende Harnstoffderivat bilden sollte. Abbildung 6 zeigt die Befunde erster Untersu-



Schema 21. Mögliche Reaktion von **29** mit einem intrazellulären Proteinmolekül  $\text{-NH}_2$ .

chungen zur Bioverteilung mit Liposomen, die das Natriumsalz von **29** enthalten, und zum Vergleich mit  $Na_2B_{10}H_{10}$  erhaltene Ergebnisse. Man sieht, daß **29** besser als seine Stammverbindung von Tumor, Leber und Milz gespeichert wird. Es liegt daher die Vermutung nahe, daß die Isocyanatgruppe von **29** entsprechend den Erwartungen Bindungen zu intrazellulären Proteinen bildet. Die Synthese und das Testen von Liposomen, die andere polyedrische Anionen mit funktionellen Gruppen enthalten, gehen weiter.

Moore et al.<sup>[164]</sup> berichteten über das Einbringen von hydrophoben Carboranthiouracilderivaten (siehe Abschnitt 7.10.1), die in einer Lipiddoppelschicht gelöst waren, mit Hilfe von 100 nm großen Phospholipid-Liposomen in

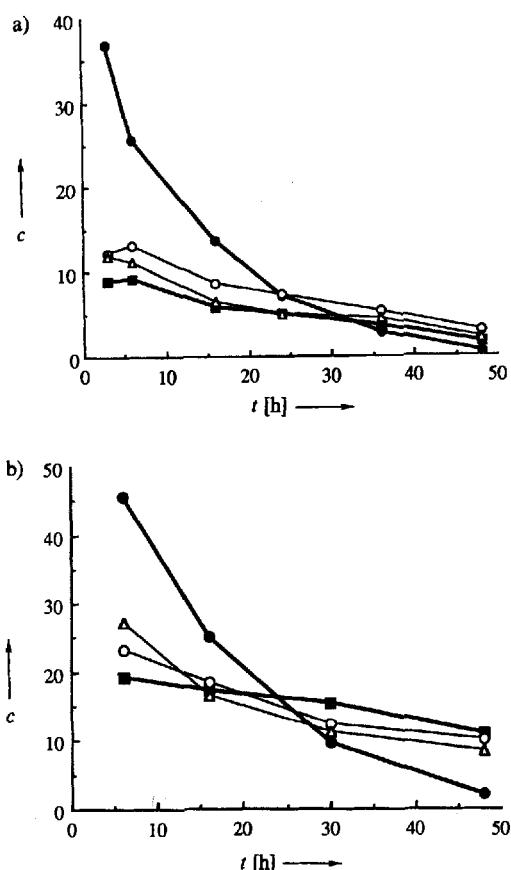


Abb. 6. Vergleich des zeitlichen Verlaufs der Verteilung von liposomalem  $Na_2B_{10}H_{10}$  (a) und  $Na_2[2\text{-OCN-}B_{10}H_9]$  (b) in BALB/c-Mäusen mit EMT6-Brust-Adenocarcinomen. Bei (a) wurden 6, bei (b) 9 mg B pro kg Körpergewicht injiziert. Für weitere Erläuterungen siehe Abb. 5.

Melanomgewebetransplantate in Mäusen, doch die Wirksamkeit dieses Verfahrens kann aus den berichteten Befunden nicht abgeleitet werden. Sicher ist lediglich, daß eine hohe Tumorselektivität beobachtet wurde.

Die Einfachheit und breite Anwendbarkeit sowie die faszinierenden ersten Ergebnisse mit Liposomen haben diese zu einem der vielversprechendsten Borliefersysteme gemacht, das bisher entwickelt wurde.

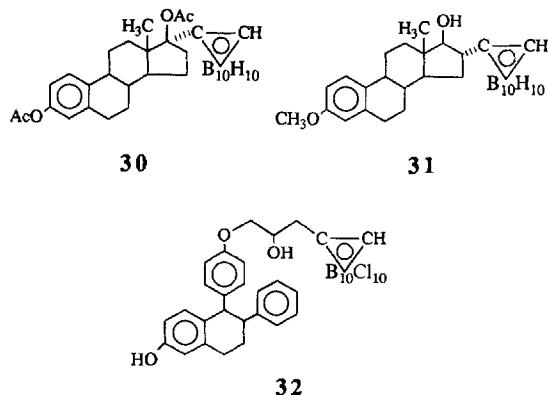
## 7.8. Das Potential von Sexualhormonrezeptoren für die Borlieferung an den Zellkern

Sowohl bei Brust- als auch bei Prostatakrebs dominieren Zelllinien, die auf die fortwährende Aufnahme von Östrogen bzw. Dihydrotestosteron angewiesen sind. Diese Hormone werden aktiv, nachdem sie mit ihren jeweiligen Rezeptoren im Cytosol der entsprechenden Zelle einen Komplex gebildet haben und dieser durch Translokation zum Chromatin im Zellkern gelangt ist.

Hadd<sup>[165]</sup> und Kahl<sup>[166]</sup> haben unter anderem die Östradiolcarborane **30** und **31** synthetisiert. Hechter und Schwartz<sup>[167]</sup> verwendeten verfügbare Daten bezüglich der Dichte an Rezeptorstellen, um die Borkonzentration zu berechnen, die mit Rezeptoren dieser Art erreicht werden könnte. Untersuchungen mit wirksamen Hormonersatzstoffen mit einem Carborankäfig (zehn Boratomen) pro Molekül zeigten, daß auf diese Art nur etwa 0.015 µg B pro g Gewebe an das Chromatin gebunden werden konnten. Eine

Konzentration von 1–2 µg B pro g Gewebe wurde dagegen als angemessen betrachtet, weil das Bor in den Zellkern integriert wäre.

Untersuchungen zu dieser Art der selektiven Borlieferung sind anscheinend nicht fortgesetzt worden. Gabel et al.<sup>[168]</sup> haben aber das borreiche Analogon **32** des Antiöstrogenmoleküls U23469-M mit einem Decachlorcarboransubstituenten hergestellt. Diese Verbindung wurde unspezifisch von



ZR-75-1-Brustkrebszellen aufgenommen und verhinderte teilweise die Aufnahme von Östradiol durch diese Zellen. Es wurde angenommen, daß pro Zelle etwa  $10^4$  bis  $10^5$  Rezeptorstellen zur Verfügung stehen, was weit unter der Zahl liegt, die therapeutisch wirksame Bormengen ergibt. Auch in diese Richtung ist nicht weiter geforscht worden. Sogar durch das Einbringen von Bor in den Zellkern ist es also nicht gelungen, die für eine BNCT nötige Konzentration zu erreichen.

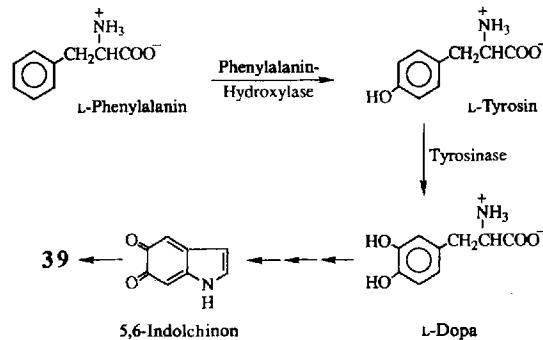
## 7.9. Einsatz borhaltiger Aminosäuren in der Proteinsynthese

In letzter Zeit ist die Untersuchung einer Vielzahl von borhaltigen Aminosäurederivaten in den Vordergrund gerückt. Diese Verbindungen könnten Bor zu Tumoren transportieren, indem sie in die Proteinsynthese oder den Proteinmetabolismus der schnell wachsenden Tumorzellen eingehen. L-4-Dihydroxyborylphenylalanin<sup>[87]</sup> wurde besonders intensiv getestet, und L-Carboranylalanin<sup>[144a]</sup>, ein Analogon von Phenylalanin, ist erst vor kurzem dank verbesserter Methoden synthetisiert worden<sup>[86]</sup>. Spielvogel<sup>[169]</sup> hat als erster Ersatzstoffe für natürliche Aminosäuren synthetisiert, in denen ein Kohlenstoffatom durch ein isoelektronisches und isosteres Boratom mit vier Valenzelektronen und einer negativen Formalladung ersetzt ist. Dieses Forschungsgebiet gehört im Moment zu den sich am schnellsten entwickelnden der BNCT-Forschung.

### 7.9.1. Untersuchungen mit L-4-Dihydroxyborylphenylalanin

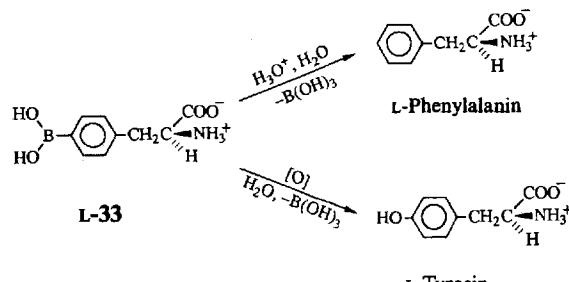
Snyder et al.<sup>[170]</sup> beschrieben als erste DL-4-Dihydroxyborylphenylalanin (BPA), **DL-33** (siehe Schema 23), das von Soloway et al.<sup>[57]</sup> an Tieren getestet wurde. Es bot eine viel höhere Tumor-Hirn-Selektivität (8.5:1) als alle anderen Borsäuren, die damals eingesetzt wurden. **33** fand danach

aber kein Interesse als Zielverbindung für die BNCT mehr, bis Mishima et al.<sup>[87, 171]</sup> die Wirksamkeit von <sup>10</sup>B-angereichertem BPA gegen das B-16-Melanom in vitro und gegen das Greene-Melanom in Hamstern bei Neutronenbestrahlungsexperimenten entdeckten. Nach den Ergebnissen weiterer Untersuchungen an Duroc-Schweinen<sup>[171]</sup> und an Menschen mit einem Melanom<sup>[172]</sup> zeigt <sup>10</sup>B-angereichertes DL- oder L-**33** eine BNCT-Wirkung und zerstört primäre, hoch pigmentierte Läsionen. Wegen seiner extrem geringen Löslichkeit in Wasser wurde **33** als Hydrochlorid intraperitoneal um die Läsion herum injiziert oder oral verabreicht. Durch Veresterung von **33** mit Zuckern wurden Komplexe mit besserer Löslichkeit erhalten<sup>[173]</sup>. Diese Verwendung von **33** zur Melanombehandlung wurde von Mishima et al.<sup>[87]</sup> ausgehend von der Tatsache entwickelt, daß das Melaninpigment, das normalerweise in aktiven Melanomeoplasmen vorkommt, aus natürlichen Aminosäuren mit aromatischen Ringen wie L-Dopa, L-Tyrosin und L-Phenylalanin synthetisiert wird – vermutlich über die Zwischenstufe 5,6-Indolchinon. Man ging davon aus<sup>[87, 171]</sup>, daß **33** ebenfalls in diese Kategorie von Melaninvorläufern fällt<sup>[174]</sup> und daß es in das charakteristische Melanin, das intrazelluläre Melanosomen produzieren, eingebaut würde. Schema 22 zeigt die Biosynthese von Melanin. **33** könnte aber nur unter



Schema 22. Mehrstufige enzymatische Oxidation von L-Phenylalanin zum 5,6-Indolchinonpolymer Melanin **39**. Die Struktur von **39** ist nicht bekannt.

der Bedingung an diesem Mechanismus teilnehmen, daß die 4-Dihydroxyborylgruppe noch vor der Bildung des Chinons, wahrscheinlich als Borsäure, abgespalten wird<sup>[175]</sup>. Dies könnte durch säurekatalysierte Hydrolyse der B-C-Bindung oder durch oxidative Spaltung der C-B-Bindung erfolgen (Schema 23). Die Wanderung von Borsäure aus dem Zellinnern in das extrazelluläre Volumen ist ein leicht ablaufender Prozeß, der eine Boranreicherung im Tumor ausschließ-



Schema 23. Bekannte Reaktionen von **L-33**, die in vivo ablaufen und zur Abspaltung von Borsäure führen könnten.

ßen sollte. Der Aufbau therapeutisch nützlicher Borkonzentrationen in Melanomen (und anderen Tumorarten) ist daher wahrscheinlich auf einen anderen Bioverwertungsweg von **33** zurückzuführen.

Morrison et al.<sup>[46]</sup> haben durch Ionenmikroskopie erhaltene experimentelle Befunde veröffentlicht, die zur Lösung des Problems beitragen. Sie entwickelten ein Zellkultursystem für die Untersuchung der Medikamentenaufnahme durch einen bösartigen, hochpigmentierten M-3-Mäusemelanom-Klonstamm. Der Pigmentgehalt (Ausmaß der Melanisierung) konnte Stück für Stück den Ionenintensitäten durch Überlagerung lichtmikroskopischer Aufnahmen und Ionenabbildungen zugeordnet werden. Das arylgebundene Deuterium in  $[D_4]L$ -Tyrosin und das Bor in **DL-33** dienten dabei als Quellen für die Ionenabbildung. In jedem Teil der Zellkultur korrelierte die Zunahme der Melaninkonzentration linear mit dem Anwachsen der Deuteriumkonzentration. Dies belegt die Aufnahme von Tyrosin, einem bekannten Melaninvorläufer (siehe Schema 22). Bei der Melaninproduktion änderte sich die Borkonzentration nicht, woraus man schließen kann, daß **DL-33** sein Bor nicht in das Melanin der sich entwickelnden Melanomzellen einbringt.

Coderre et al.<sup>[176]</sup> haben gezeigt, daß **33** von den schwach pigmentierten B-16-Melanomen in C57BL-Mäusen angereichert wird. Dies legt die Vermutung nahe, daß die Aufnahme von **33**, bei der nach den Befunden anderer Experimente das L-Enantiomer bevorzugt wird<sup>[174]</sup>, über den aktiven Transport der Aminosäure für andere Zwecke als den der Melaninsynthese verläuft. Dies ist für eine mögliche Therapie sehr wichtig, weil viele Melanomarten im Menschen unterschiedlich und sehr gefährliche Metastasen im Frühstadium ihrer Entwicklung überhaupt noch nicht pigmentiert sind.

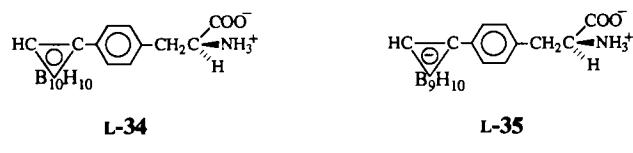
Außerdem haben Coderre et al.<sup>[174]</sup> gezeigt, daß **L-33** gegen das Harding-Passey-Melanom viel wirksamer war als sein Enantiomer, daß die orale Aufnahme von  $^{10}\text{B}$ -angereichertem **33** zu Borkonzentrationen bis zu 40  $\mu\text{g}/\text{g}$  im Tumor von BALB/c-Mäusen führte<sup>[176]</sup> und daß die Wachstumshinderung bei diesen Tumoren direkt mit dem Neutronenfluß korrelierte, so daß das Tumorwachstum durch Verlängerung der Bestrahlungszeit, wie erwartet, stärker verzögert werden konnte. Neuere Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe zeigten<sup>[177]</sup>, daß Bor auch an andere Tumore, die keine Melanome sind, selektiv abgegeben wird; als Beispiele seien der KHJ-Brustkrebs in Mäusen und das GS-9L-Gliosarkom in Rattenhirnen genannt. Borkonzentrationen bis zu 20  $\mu\text{g}$  pro g Tumor wurden nach oraler Verabreichung von **L-33** in den Gliosarkomen nachgewiesen. Es gibt zu viele weitere Untersuchungen dieser Art, um sie alle hier zu beschreiben, aber alle bestätigen die Eignung von **L-33** zur Behandlung von Nichtmelanomtumoren.

Kürzlich haben Coderre et al.<sup>[100]</sup> experimentell bestimmte RBE-Werte für das BSH-Disulfid-Dimer BSSB (Schema 7) und für **L-33** veröffentlicht. Sie wurden aus der Zahl an Gliosarkomzellen (GS-9L), die nach Verabreichung der Borkonditionen eine Bestrahlung mit thermischen Neutronen überlebten, sowohl *in vitro* als auch in intracerebralen Rattentumoren ermittelt. Die *in vitro* ermittelten RBE-Werte (siehe Abschnitt 2.4) lagen für **L-33** zwischen 3.5 und 4.1 und für BSSB zwischen 1.1 und 1.4. Es wurde darauf hingewiesen, daß diese BSSB-Werte physikalisch unrealistisch sind. Sie seien typisch für einen *in-vivo*-Tumorzellen-Abtötungsmechanismus, der auf der Zerstörung vaskulärer Endothel-

zellen durch den BNC und dem dadurch bedingten Verlust an Gefäßfunktion im Tumor beruht. Die höheren RBE-Werte von **L-33** dagegen sind in Einklang mit einem Neutroneneinfang durch intrazelluläres **L-33**. Auf die Zerstörung von Endothelzellen in den Gefäßen als wichtigsten Tötungsmechanismus der BNCT mit BSH und BSSB ist schon in Abschnitt 7.1 hingewiesen worden.

Wie bereits erwähnt, hat die geringe Wasserlöslichkeit von **L-33**-Hydrochlorid bei physiologischem pH seine Verwendung in Experimenten mit großen Tieren erschwert. Dieses Problem ist inzwischen weitgehend dadurch gelöst, daß wasserlösliche Ester von **L-33** mit Fructose, Diethanolamin und Cyclodextrinderivaten hergestellt wurden<sup>[173]</sup>. Diese Verbindungen sollten ein Verabreichen durch intravenöse Injektion möglich machen. Eine klinische Untersuchung der Phase I von **L-33**<sup>[178]</sup> ist im Rahmen des New England Medical Center-MIT Program in Neutron Capture Therapy geplant. Dieser klinische Test wird ein bereits laufendes Experiment am medizinischen Institut der Universität in Kobe, Japan, ergänzen.

Sowohl **DL-2**- als auch **DL-3**-Dihydroxyborylphenylalanin sind synthetisiert worden und werden nun gründlich getestet<sup>[179]</sup>. Des weiteren wurden das *4-closo*- **34** und das *4-nido*-Carboranylderivat **35** von **DL-Phenylalanin** hergestellt<sup>[180]</sup>, die derzeit biologisch bewertet werden. Darüber

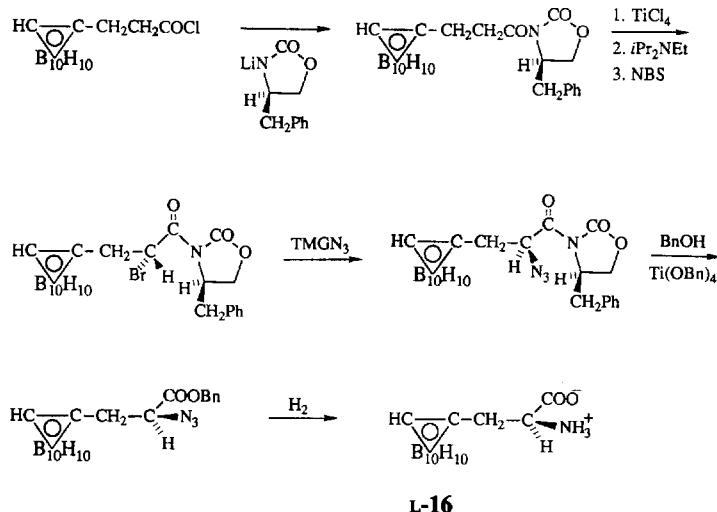


hinaus wurde eine asymmetrische Synthese von **L-33** entwickelt<sup>[181]</sup>, bei der ein  $\alpha$ -Aminoacrylsäurederivat unter Katalyse durch einen chiralen Rhodiumkomplex hydriert wird.

### 7.9.2. *L-Carboranylalanin*

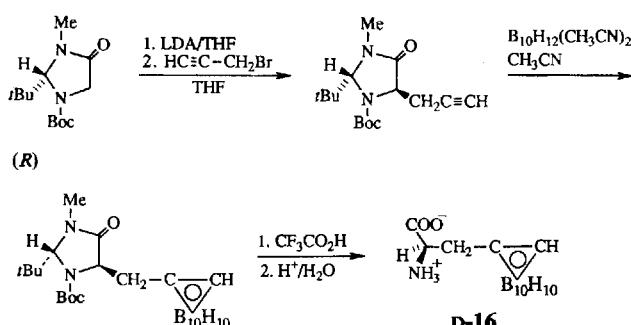
Die erhöhte Geschwindigkeit, mit der Proteine und Aminosäuremetaboliten in einer Krebszelle synthetisiert werden, könnte zusammen mit den Mechanismen des aktiven Aminosäuretransports in Zellen zu einem Bioverwertungsweg führen, auf dem borhaltige  $\alpha$ -Aminosäuren bevorzugt in Tumorzellen eindringen sollten. Die selektive Aufnahme von **L-33** durch mehrere Arten von Krebszellen scheint nach diesem Zelldifferenzierungsmechanismus abzulaufen (siehe Abschnitt 7.9.1).

Da der *creso*-1,2- $\text{C}_2\text{B}_{10}\text{H}_{12}$ -Käfig eine der chemisch attraktivsten Bor-„verpackungen“ ist, darf es nicht verwundern, daß der **L-Phenylalaninersatz L-Carboranylalanin 16** eine für die biologische Bewertung sehr beliebte Verbindung ist. **16** wurde 1976 zum erstenmal synthetisiert<sup>[144a]</sup>. In letzter Zeit haben sich mehrere Arbeitsgruppen, darunter besonders die von Kahl<sup>[86a]</sup> und Sjöberg<sup>[86b, 128]</sup>, um die asymmetrische Synthese der **D**- und **L**-Enantiomere von **16** bemüht (Schema 24 und 25). Die Entdecker von **16** berichteten, daß der Carborankäfig diese Aminosäure extrem hydrophob mache<sup>[144a]</sup>, und Kahl et al.<sup>[86a]</sup> wiesen darauf hin, daß der Raumbedarf der Carboraneinheit in **16** in etwa dem Volu-



Schema 24. Asymmetrische Synthese von D- und L-16 nach Kahl und Radel [86a]. NBS = N-Bromsuccinimid. TMGN<sub>3</sub> = Tetramethylguanidiniumazid. Die abschließende Hydrierung verläuft katalytisch.

men entspricht, das durch Rotation der Phenylgruppe in Phenylalanin beansprucht wird.



Schema 25. Asymmetrische Synthese von D- und L-16 nach Sjöberg et al. [86b, 128]. LDA = Lithiumdiisopropylamid. Der letzte Schritt läuft in einem Kationenaustauscher ab.

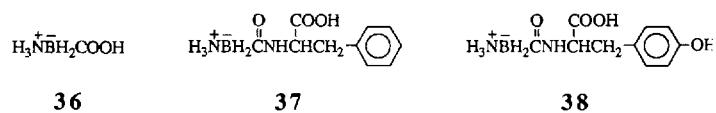
Kleine hydrophile Peptide, in die 16 eingebaut wird, könnten sich zur Erhöhung seiner Wasserlöslichkeit und Bioverfügbarkeit als wirksam erweisen. Eine weitere Alternative wäre das anionische *nido*-C<sub>2</sub>B<sub>9</sub>H<sub>11</sub>-Derivat von 16, das zumindest amphiphil sein sollte. Auf jeden Fall machte die Synthese von 16 ein wichtiges Molekül für biologische Experimente zum erstenmal leicht zugänglich. Die Befunde der in-vitro- und der in-vivo-Tests mit 16 und seinen Derivaten werden mit großer Spannung erwartet.

Mit 16 verwandt sind die Aminosäuren 9<sup>[120, 121]</sup> und 10 (Abschnitt 7.3.1), die als enantiomerenreine Substanzen noch nicht gründlich untersucht wurden. Die asymmetrische Synthese nach Sjöberg et al.<sup>[86b]</sup> macht diese und ähnliche Verbindungen nun allgemein zugänglich.

### 7.9.3. Ammoniumcarboxyboranalogon von Aminosäuren

Ersetzt man ein neutrales Kohlenstoffatom durch ein anionisches Boratom mit vier Valenzelektronen, dann erreicht man eine isoelektronische und isostere Substitution, wie sie sich in der formalen Verwandtschaft von *creso*-B<sub>12</sub>H<sub>12</sub><sup>+</sup> und

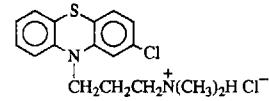
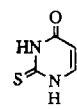
*creso*-1,2-C<sub>2</sub>B<sub>10</sub>H<sub>12</sub> zeigt (siehe Abschnitt 5) und wie sie auch bei einfachen organischen Verbindungen, z.B.  $\alpha$ -Aminosäuren und ihren Derivaten, möglich sein sollte. Spielvogel et al.<sup>[169, 182]</sup> haben daher unter dem Gesichtspunkt der BNCT von cerebralen Tumoren eine Synthese für 36, das Ammoniumcarboxyboranalogon von Glycin, entwickelt. Dieses Molekül war deshalb besonders wichtig, weil Glycin von allen Aminosäuren die Blut-Hirn-Schranke am schlechtesten überwindet und weil mit <sup>14</sup>C-markiertem Glycin 24 Stunden nach der Injektion in BALB/c-Mäuse mit Hirnimplantaten von Harding-Passey-Melanomen die Borkonzentrationsverhältnisse für Tumor zu Hirn 10:1 und für Tumor zu Blut 5:1 betragen<sup>[182]</sup>. Die Injektion einer ausreichenden Menge an 36, um eine Konzentration von 40 mg B pro kg Körpergewicht in den gleichen Mäusen wie im Experiment mit <sup>14</sup>C-markiertem Glycin zu erreichen, führte zu nicht sehr vielversprechenden Befunden: 36 wurde von den Tieren schnell ausgeschieden, und 2 Stunden nach der Injektion betrugen die Borkonzentrationen in Tumor, Hirn und Blut 16.2, 7.6 bzw. 8.8  $\mu$ g B pro g Gewebe. 36 konnte die Blut-Hirn-Schranke offenbar besser überwinden als Glycin. Weitere Ergebnisse von Porschen et al.<sup>[183]</sup> an Adenocarcinomen in C57-Mäusen stimmen mit diesen Befunden überein. Auch neuere Tests<sup>[184]</sup> mit kleinen Peptidderivaten wie 37 und 38 sind vom Standpunkt der BNCT aus als entmutigend anzusehen. Bei einer Vielzahl von Ammoniumcarboxyboranderi-



vaten des hier behandelten Typs konnten inzwischen jedoch vielversprechende antineoplastische, hypolipidämische und entzündungshemmende Wirkungen nachgewiesen werden<sup>[169]</sup>.

### 7.10. Melanomerkennung durch borhaltige Melaninvorläufer und Komplexbildner

Die Produktion des komplexen Pigments Melanin 39 durch Melanosome, die in den meisten Arten von Melanomen vorkommen, ist als Ursache der Tumorzellendifferenzierung vorgeschlagen worden<sup>[185]</sup> und würde beispielsweise die Wirksamkeit von L-33 als tumorgerichtete Aminosäure erklären<sup>[187]</sup>. Dieser Vorschlag konnte durch die Gesamtbefunde nicht bestätigt werden, und der wahre Mechanismus der Boranreicherung im Tumor nach einem Verabreichen von L-33 beruht wahrscheinlich auf der beschleunigten Aufnahme von Aminosäuren wie Tyrosin durch Tumorzellen (siehe Abschnitt 7.9.1). Dagegen konnte der Einbau von 2-Thiouracil 40 in Melanin während seiner in-vivo-Synthese gezeigt werden<sup>[186–188]</sup>. Damit war eine in-

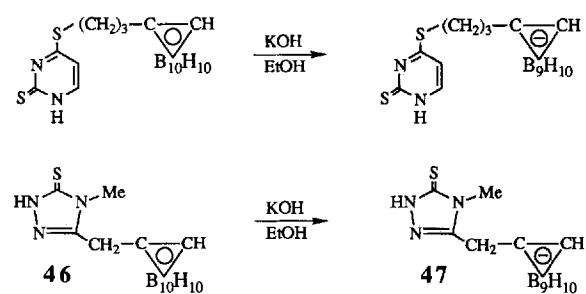


teressante Möglichkeit, Bor selektiv in das intrazelluläre Volumen einzubringen, gefunden.

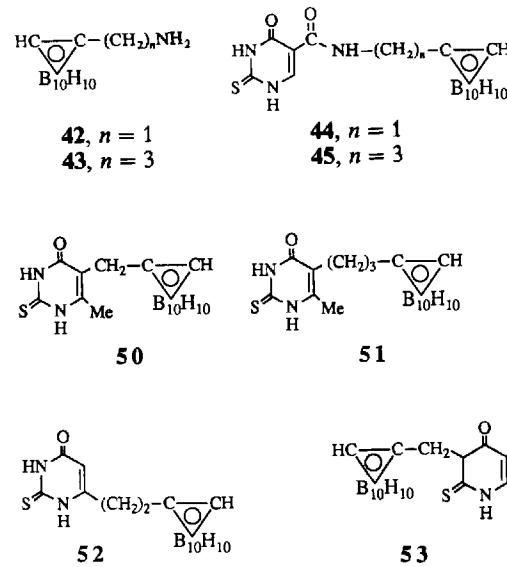
Die Fähigkeit von Melanin und Melanoproteinen, die in Mäusemelanomzellen vorkommen, starke Bindungen zu Phenothiazinderivaten wie dem potenten Beruhigungsmittel Chlorpromazin<sup>[189]</sup> (Megaphen) **41** zu bilden, hat einen weiteren möglichen Weg zum selektiven Einbringen von Bor in Melanomzellen gezeigt<sup>[190]</sup>. In diesem Fall ist die Ausgangsstoffzusatz bereits synthetisiertes Melanin, das dann mit dem Phenothiazinderivat reagiert.

### 7.10.1. 2-Thiouracilderivate als melanomselektive Borliefersysteme

Obwohl Dencker et al.<sup>[186, 187]</sup> bereits erkannt hatten, daß 2-Thiouracil **40** in Melanin während dessen Biosynthese selektiv eingebaut wird, haben erst Fairchild et al.<sup>[188]</sup> diesen Vorgang quantifiziert. Sie verabreichten dazu BALB/c-Mäusen mit Harding-Passey-Melanom <sup>14</sup>C-markiertes 2-Thiouracil (<sup>14</sup>C]TU) intraperitoneal oder intravenös. Die Anreicherung des Thiouracils im Tumor korrelierte mit dem Melaningehalt und erreichte 9 bis 12 % der pro g Tumor injizierten Dosis. Die Borkonzentrationsverhältnisse für Tumor zu gesundem Gewebe bewegten sich zwischen 50:1 für Stoffwechselorgane wie Leber und Lunge, 80:1 für das pigmentierte Ganzeauge und 300:1 für Muskulatur und Hirn. Die prozentuale Aufnahme von <sup>14</sup>C]TU blieb nahezu konstant, wenn die verabreichte Dosis um einen Faktor von 5000 verändert wurde, d. h. es wurden bis zu 300 µg <sup>14</sup>C]TU pro Tumor aufgenommen. Dies entsprach einer Aufnahme von 26 µg B pro g Tumor, wenn in **40** nur ein Boratom eingebaut würde. Diese ersten Ergebnisse regten umfangreiche Bemühungen an, neue Borliefersysteme auf der Basis von 2-Thiouracil und anderen Substanzen, die zumindest entfernt strukturell mit Thioharnstoff verwandt sind, zu entwickeln. Die untersuchten Verbindungen enthalten Bor in Form einer Dihydroxyborylgruppe, einer ungeladenen 1-(*cis*-1,2-C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>)-Einheit oder des anionischen 7-(*nido*-7,8-C<sub>2</sub>B<sub>9</sub>H<sub>11</sub><sup>-</sup>)-Gegenstücks, das die hydrophilen Eigenschaften verbessert. Die Arbeitskreise, denen die Synthese dieser Derivate gelang, sind die von Gabel<sup>[191, 192]</sup> und Wilson<sup>[193, 194]</sup> (Schema 26 bzw. 27). Außer carboransubstituierten 2-Thiouracilverbindungen hat Wilson auch die nützlichen Carboranylalkylamine **42** und **43** hergestellt und diese mit 5-Carboxy-2-thiouracil zu den Amiden **44** bzw. **45** umgesetzt<sup>[194]</sup>. Gabel et al.<sup>[192]</sup> haben außerdem die Synthese von **46** und **47**, Carboranderivaten von 5-Thio-1,2,4-triazol, sowie von **48** und **49** beschrieben.

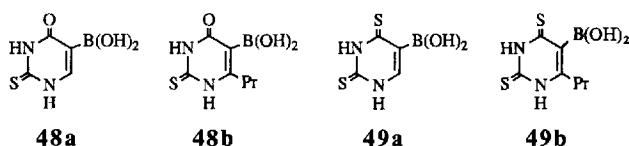


Schema 26. Thiouracil- und Thiotriazolderivate, hergestellt und getestet von Gabel et al. [191, 192].



Schema 27. Carboranylalkylamin- und Thiouracilderivate, hergestellt und getestet vom Arbeitskreis Wilson [193, 194].

Die Untersuchungen zur selektiven Aufnahme dieser Verbindungen in Mäusemelanome sind nur langsam vorangekommen. Gabel et al.<sup>[191, 192]</sup> berichten, daß die Dihydroxyborylderivate **48a** und **48b** in B16-Melanomen in C57/bl-Mäusen zu Borkonzentrationen von etwa 30 µg pro g Tumor führten (vier Stunden nach der intraperitonealen Verabreichung von 9–16 mg B pro kg Körpergewicht). Das Borkonzentrationsverhältnis für Tumor zu Blut lag dabei zwischen 4:1 und 7:1. Das hydrophobere Derivat **49b** wurde nur zu etwa 1.7 µg B pro g Tumor aufgenommen, während mit **49a** mittlere Werte erreicht wurden. Die 5-Thiotriazolverbindungen **46** und **47** zeigten eine geringe Selektivität und reicherteten sich in der Leber an. Die beiden anderen Carboranderivate in Schema 26 waren weniger wirksam als die Dihydroxyborylverbindungen **48** und **49**.



Die Carboranderivate **50–53** von Wilson<sup>[193, 194]</sup> waren ziemlich hydrophob und wurden von Nacktmäusen mit Harding-Passey-Melanom-Transplantaten zu langsam aufgenommen, um von Nutzen zu sein. Moore et al.<sup>[164]</sup> untersuchten den Einbau von **51** in die Phospholipid-Doppelschicht eines Liposoms (siehe Abschnitt 7.7.1) als Lieferweg für diese hydrophobe Substanz. Die Tumorspezifität war hoch, aber es wurden keine weiteren Daten publiziert.

Wenn auch die Wirksamkeit von borhaltigem 2-Thiouracil und damit verwandten Verbindungen noch gezeigt und durch gezielte Molekülplanung und synthetische Arbeiten verbessert werden muß, so bleibt das bisherige Ergebnis doch vielversprechend und verlangt nach weiteren Untersuchungen. Die angenommene Abhängigkeit dieser Liefermethode von der Melaninbildung scheint aber auszuschließen, daß sich diese Verbindungen in melaninfreien Melanomli-

nien und in unreifen, noch melaninfreien Melanommetastasen mit einer niedrigen Tyrosinaktivität anreichern.

### 7.10.2. Phenothiazin-Charge-Transfer-Komplexe mit vorhandenem Melanin für die Borlieferung

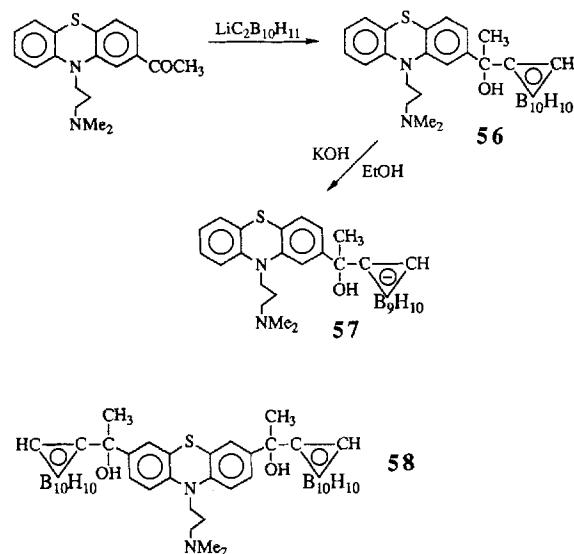
Die Untersuchung des als Chlorpromazin bekannten Beruhigungsmittels **41** Anfang der sechziger Jahre zeigte dessen bemerkenswerte Fähigkeit, sich im melaninhaltigen Augengewebe von Versuchstieren anzureichern<sup>[189]</sup>. Diese offenbar selektive Komplexierung von **41** und anderen Phenothiazinderivaten wurde an Melanin und Melanoproteinen aus vielen anderen Quellen gezeigt<sup>[189]</sup>. Melanin ist wie seine Varianten ein komplexes polymeres Pigment, das aus 5,6-Indolchinon und anderen Vorläufern entsteht<sup>[195, 196]</sup>, von denen einige Schwefel (Cystein) enthalten. Heute geht man davon aus, daß die Melanin-Phenothiazin-Komplexbildung auf Charge Transfer basiert, wobei Melanin als Elektronenacceptor fungiert<sup>[197]</sup>. Die Chemie hinter diesen und anderen Beobachtungen würde den Rahmen dieser Übersicht sprengen, und der Leser wird daher auf die Originalliteratur verwiesen.

Die Anreicherung von **41** in Melanoproteinen hat die Aufmerksamkeit von Mishima<sup>[190]</sup> erregt. Er interessierte sich für die Möglichkeit, Bor durch borsubstituierte Derivate von **41** selektiv zu melaninreichen Melanomen zu transportieren. Fairchild et al.<sup>[198]</sup> haben die Bioverteilung von <sup>35</sup>S-markiertem **41** in einer Reihe von Experimenten sorgfältig untersucht. Die Untersuchungen wurden sowohl an Greene-Melanomen in syrischen Goldhamstern (Melanineinhalt ca. 0.4 Gew.-%) als auch an Harding-Passey-Melanomen in BALB/c-Mäusen (Melanineinhalt ca. 0.7 Gew.-%) durchgeführt, weil diese Modelle den menschlichen Melanomen ähneln. **41** wurde intraperitoneal injiziert. 24 Stunden nach der Injektion von bis zu 50 mg **41** pro kg Körpergewicht war eine Konzentration von mehr als 100 µg **41** pro g Tumor erreicht und das Borkonzentrationsverhältnis für Tumor zu Leber betrug etwa 10:1. Die Borkonzentrationsverhältnisse für Tumor zu anderen Gewebearten wie Blut und Muskulatur waren größer als 100:1. Die hypothetischen Konzentrationen von <sup>10</sup>B in den Geweben wurden mit der Beispielverbindung **54** (siehe Schema 28, 25.4 Gew.-% <sup>10</sup>B für das Natriumsalz) berechnet. Die erhaltene Konzentration war hoch genug (>20 µg B pro g Tumor), um eine BNCT zu ermöglichen, wenn sich **54** genau so wie **41** verhält.

Die Befunde älterer Untersuchungen, gestützt durch die von Fairchild et al.<sup>[198]</sup>, regten die Suche nach geeigneten borhaltigen Phenothiazinderivaten an. In der Folgezeit beschrieben Nakagawa und Aono<sup>[199]</sup> die Synthesen von **54**

und **55** (Schema 28), die anschließend in der BNCT von Greene-Melanomen in syrischen Goldhamstern getestet wurden<sup>[200]</sup>. Die Gegenwart dieser Verbindungen verstärkte die Tumorzerstörung, doch da sich ihre Zellselektivität erheblich von der von **41** unterschied, wurde auf diesem Gebiet nicht weiter geforscht.

**54** und **55** enthalten die Boraneinheiten an die Dimethylaminopropylgruppe von **41** koordiniert<sup>[199]</sup>. Soloway et al.<sup>[201]</sup> dagegen verbanden 1-(*cis*-1,2-C<sub>2</sub>B<sub>10</sub>H<sub>11</sub>)-Carborankäfige direkt mit der Phenothiazineinheit (Schema 29).



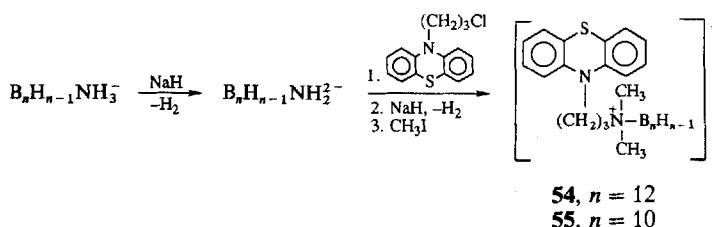
Schema 29. Phenothiazinderivate, hergestellt und getestet von Soloway et al. [201, 202].

Das anionische 7-(*nido*-7,8-C<sub>2</sub>B<sub>9</sub>H<sub>11</sub>)-Carboranderivat **57** wurde nach der üblichen Methode erhalten, nämlich durch Abspaltung einer BH<sup>2+</sup>-Spitze aus **56** mit einer Base. Nach den bisherigen Ergebnissen der in-vivo-Untersuchungen sind die Verbindungen **56**–**58** zu hydrophob und damit uninteressant. Es wird derzeit versucht, besser wasserlösliche Derivate herzustellen<sup>[202]</sup>.

Die erwähnten Befunde legen nahe, daß Phenothiazinderivate in der BNCT Verwendung finden könnten, wenn die Suche nach einer besser solvatisierbaren Verbindung fortgesetzt wird. Auf jeden Fall leidet jedoch der tatsächliche therapeutische Wert einer solchen Verbindung, falls sie noch entdeckt wird, unter der Tatsache, daß **41** und andere Phenothiazine nur durch bereits vorhandenes Melanin gebunden werden. Bemerkenswerterweise wurden bei keiner der beiden letzten internationalen Konferenzen der International Society for Neutron Capture Therapy (1990 in Sydney und 1992 in Columbus, Ohio) Forschungsergebnisse mit Phenothiazinderivaten vorgestellt.

### 7.11. Ansätze zur selektiven Zerstörung des Tumorzellkerns

Die spektakuläre Entwicklung der präparativen Chemie der Nucleinsäuren und ihrer Derivate<sup>[203]</sup> hat zur Entdeckung neuer therapeutischer Reagentien und nützlicher biologischer Sonden auf der Basis modifizierter synthetischer Nu-



Schema 28. Phenothiazinderivate der polyedrischen B<sub>10</sub>H<sub>10</sub><sup>2-</sup>- und B<sub>12</sub>H<sub>12</sub><sup>2-</sup>-Ionen, hergestellt von Nakagawa und Aono [199] und getestet von Mishima et al. [200].

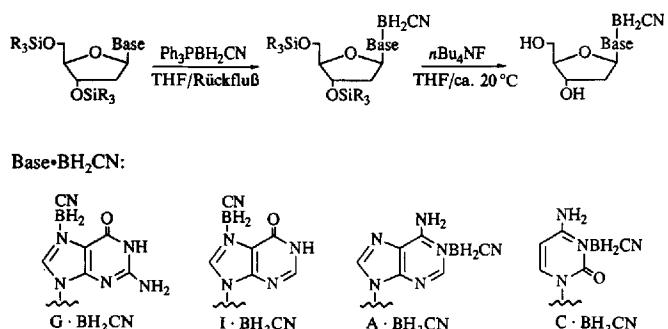
cleoside, Mononucleotide und Oligonucleotide geführt. Zu diesen DNA- und RNA-Vorläufern gehören auch Verbindungen, die antiviral und carcinogen wirken, entweder durch Enzymhemmung oder als Antisense-Verbindungen, die die Onkogenbildung blockieren<sup>[204]</sup>. Es sind Mono- und Oligonucleotide mit veränderten Basen, Zuckern und phosphorhaltigen Linkergruppen hergestellt worden. Daher überraschen die Forschungsaktivitäten nicht, die auf die Modifikation von Nucleotiden durch Einbau borhaltiger Gruppierungen in alle drei strukturellen Basiskomponenten zielen. Diese borhaltigen Nucleinsäurekomponenten sind nicht nur als solche wichtig, sondern sie eröffnen auch neue Wege zur Anreicherung von Bor im Tumorzellkern für BNCT-Zwecke.

Die selektive Boranreicherung in den Kernen von Tumorzellen ist durch die viel schnellere Zellreproduktion im Tumor als in gesundem Gewebe gegeben. Ein wichtiger Aspekt in diesem Zusammenhang ist die Tatsache, daß die Mitose von Gliomzellen viel schneller ist als die der umgebenden gesunden Gliazellen. Es sollte daher möglich sein, borhaltige Verbindungen zu entwickeln, die in der BNCT Verwendung finden können und auf dem Einbau in DNA basieren. Eine solche ideale Verbindung müßte Watson-Crick-Basenpaarungen eingehen können, dürfte von Nucleasen nicht angegriffen werden und müßte Zellmembranen durchdringen können. Wäre ein derartiges BNCT-Reagens zusätzlich ein cytotoxischer Enzyminhibitor oder eine Antisense-Verbindung, dann könnte dies die Wirksamkeit einer BNCT weiter erhöhen. Wie bereits früher erwähnt, ist der Kern einer Krebszelle das meistbegehrte Ziel, weil eine bestimmte Menge <sup>10</sup>B dort mindestens zweimal so wirksam ist wie im Cytoplasma verteilt.

Eine weitere Möglichkeit zur Boranreicherung im Zellkern ist die Entwicklung borhaltiger DNA-Ligandenmoleküle<sup>[205, 206]</sup>. Die sehr große Zahl verfügbarer DNA-Bindungsstellen in jeder Tumorzelle, kombiniert mit der für eine BNCT sehr effektiven Positionierung der Bor-Zielatome im Zellkern, macht diesen Ansatz attraktiv. Eine repräsentative Zahl von borhaltigen Nucleinsäurekomponenten ist im folgenden Abschnitt beschrieben. Die Mechanismen, nach denen die Aufnahme dieser Verbindungen durch die Zellen, wenn überhaupt, abläuft, sind normalerweise unbekannt, was auch für ihre Verteilung im Zellinnern gilt. Zur Klärung dieser Vorgänge gibt es derzeit intensive Forschungen.

### 7.11.1. Durch Komplexbildung zwischen der Nucleobase und Cyanboran $\text{BH}_2\text{CN}$ modifizierte Nucleoside

In Einklang mit ihrem Interesse an der Synthese von  $\alpha$ -Aminosäuren, in denen einzelne Kohlenstoffatome formal durch anionische Boratome mit vier Valenzelektronen ersetzt sind (siehe Abschnitt 7.9.3), haben Spielvogel et al.<sup>[207, 208]</sup> auch die Basenreste in ausgewählten Nucleosiden durch Komplexbildung zwischen ihren Stickstoffzentren und der Lewis-Säure  $\text{BH}_2\text{CN}$ , eingesetzt als  $\text{Ph}_3\text{PBH}_2\text{CN}$ , modifiziert. Als Nucleoside wurden O-geschützte dG, dI, dA und dC verwendet. Zum Schluß wurden die Schutzgruppen des Nucleosidkomplexes entfernt (Schema 30).  $\text{BH}_2\text{CN}$  koordinierte selektiv an  $\text{N}^7$  von dG und dI,  $\text{N}^1$  von dA sowie  $\text{N}^3$  von dC. Der Koordinationsort in dG und dI ist somit weit

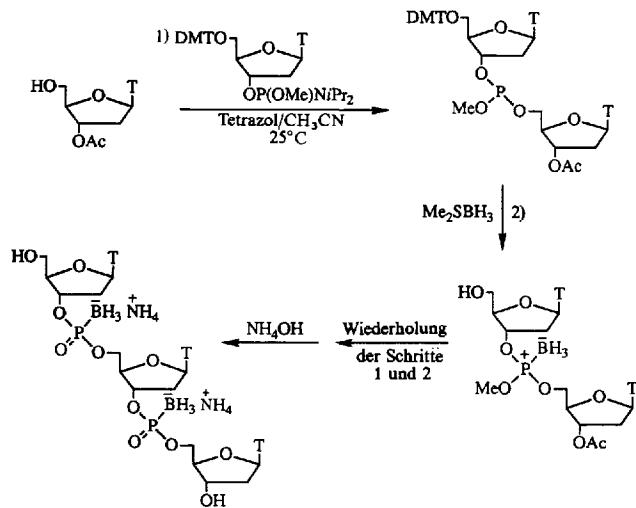


Schema 30. Von Spielvogel et al. synthetisierte Nucleosidderivate, in denen  $\text{BH}_2\text{CN}$  an N-Atome der Basen koordiniert ist [207, 208].

von den Orten für die Watson-Crick-Basenpaarung entfernt. <sup>1</sup>H-NMR-Experimente zeigten, daß das dG-N<sup>7</sup>- $\text{BH}_2\text{CN}$ -Addukt mit dC ebenso wirksam Basenpaare bildet wie nicht modifiziertes dG<sup>[208]</sup>. Versuche, den  $\text{BH}_2\text{CN}$ -Komplex von dT herzustellen, schlugen fehl. Der dC-N<sup>3</sup>- $\text{BH}_2\text{CN}$ -Komplex wirkt bei Mäusen entzündungshemmend, während dG-N<sup>7</sup>- $\text{BH}_2\text{CN}$  den Serumcholesteringehalt erniedrigt<sup>[208]</sup>. Die Anreicherung in Tumoren wurde an Mäusen mit Ehrlich-Ascites-Carcinom mit <sup>14</sup>C-markiertem dC-N<sup>3</sup>- $\text{BH}_2\text{CN}$  gezeigt. Vier Stunden nach der Injektion betrug das Borkonzentrationsverhältnis für Tumor zu Blut 8.5:1<sup>[208]</sup>. Die vom Tumor aufgenommene Bormenge wurde nicht bestimmt.

### 7.11.2. Nucleotidanaloga mit Boranophosphat-Linkern

Der formale Ersatz eines Sauerstoffatoms und seiner sechs Valenzelektronen in einem Phosphat-Linker durch ein  $\text{BH}_3$ -Molekül führt zu einer negativ geladenen Boranophosphat-einheit. Solche modifizierten Nucleotidlinker sind isoelektronisch mit ungeladenen Methylphosphonat-Linkern, die zum Aufbau von Antisense-Systemen verwendet werden sind<sup>[204]</sup>. Die Boranophosphate haben gegenüber den Phosphaten als Vorteile eine negative Formalladung, hauptsächlich am Bor, und eine größere Hydrophobie. Die letztergenannte Eigenschaft wird als wertvoll für das Durchdringen von Zellmembranen angesehen. Modifizierte Nucleotide des



Schema 31. Synthese von Nucleotiden mit Boranophosphat-Linkern nach Spielvogel et al. [208, 209].

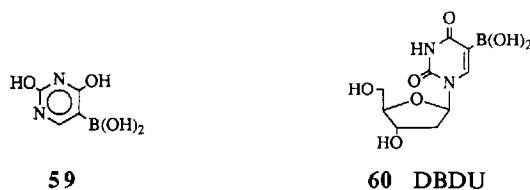
Boranophosphatyps wurden zuerst von Spielvogel et al.<sup>[208, 209]</sup> hergestellt und als Borlieferanten vorgeschlagen.

Schema 31 beschreibt die Synthese von typischen Boranophosphat-Oligonucleotiden und schlägt die Möglichkeit vor, die Liste dieser Oligomere durch Verwendung der Festphasensynthese auf viel längere Ketten auszudehnen.

Verbindungen des Boranophosphatyps werden derzeit im Hinblick auf ihre biologische Aktivität, einschließlich der Cytotoxizität und des enzymatischen Einbaus in die DNA, untersucht<sup>[210]</sup>. Sehr gut für die BNCT geeignete Verbindungen sind dabei noch nicht entdeckt worden.

### 7.11.3. Boronsäurederivate von Pyrimidin- und Purin-Nucleosiden

Die erste mit einer B-C-Bindung synthetisierte DNA-Vorstufe war 5-Dihydroxyboryluracil **59** (Liao et al.<sup>[211]</sup>). Danach folgte 1978 die Synthese von 5-Dihydroxyboryl-2'-desoxyuridin (DBDU) **60** durch Schinazi und Prusoff<sup>[212]</sup>. Die

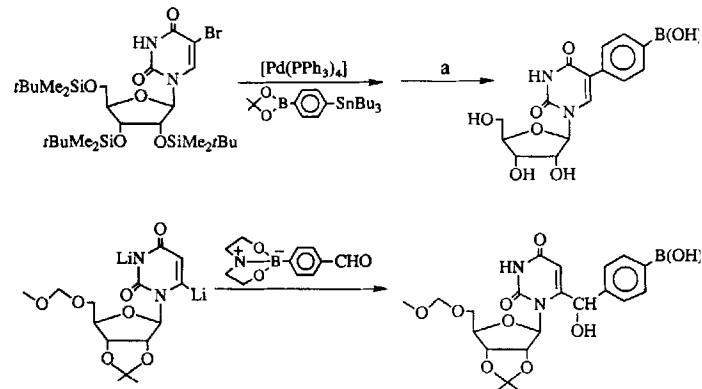


Synthesen von **59** und **60** basierten auf der Umsetzung von O-geschützten 5-Brom-Vorstufen mit Lithium und dann mit einem Trialkylborsäureester<sup>[213]</sup>. Die stereochemische Ähnlichkeit von **60** und natürlichem Thymidin (5-Methyl-2'-desoxyuridin) gab den Anstoß zu dieser Synthese. Schinazi et al.<sup>[214]</sup> haben vorgeschlagen, daß am Einbau von **60** in den Kern von Tumorzellen eines oder mehrere der folgenden Phänomene beteiligt sein könnten: 1) **60** wird von den Krebszellen selektiv aufgenommen und in der Zelle als 5'-Monophosphat festgehalten. Die Selektivität für Tumorzellen könnte erhöht werden, wenn **60** ein besseres Substrat für die in Tumorzellen vorkommende Thymin-Kinase wäre als für das entsprechende Enzym in gesunden Zellen. 2) **60** könnte Enzyme, die bei der Biosynthese von Pyrimidin-Nucleosiden eine Rolle spielen, hemmen. 3) **60** könnte statt des Pyrimidin-Nucleotids in die DNA von Tumorzellen eingebaut werden. 4) Alle diese Vorgänge könnten im Tumorzellkern <sup>10</sup>B-markiertes **60** für die selektive Zerstörung durch Neutroneneinfang zur Verfügung stellen. Im Prinzip existieren diese mechanistischen Möglichkeiten für jedes der hier genannten <sup>10</sup>B-markierten Nucleosid- oder Nucleotidmoleküle, allerdings in unterschiedlichem Ausmaß (siehe Abschnitt 7.11).

Die Untersuchung der biologischen Aktivität von **60** in vitro hat gezeigt<sup>[214]</sup>, daß diese Verbindung ein gutes Analogon des Pyrimidins ist und die Replikation von HSV-1 hemmt. Diese Hemmung der Virusreplikation wurde durch Zusatz von Thymidin aufgehoben. Erste in-vitro-Neutronenbestrahlungsexperimente mit <sup>10</sup>B-angereichertem **60**, dessen Lösung unterschiedliche Mengen an Thymidin enthielt, und V79-Zellen von chinesischen Hamstern (gewaschen) wurden am Brookhaven Medical Research Reactor

durchgeführt. Vorgeschaltete Gleichgewichtseinstellung der untersuchten Zellen mit **60** setzte ihre Überlebensrate nach der Bestrahlung mit thermischen Neutronen herab; Zugabe von Thymidin zur Lösung von **60** milderte diesen Effekt. Aus diesen Ergebnissen schlossen die Autoren, daß **60** bei der DNA-Synthese gebunden wird, daß es aber nicht wirksam mit Thymidin konkurrieren kann.

Yamamoto et al. verwendeten neue Synthesewege und erhielten eine große Bandbreite neuer Basen- und Nucleosiderivate, die entweder einen 3- oder einen 4-(Dihydroxyboryl)phenylsubstituenten<sup>[215]</sup> oder einen  $\alpha$ -Hydroxy-4-(dihydroxyboryl)benzylsubstituenten<sup>[216]</sup> enthielten. Repräsentative Synthesen sind im Schema 32 zu sehen. Mit diesen neuen



Schema 32. Zwei allgemeine Synthesewege zu Dihydroxyborylderivaten von Nucleosiden nach Yamamoto et al. [215, 216]. a: Entfernen der Schutzgruppe.

Methoden konnten sehr viele Dihydroxyborylderivate hergestellt werden, die jedoch sehr leicht säurekatalysiert Bor abspalten und das entsprechende Phenyl- oder  $\alpha$ -Hydroxybenzyl-substituierte Nucleosid und Borsäure bilden. Außerdem erhöhen die eingeführten Arylgruppen die Hydrophobie der Nucleoside mit unvorhersehbaren Folgen. Ausgewählte Mitglieder dieser Gruppe von Nucleosiden werden im Hinblick auf ihre biologische Aktivität, einschließlich ihrer Wirksamkeit in der BNCT, untersucht.

### 7.11.4. Carboransubstituierte Nucleoside

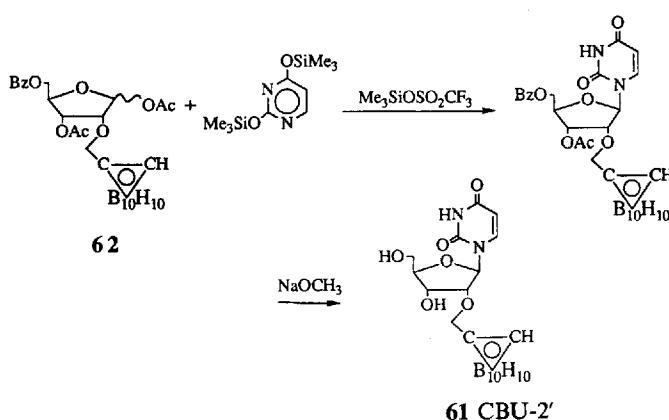
Die im vorigen Abschnitt beschriebenen relativ einfachen Verbindungen mit einer Dihydroxyborylfunktion haben einen niedrigen Borgehalt und verlieren Bor durch Hydrolyse. Als Alternative zu diesen einfacheren Borverbindungen ist das Carboran *cis*-1,2-C<sub>2</sub>B<sub>10</sub>H<sub>12</sub> in Ribose und in die Baenkkomponenten von Nucleosiden eingebaut worden. Auch diese Verbindungen können, wie in Abschnitt 7.11.3 beschrieben, in Tumorzellkernen festgehalten werden. Während der borreiche *cis*-Carboransubstituent die hydrophilen Eigenschaften des mit ihm verbundenen Substrats merklich verringern dürfte, sollte sein anionisches *nido*-Analogon ein amphiphiles Derivat ergeben. Aufgrund der recht erheblichen Größe des Carboransubstituenten und seiner hydrophoben Eigenschaften kann man nicht erwarten, daß carboransubstituierte Nucleotide tatsächlich biosynthetisch in DNA oder RNA eingebaut würden. Durch eine Phosphorylierung des carboransubstituierten Nucleosids im Zellkern

könnte dieses jedoch als Monophosphat festgehalten werden.

Soloway et al.<sup>[217]</sup> haben 1990 das erste carboransubstituierte Nucleosid, 2'-O-(1,2-Carboran-1-ylmethyl)uridin **61**, beschrieben, das von seinen Entdeckern als CBU-2' bezeichnet wurde. Darüber hinaus wurden die analogen 3'-O- und 5'-O-Isomere<sup>[218]</sup> sowie das anionische *nido*-Analogon von **61** synthetisiert. Noch jüngeren Datums sind die Befunde von Tjarks et al.<sup>[219]</sup>, die einen vielleicht allgemeinen Zugang zu borhaltigen Nucleosiden gefunden und am Beispiel von **61** demonstriert haben (Schema 33). Die Schlüsselverbin-

oxyuridin mit  $\text{HC}\equiv\text{CSiMe}_3$  oder  $\text{HC}\equiv\text{CCH}_2\text{OAc}$ . Die dabei entstehenden 5-Alkinylnucleoside, z.B. **63**, wurden nach gängigen Verfahren mit  $\text{B}_{10}\text{H}_{14}$  und einer Lewis-Base zu den gewünschten Produkten, z.B. **64**, umgesetzt. Erste Ergebnisse zeigen, daß 5-Carboranyluridin in vitro cytotoxisch auf P388-Leukämiezellen in Mäusen wirkt.

Schinazi et al.<sup>[224]</sup> haben unabhängig davon das 5-Carboranyl-2'-desoxyuridin **65** hergestellt, und zwar auf einem Syntheseweg analog dem von Yamamoto et al. Anschließend haben sie die von CEM-Zellen nach Behandlung mit **65** erzeugten Stoffwechselprodukte untersucht. Sie isolierten einen neuen Metaboliten, der die von einem 5'-Monophosphat von **65** erwarteten biochemischen Eigenschaften hat. Man nimmt an, daß dieses Monophosphat durch intrazelluläre Phosphorylierung entsteht<sup>[224]</sup>.

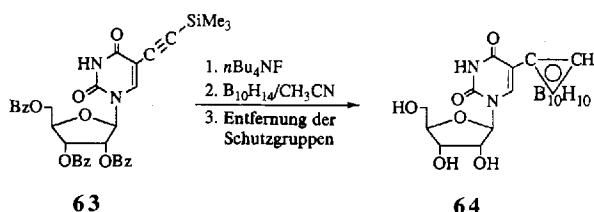


Schema 33. Ein Beispiel für die verallgemeinerbare Synthese von carboransubstituierten Nucleosiden nach Tjarks et al. mit **62** als gemeinsamer Vorstufe [219].

dung in diesen Synthesen ist die 1,3-Di-O-acetyl-5-O-benzoyl-2-O-(1,2-carboran-1-ylmethyl)-D-ribofuranose **62**. Reaktion dieser Verbindung mit trimethylsilylgeschütztem Uracil in Gegenwart von Trimethylsilyltrifluormethansulfonat und nachfolgende Entfernung der Schutzgruppen durch alkalische Hydrolyse führte zu **61**. In der 1-Position der Riboseeinheit ist bisher nur die  $\beta$ -Konfiguration aufgetreten. Es ist zu hoffen, daß dieser Syntheseweg verbreitete Anwendung findet.

**61** und seine 3'- und 5'-Isomere sind von F98-Gliomzellen in vitro gut aufgenommen worden<sup>[218, 220]</sup>. Morrison et al.<sup>[221]</sup> haben vor kurzem mit SIMS-Mikroskopie (siehe Abschnitt 2.5.4) gezeigt, daß das in F98-Gliomzellen vorhandene **61** hauptsächlich im Cytoplasma vorkommt und weniger im Zellkern. Das Verteilungsverhältnis liegt zwischen 1.4:1 und 2.6:1. Der Mechanismus der Anreicherung von **61** in den Zellen wird derzeit untersucht<sup>[222]</sup>.

Yamamoto et al.<sup>[223]</sup> haben vor kurzem einen Syntheseweg für Uridin- und 2'-Desoxyuridinderivate mit einem 1,2-Carboran-1-yl- oder einem 2-Hydroxymethyl-1,2-carboran-1-ylsubstituenten in der 5-Position des Uracilrings entwickelt. Der erste Syntheseschritt war die Pd-katalysierte Kopplung von O-geschütztem 5-Ioduridin oder 5-Iod-2'-des-



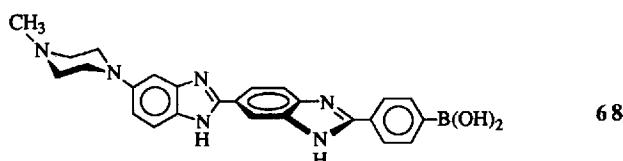
Racemisches 5-Carboranyl-2',3'-didesoxy-3'-thiacytidin **66** wurde durch Pd-katalysierte Alkylierung von 5-Iod-2',3'-didesoxy-3'-thiacytidin hergestellt<sup>[224]</sup>. Diese und ähnliche Verbindungen werden auf ihre biologischen Eigenschaften untersucht.

Reynolds et al.<sup>[225]</sup> haben die Synthese von 5-(1,2-Carboran-1-ylmethyl)-2,4-dichlor-6-methylpyrimidin **67** beschrieben, das vielleicht als Syntheseäquivalent für substituierte Pyrimidine nützlich werden könnte.



#### 7.11.5. Boranreicherung im Zellkern mit DNA-Liganden

Whittaker, Corder et al.<sup>[205, 206]</sup> haben vor kurzem die Möglichkeit untersucht, Bor durch Komplexbildung zwischen borhaltigen Ligandenmolekülen und der DNA von Zielzellen anzureichern. Dibenzimidazolreagentien von Hoechst binden effektiv in der kleinen Furche der Kern-DNA, und eine Vielzahl von Reagentien sind auf der Basis dieses Ligandensystems hergestellt worden. Erste in-vitro-Untersuchungen zur Boraufnahme durch Zellen haben sich auf das einfache Phenylboronsäurederivat **68** konzentriert. Mit Fluoreszenzmikroskopie und spektrophotometrischen Analysen des Liganden in isolierten Zellkernen ist gezeigt worden, daß **68** durch eine Vielzahl von Zellen aufgenommen wird. Neutroneneinfangexperimente ergaben, daß in



Gegenwart von  $2 \times 10^{-5}$  M **68** mehr Zellen abgetötet werden als ohne **68**. Der Effekt war derselbe wie der einer Lösung von  $4 \times 10^{-6}$  g mL<sup>-1</sup>  $^{10}\text{B}(\text{OH})_3$ , die während der Bestrahlung mit den Zellen in Kontakt ist. Dieses Ergebnis wurde als ziemlich ermutigend betrachtet, und derzeit werden Untersuchungen mit anderen borhaltigen Liganden durchgeführt, die mehrere  $^{10}\text{B}$ -Atome pro Molekül enthalten.

#### 7.11.6. Selektive Lieferung borhaltiger Verbindungen an den Kern

Schema 5 zeigt die Transportvorgänge, durch die ein borhaltiges Agens aus dem Blutserum in den Kern einer Tumorzelle eingebracht werden kann. Jede der in Abschnitt 7.11.3 erwähnten Methoden der Boranreicherung im Zellkern basiert auf der erhöhten Mitosegeschwindigkeit von Tumorzellen gegenüber gesunden Zellen, um die gewünschte einseitig selektive Zerstörung von Tumorzellen zu erreichen. Außerdem kann die Tatsache, daß das Reagens Zellwände durchdringen muß, strukturelle Beschränkungen mit sich bringen, die die gewünschte Anreicherung im Zellkern einschränken. Diese Probleme könnten umgangen werden, indem man Zellkernreagentien mit Liefersystemen koppelt, von denen bekannt ist, daß sie besonders mit Krebszellen wechselwirken. Unter den in dieser Übersicht genannten verfügbaren tumorselektiven Liefermethoden ragen die unilamellaren Liposomen (siehe Abschnitt 7.7.1) durch ihre Wirksamkeit hinsichtlich der selektiven Durchdringung der Plasmamembran von Tumorzellen heraus. Sie sind darüber hinaus auch in der Lage, eine Vielzahl von hydrophilen Verbindungen in das Zellinnere zu transportieren. Hydrophile Basen, Nucleoside und Nucleotide aller Größen, die eine erhebliche Zahl von Boratomen pro Molekül enthalten, kommen für diese Liefermethode in Frage. Forschungsarbeiten in diese Richtung sind von uns begonnen worden.

### 8. Die Herausforderungen und Zukunftsaussichten der BNCT

Die prinzipielle Realisierbarkeit des ursprünglichen Konzepts von Locher konnte gezeigt werden, und die BNCT stellt eine vielversprechende Behandlungsmethode für Krebsarten dar, die sich derzeit noch der Behandlung entziehen und hohe Sterblichkeitssziffern mit sich bringen, wie cerebrale Gliome und metastasierende Melanome. Der Kampf gegen den Krebs ist zu einem Stellungskrieg geworden, und neue Therapien, die von den heute akzeptierten Therapieformen abweichen, müssen ausprobiert werden, wenn weiterer Fortschritt möglich sein soll. Als eine einzigartige, aber oberflächlich komplexe Methode kristallisiert sich mit der BNCT eine solche neue Therapieform heraus, wenn der gegenwärtige Forschungsimpuls weiter verstärkt und die in dieser Übersicht angesprochenen Probleme beseitigt werden können.

Die Verwendung der BNCT als leicht zugängliches therapeutisches Werkzeug für die Behandlung beliebiger Krebspatienten setzt vor allem voraus, daß reine epithermische Neutronen aus nicht zu teuren und stadtnahen Quellen, nicht nur von Reaktoren, zur Verfügung stehen. Solche fort-

schriftlichen Neutronenerzeuger könnten auf der Reaktion von beschleunigten Protonen mit einem metallischen Ziel basieren (Abschnitt 2.3.2) und als Prototypen vielleicht schon in zwei bis fünf Jahren zur Verfügung stehen.

Ebenfalls wichtig für die klinische Praxis der BNCT ist die Möglichkeit von Echtzeit-NMR-Imaging mit  $^{10}\text{B}$  als aktivem Kern, um  $^{10}\text{B}$ -beladenes Tumorgewebe und umgebendes Gewebe sichtbar zu machen und quantitativ analysieren zu können (Abschnitt 2.5.1). Eine solche schnelle, verlässliche und nichtinvasive Ermittlung von Daten über die  $^{10}\text{B}$ -Ziele würde für die Bestimmung der benötigten Neutronendosis und der Orientierung des Patienten im epithermischen Strahl sowie für die Überwachung von Veränderungen, die zwischen den Verabreichungen fraktionierter Dosen am Ort des Tumors entstanden sind, von unschätzbarem Wert sein. Derzeit werden Experimente mit dem  $^{11}\text{B}$ -Kern durchgeführt, der sich besser für NMR-Untersuchungen eignet. Wenn diese Arbeiten gute Ergebnisse liefern, kann dies die Entwicklung des nützlicheren  $^{10}\text{B}$ -NMR-Imagings fördern.

Die schematische Darstellung der Liefermechanismen in Schema 6 basiert auf ganz unterschiedlich verlässlichen Daten. Daher ist die genaue Bestimmung der Position des  $^{10}\text{B}$ -Zielkerns sowohl an als auch in Krebszellen essentiell für die gezielte Planung neuer borhaltiger Verbindungen. Während die subzelluläre Verteilung des Bors inzwischen sichtbar gemacht werden kann (Abschnitt 2.5.4), wenn die betrachteten Zellen aus einer in-vitro-Quelle stammen, fehlen die analogen Daten für Zellen, die aus in-vivo-Experimenten stammen, noch. Die derzeit verfügbaren Daten aus in-vitro-Präparationen sind sehr aufschlußreich und regen zu weiteren Untersuchungen an.

Die künftige Entwicklung auf dem Gebiet der borhaltigen Verbindungen wird sich wahrscheinlich in zunehmendem Maß auf Systeme konzentrieren, die so angelegt sind, daß sie auf einer zellselektiven Basis in den Tumorzellkern eindringen können (Abschnitt 7.11). Neben dem Verständnis der DNA-Biosynthese und anderer biologischer Vorgänge, die sich im Zellkern abspielen, bleibt eine große Herausforderung, die molekularen Werkzeuge, z.B. borhaltige DNA-Vorläufer, DNA-Liganden oder Antisense-Verbindungen, dazu zu bringen, Krebszellen selektiv anzugreifen. Rezeptor-abhängige Verbindungen, mit deren Hilfe die Plasmamembran selektiv durchdrungen werden kann, könnten mit dem kernbindenden Reagens gekoppelt werden und nach dem Eindringen in die Zelle durch Enzyme von ihm wieder entkoppelt werden. Die Zellselektivität ergibt sich dann aus der erhöhten Mitosegeschwindigkeit und der charakteristischen Überexpression von Rezeptorenstellen bei Tumorzellen. Es ist aber vielleicht auch möglich, das kernbindende Reagens durch tumorselektive Liposomen in das Cytoplasma der Zelle einzubringen (Abschnitt 7.7.1). Danach kann dann das Reagens zum Zellkern wandern. Ungeachtet der Neuartigkeit und Eleganz neuer Reagentien, die eine spezifische Wechselwirkung mit Komponenten des Zellkerns eingehen, verlangt das Problem der garantierten selektiven Bindung an Tumorzellen einige Aufmerksamkeit bei der Planung des borhaltigen Agens selbst.

Die weitere Entwicklung der BNCT hängt eindeutig von der Planung und der Synthese borhaltiger Verbindungen ab, die in der Lage sind, sich in erheblichen Mengen in Tumorzellen anzureichern, und von den zugehörigen Bioverwer-

tungssystemen, die diese borhaltigen Verbindungen garantiert selektiv zu Tumorzellen bringen. Die Entdeckungen der modernen Mikrobiologie und Immunologie zu Bioverwertungswegen (Abschnitt 6) sind in so schneller Folge veröffentlicht worden, daß die entsprechende chemische Forschung vielleicht etwas hinterherhinkt. An dieser Stelle sei deshalb für eine deutliche Ausweitung der Versuche zur Entwicklung neuer Synthesemethoden auf dem Gebiet der Organoborane und seinen Berührungspunkten mit der bioorganischen Chemie plädiert. Es besteht ein Bedarf für Wege zu borhaltigen Molekülen und Oligomeren, die baukastenartig mit Liefermolekülen gekoppelt werden können. Des Weiteren werden Bausteine gebraucht, die die ursprünglichen hydrophoben Eigenschaften von *closo*-Carboranen und ihren amphiphilen *nido*-Anionen-Analoga als Substituenten verändern können.

Die richtige biologische Bewertung eines borhaltigen Systems ist sehr wichtig für das Aufstellen einer Korrelation zwischen der chemischen Struktur und der biologischen Aktivität, die die weitere Molekülplanung und künftige Syntheseversuche beeinflußt. Wie jüngere Arbeiten mit borhaltigen Nucleosiden zeigten, ist es sehr gut möglich, daß einige der neu zu synthetisierenden Verbindungen nicht auf die offensichtliche Verwendung in der BNCT beschränkt sind, sondern biologische Reaktionsprofile zeigen, die sie auch für andere wichtige Verwendungszwecke qualifizieren. Die Arbeiten der Gruppen um Schinazi, Soloway, Spielvogel und Yamamoto (Abschnitte 7.9.3 und 7.11) lieferten antivirale, entzündungshemmende, antineoplastische und hypolipidämische Verbindungen, die ursprünglich für die BNCT-Forschung entwickelt worden waren.

Derzeit ist das Konzept der BNCT seiner Verwirklichung näher als jemals zuvor, und neue klinische Tests mit dem Thioboran-Anion BSH und Dihydroxyborylphenylalanin (BPA) 33 in Europa und den Vereinigten Staaten sind schon über das fortgeschrittene Planungsstadium hinaus. Die Tests an Melanomen von Mishima et al. in Japan gehen weiter, und das gleiche gilt für die Therapieversuche von Hatanaka. Allerdings sind die bei diesen und bei den in naher Zukunft geplanten klinischen Versuchen verwendeten Borlieferanten BSH (Abschnitt 7.1) und BPA (Abschnitt 7.9.1) keine besonders wirksamen Verbindungen, aber ihre Wirkungsweise ist relativ gut geklärt, und sie sind verlässlich. Die Tumore, die man behandeln will, sind cerebrale Gliome und primäre Melanomläsionen, und die Kernreaktoren in Petten und am MIT werden als Neutronenquellen dienen.

Längerfristige Pläne für die BNCT müssen unabhängig von den ins Haus stehenden klinischen Tests gemacht werden, weil dann, wenn diese Versuche beendet sein werden, viel bessere Borlieferanten und neue Neutronenquellen zur Verfügung stehen könnten, vorausgesetzt die Regierung und die Industrie verstärken ihr finanzielles Engagement. Es dürfte sicher sein, daß die Zukunft der BNCT immer besser aussehen wird, je mehr Ärzte sich ihrer Vorteile bewußt werden. Das Zusammentreffen von Erkenntnissen aus Physik, Chemie, Biologie und Medizin an einem Punkt der vieldimensionalen Wissenschaft ist ein einzigartiges Ereignis, das nach Nutzung durch die Menschheit verlangt. Vielleicht ist es wirklich so geplant gewesen!

*Ich danke meinen früheren und derzeitigen Studenten, Postdocs und Kollegen für ihre Beiträge zu den Bemühungen unse-*

*rer Gruppe um die BNCT-Chemie und die Boranclusterchemie im allgemeinen. Dr. Debra A. Feakes und Dr. Kenneth J. Shelly haben durch das Sammeln von Informationen erheblich zu dieser Veröffentlichung beigetragen und das Produkt kritisch beurteilt. Des Weiteren danke ich Diane Gromelski für die Erstellung des Manuskripts, Albert Calleros für die Zeichnungen, Karin Drechsel für Korrekturen und meinen vielen Freunden in der BNCT-Forschung für Anregungen. Den National Institutes of Health (RO1-CA31753 und RO1-CA53870) und dem US Department of Energy, Idaho National Engineering Laboratory, Office of Energy Research, unter dem DOE Field Office, Idaho (Contract DE-AC07-761DO1570) sei für ihre Förderung unserer Bemühungen um die BNCT-Forschung gedankt.*

Eingegangen am 1. März 1993 [A 910]  
Übersetzt von Barbara Hoeksema, Groningen, Niederlande

- [1] J. Chadwick, *Nature* **1932**, *129*, 312.
- [2] J. R. Dunning, G. B. Pegram, G. A. Fink, *Phys. Rev.* **1935**, *47*, 325.
- [3] E. Fermi, O. Amaldi, F. D'Agostino, F. Rasetti, E. Segre, *Proc. R. Soc. London A* **1934**, *146*, 483.
- [4] J. R. Dunning, G. B. Pegram, G. A. Fink, D. P. Mitchell, *Phys. Rev.* **1935**, *48*, 265.
- [5] H. J. Taylor, *Proc. R. Soc. London A* **1935**, *147*, 873.
- [6] G. L. Locher, *Am. J. Roentgenol. Radium Ther.* **1936**, *36*, 1.
- [7] a) M. Javid, G. L. Brownell, W. H. Sweet, *J. Clin. Invest.* **1952**, *31*, 603; b) W. H. Sweet, *N. Engl. J. Med.* **1951**, *245*, 875; c) W. H. Sweet, M. Javid, *J. Neurosurg.* **1952**, *9*, 200; d) L. E. Farr, W. H. Sweet, J. S. Robertson, C. G. Foster, H. B. Locksley, D. L. Sutherland, M. L. Mendelsohn, E. F. Stickley, *Am. J. Roentgenol. Radium Ther. Nucl. Med.* **1954**, *71*, 279; e) J. T. Godwin, L. E. Farr, W. H. Sweet, J. S. Robertson, *Cancer* **1955**, *8*, 601.
- [8] a) *Proc. Third Int. Symp. Neutron Capture Ther. Cancer (Strahlenther. Onkol.* **1989**, *165*); b) R. M. Brugger, J. A. Shih in [8a], S. 153; c) R. F. Martin, G. D'Cunha, M. Pardee, B. J. Allen, *Int. J. Radiat. Biol.* **1988**, *54*, 205.
- [9] a) *Boron-Neutron Capture Therapy for Tumors* (Hrsg.: H. Hatanaka), Nishamura, Niigata, Japan, **1986**; b) H. Hatanaka in [9a], S. 5.
- [10] R. G. Fairchild, V. P. Bond, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1985**, *11*, 831.
- [11] F. Pfister, G. Hehn, F. El-Husseini in [8a], S. 107.
- [12] a) *Abstr. Fifth Int. Symp. Neutron Capture Ther. Cancer* **1992**; b) R. Huiskamp, P. R. Gavin, A. S. Sievert, K. H. I. Phillips in [12a], S. 23.
- [13] a) *Proc. Second Int. Symp. Neutron Capture Ther. Cancer (Neutron Capture Therapy)* (Hrsg.: H. Hatanaka), Nishamura, Niigata, Japan, **1986**; b) R. M. Brugger, T. J. Less in [13a], S. 110.
- [14] R. F. Barth, A. H. Soloway, R. G. Fairchild, *Cancer Res.* **1990**, *50*, 1061.
- [15] a) *Proc. Workshop Neutron Capture Ther. (Brookhaven Nat. Lab. Rep.* **1986**, BNL 51995; b) R. M. Brugger, T. J. Less, G. G. Passmore in [15a], S. 32.
- [16] a) *Proc. Fourth Int. Symp. Neutron Capture Ther. Cancer (Progress in Neutron Capture Therapy for Cancer)* (Hrsg.: B. J. Allen, D. E. Moore, B. V. Harrington), Plenum, New York, **1992**; b) V. Benary, R. G. Fairchild, J. Kalf-Ezra, D. Greenberg, Y. Kamen, S. Fiarman, L. Wielopolski in [16a], S. 159.
- [17] a) D. W. Nigg, F. J. Wheeler, P. D. Randolph in [16a], S. 145; b) F. J. Wheeler, M. L. Griebelow, D. E. Wessol, D. W. Nigg in [8a], S. 186.
- [18] J. C. Yanch, O. K. Harling in [16a], S. 133.
- [19] J. C. Yanch, X.-L. Zhou, R. E. Shefer, R. E. Klinkowstein, H. Zhuh in [12a], S. 45.
- [20] C.-K. C. Wang, T. E. Blue, R. A. Gahbauer in [8a], S. 75.
- [21] a) J. C. Yanch, X.-L. Zhou, R. E. Shefer, R. E. Klinkowstein, G. L. Brownell in [16a], S. 107; b) T. E. Blue, T.-X. B. Que, R. N. Christensen, P. Guo, J. W. Blue in [16a], S. 113; c) R. E. Shefer, R. E. Klinkowstein, J. C. Yanch, G. L. Brownell in [16a], S. 119; d) E. Grusell in [16a], S. 123; e) J. F. Crawford, H. Reiste, H. Conde, K. Elmgren, T. Ronqvist, E. Grusell, B. Nilsson, O. Pettersson, P. Stromberg, B. Larsson in [16a], S. 129.
- [22] R. G. Zamenhof, B. W. Murray, G. L. Brownell, G. R. Wellum, E. I. Tolpin, *Med. Phys.* **1975**, *2*, 47.
- [23] R. G. Fairchild in [9a], S. 24.
- [24] P. R. Gavin, R. Huiskamp, F. J. Wheeler, M. L. Griebelow in [12a], S. 34.
- [25] D. W. Nigg, F. J. Wheeler, P. D. Randolph in [16a], S. 145.
- [26] F. J. Wheeler, C. A. Atkinson, P. R. Gavin in [16a], S. 137.
- [27] a) R. F. Barth, A. H. Soloway, R. G. Fairchild, *Cancer Res.* **1990**, *50*, 1061; b) *Proc. First Int. Symp. Neutron Capture Ther. (Brookhaven Nat. Lab.* **1983**, BNL 51730); c) R. G. Fairchild, V. P. Bond in [27b], S. 1.

- [28] Der Autor dankt D. W. Nigg und F. J. Wheeler vom Idaho National Engineering Laboratory für diese Daten.
- [29] A. Wambersie, L. E. Feinendegen, *Clinical Aspects of Neutron Capture Therapy* (Hrsg.: R. G. Fairchild, V. P. Bond, A. D. Woodhead), Plenum, New York, 1989, S. 277.
- [30] D. Gabel, S. Foster, R. G. Fairchild, *Radiat. Res.* **1987**, *111*, 14.
- [31] M. Ljungberg, S.-E. Strand, *J. Nucl. Med.* **1990**, *31*, 493.
- [32] R. J. Paxton, B. G. Beatty, M. F. Hawthorne, A. Varadarajan, L. E. Williams, F. L. Curtis, C. B. Knobler, J. D. Beatty, J. E. Shively, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 3387.
- [33] G. W. Kabalka, M. Davis, P. Bendel, *Magn. Reson. Med.* **1988**, *8*, 231.
- [34] T. L. Richards, K. M. Bradshaw, D. M. Freeman, C. H. Stoak, P. R. Gavin in [8a], S. 179.
- [35] K. M. Bradshaw, T. L. Richards, S. L. Kraft in [16a], S. 325.
- [36] K. M. Bradshaw, M. P. Schweizer, G. H. Glover, J. K. Thomas in [12a], S. 52.
- [37] a) S. R. Tamat, D. E. Moore, B. J. Allen, *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 2161; b) W. F. Bauer, J. A. Wishard, C. Rae, N. Lassahn in [16a], S. 297.
- [38] a) R. F. Barth, A. H. Soloway, D. M. Adams, F. Alam, A. K. M. Anisuzzaman in [16a], S. 305; b) R. F. Barth, D. M. Adams, A. H. Soloway, E. B. Mechetner, F. Alam, A. K. M. Anisuzzaman, *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 890.
- [39] R. Rogus, O. K. Harling, I. Olmez, S. Wirdzek in [16a], S. 301.
- [40] T. Matsumoto, O. Aizawa in [16a], S. 313.
- [41] Y. Nakagawa, T. Kobayashi, Y. Ueno, H. Hatanaka, K. Mukai, K. Matsumoto in [16a], S. 283.
- [42] M. Abe, K. Amano, K. Kitamura, J. Tateshi, H. Hatanaka, *J. Nucl. Med.* **1986**, *27*, 677.
- [43] D. Gabel, H. Holstein, B. Larsson, L. Gille, G. Erikson, D. Sacker, P. Som, R. G. Fairchild, *Cancer Res.* **1987**, *47*, 5451.
- [44] J. E. Woppard, Y. Jiang, J. F. Curran, T. E. Blue, R. F. Barth in [16a], S. 317.
- [45] B. D. Bennett, X. Zha, I. Gay, G. H. Morrison, *Biol. Cell (1981)* **1992**, *74*, 105.
- [46] X. Zha, B. D. Bennett, W. A. Ausserer, G. H. Morrison in [16a], S. 331.
- [47] R. D. Leapman, R. L. Ornberg, *Ultramicroscopy* **1988**, *24*, 251.
- [48] D. E. Moore, J. R. Stretch, A. L. Dawes, D. J. H. Cockayne, B. J. Allen, G. Constantine in [16a], S. 335.
- [49] Geschichte der BNCT: D. N. Slatkin, *Brain* **1991**, *114*, 1609.
- [50] Siehe [7b].
- [51] Siehe [7c].
- [52] A. H. Soloway, persönliche Mitteilung, 1958.
- [53] W. H. Sweet, M. Javid, *Trans. Am. Neurol. Assoc.* **1951**, *60*.
- [54] Siehe [7d].
- [55] L. E. Farr, W. Haymaker, T. Konikowski, S. W. Lippincott, *Int. J. Neurol.* **1962**, *3*, 564.
- [56] J. D. Archarnbeau, *Radiology* **1970**, *94*, 179.
- [57] A. H. Soloway, R. L. Wright, J. R. Messer, *J. Pharm. Exp. Ther.* **1961**, *134*, 117.
- [58] a) M. F. Hawthorne, A. R. Pitochelli, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 5519; b) W. N. Lipscomb, A. R. Pitochelli, M. F. Hawthorne, *ibid.* **1959**, *81*, 5833.
- [59] a) A. R. Pitochelli, M. F. Hawthorne, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 3228; b) H. C. Miller, N. E. Miller, E. L. Muettterties, *ibid.* **1963**, *85*, 3885.
- [60] a) T. L. Heying, J. W. Ager, S. L. Clark, D. J. Mangold, H. L. Goldstein, M. Hillman, R. J. Polak, J. W. Szymbanski, *Inorg. Chem.* **1963**, *2*, 1089; b) D. Grafstein, J. Dvorak, *ibid.* **1963**, *2*, 1128.
- [61] A. H. Soloway, H. Hatanaka, M. A. Davis, *J. Med. Chem.* **1967**, *10*, 714.
- [62] A. K. Asbury, R. G. Ojean, S. L. Nielsen, W. H. Sweet, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **1972**, *31*, 278.
- [63] H. Hatanaka, S. Kamano, K. Amano, S. Hojo, K. Sano, S. Egawa, H. Yasukochi in [9a], S. 349.
- [64] H. Hatanaka, Y. Urano in [9a], S. 381.
- [65] H. Hatanaka, K. Amano, S. Kamano, K. Sano in [13a], S. 447.
- [66] H. Hatanaka, *J. Neurol.* **1975**, *209*, 81.
- [67] W. F. Bauer, K. M. Bradshaw, T. L. Richards in [16a], S. 339.
- [68] G. R. Wellum, E. I. Tolpin, A. H. Soloway, A. Kaczmarczyk, *Inorg. Chem.* **1977**, *16*, 2120.
- [69] E. I. Tolpin, G. R. Wellum, S. A. Berley, *Inorg. Chem.* **1978**, *17*, 2867.
- [70] D. Slatkin, P. Micca, A. Forman, D. Gabel, L. Wielopolski, R. Fairchild, *Biochem. Pharmacol.* **1986**, *35*, 1771.
- [71] M. F. Hawthorne, R. L. Pilling, *The Preparation of the  $B_{10}H_{10}^{2-}$ -Ion (Inorg. Synth.)* **1967**, *9*, 16.
- [72] Siehe [60a, b].
- [73] R. N. Grimes, *Carboranes*, Academic Press, New York, 1970.
- [74] E. L. Muettterties, W. H. Knoth, *Polyhedral Boranes*, Dekker, New York, 1968.
- [75] G. B. Dunks, M. F. Hawthorne, *Acc. Chem. Res.* **1973**, *6*, 124.
- [76] W. H. Knoth, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 1274.
- [77] J. H. Morris, S.-A. Khan, F. Mair, G. Peters in [16a], S. 215.
- [78] M. F. Hawthorne, *Acc. Chem. Res.* **1968**, *1*, 281.
- [79] M. F. Hawthorne, G. B. Dunks, *Science* **1972**, *78*, 462.
- [80] R. N. Leyden, B. P. Sullivan, R. T. Baker, M. F. Hawthorne, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 3758.
- [81] W. N. Lipscomb, *Boron Hydrides*, W. A. Benjamin, New York, 1963.
- [82] K. Wade, *Electron Deficient Compounds*, Appleton-Century-Crofts, New York, 1971.
- [83] *Boron Hydride Chemistry* (Hrsg.: E. L. Muettterties), Academic Press, New York, 1975.
- [84] *Metal Interactions with Boron Clusters* (Hrsg.: R. N. Grimes), Plenum, New York, 1982.
- [85] P. Lemmen, B. Werner in [12a], S. 9.
- [86] a) P. A. Radel, S. B. Kahl in [12a], S. 5; b) S. Sjöberg, M. F. Hawthorne, P. Lindstrom, J. Malmquist, J. Carlsson, A. Andersson, O. Pettersson in [12a], S. 2.
- [87] M. Ichihashi, T. Nakanishi, Y. Mishima, *J. Invest. Dermatol.* **1982**, *78*, 215.
- [88] R. F. Schinazzi, W. H. Prusoff, *Tetrahedron Lett.* **1978**, 4981.
- [89] B. F. Spielvogel, A. Sood, B. R. Shaw, I. H. Hall, *Pure Appl. Chem.* **1991**, *63*, 415.
- [90] K. Shelly, D. A. Feakes, M. F. Hawthorne, P. G. Schmidt, T. A. Krisch, W. F. Bauer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 9039.
- [91] a) B. H. Laster, S. B. Kahl, E. A. Popenoe, D. A. Pate, R. G. Fairchild, *Cancer Res.* **1991**, *51*, 4588; b) S. B. Kahl, D. W. Pate in [12a], S. 10.
- [92] R. M. Straubinger, D. Papahadjopoulos, K. Hong, *Biochemistry* **1990**, *29*, 4929.
- [93] R. K. Jain, L. E. Gerlowski, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **1986**, *5*, 115.
- [94] B. A. Allison, E. Waterfield, A. M. Richter, J. T. Ledy, *Photochem. Photobiol.* **1991**, *54*, 709.
- [95] W. H. Knoth, J. C. Sauer, D. C. England, W. R. Hertler, E. L. Muettterties, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 3973.
- [96] W. H. Knoth, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 935.
- [97] D. Haritz, K. Piscol, D. Gabel in [16a], S. 557.
- [98] D. N. Slatkin, D. D. Joel, R. G. Fairchild, P. L. Micca, K. M. Nawrocky, B. H. Laster, J. A. Coderre, C. C. Finkel, C. E. Poletti, W. H. Sweet, *Basic Life Sci.* **1989**, *50*, 179.
- [99] R. G. Fairchild, S. B. Kahl, B. H. Laster, J. Kaled-Ezra, E. A. Popenoe, *Cancer Res.* **1990**, *50*, 4860.
- [100] J. A. Coderre, M. S. Makar, P. L. Micca, M. M. Nawrocky, D. D. Joel, D. N. Slatkin in [12a], S. 26.
- [101] M. Komura, H. Nakai, M. Shiro, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1987**, 1953.
- [102] W. F. Bale, I. L. Spar, *Adv. Biol. Med. Phys.* **1967**, *5*, 286.
- [103] E. I. Tolpin, G. R. Wellum, F. C. Dohan, P. L. Kornblith, R. G. Zamenhof, *Oncology* **1975**, *32*, 223.
- [104] R. F. Barth, N. Mafune, F. Alam, D. M. Adams, A. H. Soloway, G. E. Makroglow, O. A. Oredipe, T. E. Blue, Z. Steplewski in [8a], S. 142.
- [105] G. Köhler, C. Miinstein, *Nature* **1975**, *256*, 495; siehe auch G. Köhler, *Angew. Chem.* **1985**, *97*, 829; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1985**, *24*, 827 (Nobel-Vortrag).
- [106] a) E. Mizusawa, H. L. Dahlman, S. J. Bennett, D. M. Goldenberg, M. F. Hawthorne, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, *79*, 3011; b) D. M. Goldenberg, R. M. Sharkey, F. J. Primus, E. Mizusawa, M. F. Hawthorne, *ibid.* **1984**, *81*, 560.
- [107] Für ein Beispiel siehe A. R. Horwitz, C. P. Chang, M. Better, K. E. Hellstrom, R. R. Robinson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 8678.
- [108] Eine Zusammenfassung der Immunchemie bis 1968 findet sich bei D. Pressman, A. L. Grossberg, *The Structural Basis of Antibody Specificity*, W. A. Benjamin, New York, 1968.
- [109] a) A. G. Mallinger, E. L. Jozwiak, J. C. Carter, *Cancer Res.* **1976**, *32*, 1947; b) E. I. Tolpin, H. S. Wong, W. N. Lipscomb, *J. Med. Chem.* **1974**, *17*, 792; c) R. L. Sneath, A. H. Soloway, A. S. Dey, *ibid.* **1974**, *17*, 796; d) P. M. Jacobs, R. L. Sneath, A. H. Soloway, A. S. Dey, *J. Pharm. Sci.* **1976**, *65*, 604; e) R. L. Sneath, J. E. Wright, A. H. Soloway, S. M. O'Keefe, A. S. Dey, W. D. Smolnycki, *J. Med. Chem.* **1976**, *19*, 1290.
- [110] M. F. Hawthorne, T. E. Berry, P. A. Wegner, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 4746.
- [111] M. F. Hawthorne, R. J. Wiersema, *J. Med. Chem.* **1972**, *15*, 449.
- [112] a) E. A. Mizusawa, M. R. Thompson, M. F. Hawthorne, *Inorg. Chem.* **1985**, *24*, 1911; b) A. Varadarajan, R. M. Sharkey, D. M. Goldenberg, M. F. Hawthorne, *Bioconjugate Chem.* **1991**, *2*, 102.
- [113] J. L. Maurer, F. Berchier, A. J. Serino, C. B. Knobler, M. F. Hawthorne, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 838 und frühere Veröffentlichungen in dieser Reihe.
- [114] F. Alam, A. H. Soloway, R. F. Barth, N. Mafune, D. M. Adams, W. H. Knoth, *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 2326.
- [115] S. R. Tamat, A. Patwardhan, D. E. Moore, A. Kabral, K. Bradstock, P. Hersey, B. J. Allen in [8a], S. 145.
- [116] R. Abraham, R. Müller, D. Gabel in [8a], S. 148.
- [117] R. F. Barth, A. H. Soloway, D. M. Adams, F. Alam in [16a], S. 265.
- [118] a) *Boron Compounds Suitable for Neutron Capture Therapy for the Treatment of Cancer* (Workshop) (Hrsg.: A. H. Soloway), Annapolis, MD, USA, 1988; b) M. F. Hawthorne, A. Varadarajan, J. L. Maurer in [118a].
- [119] M. F. Hawthorne, *Pure Appl. Chem.* **1991**, *63*, 327.
- [120] A. Varadarajan, M. F. Hawthorne, *Bioconjugate Chem.* **1991**, *2*, 242.
- [121] R. J. Paxton, B.-G. Beatty, A. Varadarajan, M. F. Hawthorne, *Bioconjugate Chem.* **1992**, *3*, 243.
- [122] M. F. Hawthorne, R. R. Kane, C. S. Lee, C. L. Coe, M. A. St. Rose in [12a], S. 14.
- [123] M. F. Hawthorne, R. R. Kane, unveröffentlichte Ergebnisse.

- [124] C. H. Chang, C. N. Ahlem, B. Wolfert, S. M. Hochschwender, R. Jue, J. M. Frincke, D. J. Carlo, *J. Nucl. Med.* **1986**, *27*, 1041; L. D. Anderson, D. L. Meyer, T. R. Battersby, J. M. Frincke, D. Mackensen, S. Lowe, P. Connolly, *ibid.* **1988**, *29*, 835.
- [125] F. J. Primus, M. F. Hawthorne et al., unveröffentlichte Ergebnisse, **1991**.
- [126] Untersuchungen dazu führen F. J. Primus et al. derzeit durch.
- [127] D. J. Hnatowich, F. Virzi, M. Ruschowski, *J. Nucl. Med.* **1987**, *28*, 1294.
- [128] A. Andersson, J. Andersson, J.-O. Burgman, J. Capola, J. Carlsson, H. Conde, J. Crawford, S. Graffmann, E. Grusell, A. Holmberg, E. Johansson, B. S. Larsson, B. Larsson, T. Lilje fors, P. Lindstrom, J. Malmquist, L. Pellettieri, O. Pettersson, J. Ponten, A. Roberti, K. Russel, H. Reist, L. Salford, S. Sjöberg, B. Sternér Löw, P. Strömberg, B. Westermark in [16a], S. 41.
- [129] B. D. Albertson, G. Willeke, M. Millan, S. Binney, S. Martosoff, D. L. Loriaux in [12a], S. 22.
- [130] J. Capala, R. F. Barth, D. M. Adams, J. Carlsson in [12a], S. 30.
- [131] a) S. Sjöberg, J. Malmquist, P. Lindstrom, J. Carlsson, A. Andersson, O. Pettersson in [12a], S. 6; b) J. Malmquist, S. Sjöberg, *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 2534.
- [132] H.-C. Chen et al., unveröffentlichte Ergebnisse.
- [133] M. S. Brown, R. T. Kovanen, J. L. Goldstein, *Science* **1981**, *212*, 628; J. L. Goldstein, R. G. W. Anderson, M. S. Brown, *Nature* **1979**, *279*, 679.
- [134] J. L. Goldstein, J. H. S. Holgeson, M. S. Brown, *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 5403.
- [135] Siehe auch M. S. Brown, J. L. Goldstein, *Angew. Chem.* **1986**, *98*, 579; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, *25*, 583 (Nobel-Aufsatz).
- [136] Y. U. Ho, R. G. Smith, M. S. Brown, J. L. Goldstein, *Blood* **1978**, *52*, 1099.
- [137] S. B. Kahl, J. C. Callaway in [8a], S. 137.
- [138] S. B. Kahl, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 1517.
- [139] a) T. Dougherty, *Photochem. Photobiol.* **1987**, *45*, 879; b) T. F. Delaney, E. Glatstein, *Compr. Ther.* **1989**, *14*, 43.
- [140] T. Dougherty, K. R. Weishaupt, C. J. Gomer, *Cancer Res.* **1976**, *36*, 2326.
- [141] a) S. B. Kahl in [27b], S. 294; b) S. B. Kahl, D. D. Joel, G. C. Finkel, P. L. Micca, M. M. Nawrocky, J. A. Coderre, D. N. Slatkin, *Basic Life Sci.* **1989**, *50*, 325.
- [142] a) M. Miura, D. Gabel, R. G. Fairchild, B. H. Laster, L. S. Warkentien in [8a], S. 131; b) M. Miura, D. Gabel, G. Oenbrink, R. G. Fairchild, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 2247.
- [143] S. B. Kahl, M.-S. Koo in [16a], S. 223.
- [144] a) R. Schwyzer, K. Q. Do, A. N. Eberle, J.-L. Fauchere, *Helv. Chim. Acta* **1981**, *64*, 2078; b) G. Oenbrink, P. Jürgenlimke, D. Gabel, *Photochem. Photobiol.* **1988**, *48*, 51; c) J. Moan, S. Somer, *Cancer Lett. Shannon Irel.* **1983**, *21*, 167.
- [145] S. B. Kahl, D. D. Joel, M. M. Nawrocky, P. L. Micca, K. P. Tran, G. C. Finkel, D. N. Slatkin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 7265.
- [146] M. Miura, P. Micca, D. Gabel in [16a], S. 455.
- [147] R. G. Fairchild, S. B. Kahl, B. H. Laster, J. Kaled-Ezra, E. A. Popeno, *Cancer Res.* **1990**, *50*, 4860.
- [148] J. S. Hill, S. B. Kahl, A. H. Kaye, M. F. Gonzales, N. J. Vardaxis, C. I. Johnson, S. S. Styli, Y. Nakamura in [16a], S. 501.
- [149] F. Alam, A. H. Soloway, B. V. Bapat, R. F. Barth, D. M. Adams, *Basic Life Sci.* **1989**, *50*, 107.
- [150] R. M. Straubinger, N. G. Lopez, R. J. Debs, K. Hong, D. Papahadjopoulos, *Cancer Res.* **1988**, *48*, 5237.
- [151] R. T. Proffitt, L. E. Williams, C. A. Presant, G. W. Tin, J. A. Uliana, R. C. Gamble, J. D. Baldeschwieler, *Science* **1983**, *220*, 502.
- [152] R. T. Proffitt, L. E. Williams, C. A. Presant, G. W. Tin, J. A. Uliana, R. C. Gamble, J. D. Baldeschwieler, *J. Nucl. Med.* **1983**, *24*, 45.
- [153] a) C. A. Presant, R. T. Proffitt, A. F. Turner, L. E. Williams, D. Windsor, J. L. Werner, P. Kennedy, C. Wiseman, K. Gala, R. J. McKenna, *Cancer* **1988**, *62*, 905; b) C. A. Presant, D. Blayney, R. T. Proffitt, A. F. Turner, L. E. Williams, H. I. Nadel, P. Kennedy, C. Wiseman, K. Gala, R. J. Crossley, S. J. Preiss, G. E. Ksionski, S. L. Presant, *Lancet* **1990**, *335*, 1307.
- [154] R. M. Straubinger, K. Hong, D. S. Friend, D. Papahadjopoulos, *Cell Cambridge Mass.* **1983**, *32*, 1069.
- [155] K. Shelly, M. F. Hawthorne, P. G. Schmidt in [16a], S. 259.
- [156] a) R. L. Pilling, M. F. Hawthorne, E. A. Pier, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 3568; b) M. F. Hawthorne, R. L. Pilling, P. M. Garrett, *ibid.* **1965**, *87*, 4740.
- [157] B. L. Chamberland, E. L. Muetterties, *Inorg. Chem.* **1964**, *3*, 1450.
- [158] M. F. Hawthorne, R. L. Pilling, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 3873.
- [159] M. F. Hawthorne, R. L. Pilling, P. F. Stokely, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 1893.
- [160] D. A. Feakes, K. J. Shelly, M. F. Hawthorne, P. G. Schmidt, T. A. Krisch, W. F. Bauer, *Boron USA Workshop III*, Pullmann, WA, USA, **1992**.
- [161] D. A. Feakes, K. J. Shelly, M. F. Hawthorne, P. G. Schmidt, C. A. Elstad, G. G. Meadows, W. F. Bauer in [12a], S. 10.
- [162] K. J. Shelly, M. F. Hawthorne, C. B. Knobler in [12a], S. 14.
- [163] K. J. Shelly, C. B. Knobler, M. F. Hawthorne, *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 2889.
- [164] D. E. Moore, A. K. Chandler, S. Corderoy-Buck, J. G. Wilson, B. J. Allen in [16a], S. 451.
- [165] H. E. Hadd in [27b], S. 281.
- [166] S. B. Kahl in [27b], S. 294.
- [167] O. Hechter, I. L. Schwartz in [27b], S. 197.
- [168] F. Wellmann, R. Abraham, R. Müller, D. Gabel, *Z. Naturforsch. C* **1991**, *46*, 252.
- [169] B. F. Spielvogel, *Mol. Struct. Energ.* **1988**, *5*, 329.
- [170] H. R. Snyder, A. J. Reedy, W. J. Lennarj, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 835.
- [171] Y. Mishima, M. Ichihashi, T. Nakanishi, M. Tsuji, M. Ueda, T. Nakagawa in [27b], S. 355.
- [172] a) Y. Mishima, C. Honda, M. Ichihashi, H. Obara, J. Hiratsuka, H. Fukuda, H. Karashima, T. Kobayashi, K. Kanda, K. Yoshino, *Lancet* **1989**, *388*; b) Y. Ujeno, K. Akuta, H. Hatanaka, Y. Mishima, Y. Oda, Y. Nakagawa in [16a], S. 593; c) Y. Mishima, M. Ichihashi, C. Honda, M. Shiono, T. Nagogawa, H. Obara, J. Shirakawa, J. Hiratsuka, K. Kanda, T. Kobayashi, T. Nozaki, O. Aizawa, T. Sao, H. Karoshima, K. Yoshino, H. Fukuda in [16a], S. 577.
- [173] a) Y. Kinoshita, K. Yoshino, Y. Mori, H. Kakihana, Y. Mishima in [16a], S. 243; b) C. Honda, M. Shiono, N. Wadabayashi, M. Ichihashi, Y. Mishima, T. Kobayashi, K. Kanada, Y. Hori, K. Yoshino in [16a], S. 421.
- [174] J. A. Coderre, J. D. Glass, R. G. Fairchild, U. Roy, S. Cohen, I. Fand, *Cancer Res.* **1987**, *47*, 6377.
- [175] D. C. Roberts, K. Suda, J. Samanen, D. S. Kemp, *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 3435.
- [176] J. A. Coderre, J. A. Kaled-Ezra, R. G. Fairchild, P. L. Micca, L. E. Reinstein, J. D. Glass, *Cancer Res.* **1988**, *48*, 6313.
- [177] J. A. Coderre, J. D. Glass, R. G. Fairchild, P. L. Micca, I. Fand, D. D. Joel, *Cancer Res.* **1990**, *50*, 138.
- [178] R. G. Zamenhof, D. E. Wazer, H. Madoc-Jones, O. K. Harling in [12a], S. 58.
- [179] K. Yoshino, T. Maruyama, H. Takahashi, Y. Mori, H. Kakihana, Y. Mishima, M. Ichihashi, C. Honda, M. Shiono in [12a], S. 4.
- [180] J. K. Prasher, D. E. Moore, J. G. Wilson, B. J. Allen in [12a], S. 2.
- [181] E. G. Samsel, B. M. Simpson in [16a], S. 251.
- [182] B. F. Spielvogel, A. T. McPhail, I. H. Hall, R. G. Fairchild, P. L. Micca in [27b], S. 245.
- [183] W. Porschen, J. Marx, H. Mühlensiepen, L. E. Feinendegen, F. Dallacker, H. Mückter, W. Müllner, T. Böhrnel in [27b], S. 331.
- [184] B. F. Spielvogel, A. Good, J. Tomasz, S. Kathikayan, W. Powell in [12a], S. 6.
- [185] Y. Mishima, M. Ichihashi, S. Hatta, C. Honda, K. Yamamura, T. Nakagawa, *Pigm. Cell Res.* **1987**, *2*, 226.
- [186] L. Dencker, B. Larsson, K. Olander, S. Ullberg, *Br. J. Cancer* **1982**, *45*, 95.
- [187] L. Dencker, B. Larsson, K. Olander, S. Ullberg, M. Yokota, *Pharmacol. Toxicol.* **1981**, *49*, 141.
- [188] R. G. Fairchild, S. Packer, D. Greenberg, S. Prantika, A. B. Brill, I. Fand, W. P. McNally, *Cancer Res.* **1982**, *42*, 5126.
- [189] A. G. Bolt, I. S. Forrest, *Recent Adv. Biol. Psychiatry* **1968**, *10*, 20.
- [190] Y. Mishima, *Pigm. Cell Res.* **1973**, *1*, 215.
- [191] W. Tjarks, D. Gabel, *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 315.
- [192] H. Ketz, W. Tjarks, D. Gabel, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 4003.
- [193] J. G. Wilson, *Pigm. Cell Res.* **1987**, *2*, 297.
- [194] J. G. Wilson in [16a], S. 227.
- [195] H. S. Mason, D. J. E. Ingram, B. Allen, *Arch. Biochem. Biophys.* **1960**, *86*, 225.
- [196] M. S. Blois, A. B. Zahlan, J. E. Maling, *Biophys. J.* **1964**, *4*, 471.
- [197] S. Packer, R. G. Fairchild, K. P. Watts, D. Greenberg, S. J. Hannon, *Radiopharmaceuticals: Structure – Activity Relationships* (Hrsg.: R. P. Spencer), Grune and Stratton, New York, **1981**, Kap. 12, S. 251.
- [198] R. G. Fairchild, D. Greenberg, K. P. Watts, S. Packer, H. L. Atkins, P. Som, S. J. Hannon, A. B. Brill, I. Fand, W. P. McNally, *Cancer Res.* **1982**, *42*, 556.
- [199] T. Nakagawa, K. Aono, *Chem. Pharm. Bull.* **1976**, *24*, 778.
- [200] T. Nakanishi, M. Ichihashi, Y. Mishima, T. Matsuzawa, H. Fukuda, *Int. J. Radiat. Biol.* **1980**, *37*, 573.
- [201] F. Alam, A. H. Soloway, R. F. Barth, D. M. Adams in [13a], S. 8.
- [202] F. Alam, B. V. Bapat, A. H. Soloway, R. F. Barth, N. Mafune, D. M. Adams in [8a], S. 121.
- [203] J. Goodchild, *Bioconjugate Chem.* **1990**, *1*, 165.
- [204] *Oligodeoxynucleotides: Antisense Inhibitors of Gene Expression* (Hrsg.: J. S. Cohen), CRC Press, Boca Raton, FL, USA, **1989**.
- [205] D. A. Whittaker, D. P. Kelly, M. Pardee, R. F. Martin in [16a], S. 231.
- [206] A. Corder, R. F. Martin, A. Whittaker, D. P. Kelly, H. Meriaty, B. J. Allen in [12a], S. 12.
- [207] A. Sood, B. F. Spielvogel, B. R. Shaw, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 9234.
- [208] a) B. F. Spielvogel, A. Sood, B. R. Shaw, I. H. Hall, *Pure Appl. Chem.* **1991**, *63*, 415; b) B. F. Spielvogel, A. Sood, B. R. Shaw, I. H. Hall, R. G. Fairchild, B. H. Laster, C. Gordon in [16a], S. 211.
- [209] a) A. Sood, B. R. Shaw, B. F. Spielvogel, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9000; b) siehe auch J. Tomasz, B. R. Shaw, K. Porter, B. F. Spielvogel, A. Sood, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 1404; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 1373.
- [210] B. F. Spielvogel, A. Sood, W. Powell, J. Tomasz, K. Porter in [12a], S. 17.

- [211] T. K. Liao, E. C. Podrebarac, C. C. Cheng, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 1869.
- [212] R. F. Schinazi, W. H. Prusoff, *Tetrahedron Lett.* **1978**, 4981.
- [213] R. F. Schinazi, W. H. Prusoff, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 841.
- [214] R. F. Schinazi, S. Kusuma, B. H. Laster, E. Popeno, R. G. Fairchild in [118a].
- [215] Y. Yamamoto, T. Seko, H. Nemoto, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 4734.
- [216] a) Y. Yamamoto, T. Seko, F. Rong, H. Nemoto, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 7191; b) Y. Yamamoto, *Pure Appl. Chem.* **1991**, *63*, 423.
- [217] A. K. M. Anisuzzaman, F. Alam, A. H. Soloway, *Polyhedron* **1990**, *9*, 891.
- [218] W. Tjarks, A. K. M. Anisuzzaman, L. Liang, A. H. Soloway, R. F. Barth, D. J. Perkins, D. M. Adams, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 1628.
- [219] W. Tjarks, A. K. M. Anisuzzaman, A. H. Soloway, *Nucleosides Nucleotides* **1992**, *11*, 1765.
- [220] a) L. Liu, R. F. Barth, A. H. Soloway, A. K. M. Anisuzzaman, F. Alam, W. Tjarks, X.-H. Zha, G. H. Morrison, *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **1991**, *34*, 2418; b) W. Tjarks, A. K. M. Anisuzzaman, A. H. Soloway, L. Liu, R. F. Barth in [12a], S. 11.
- [221] Siehe [45].
- [222] A. H. Soloway, persönliche Mitteilung, **1992**.
- [223] Y. Yamamoto, T. Seko, H. Nakamura, H. Nemoto, H. Hojo, N. Mukai, Y. Hashimoto, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1992**, 157.
- [224] R. F. Schinazi, N. Goudgaon, J. Soria, D. C. Liotta in [12a], S. 11.
- [225] R. C. Reynolds, T. W. Trask, W. D. Sedwick, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2391.

... meine  
**ANGEWANDTE**  
**CHEMIE**  
gehört <sup>zu</sup> mir !

Hans-Wilhelm G., Dr., Habilitand,  
nach der Lektüre seines persönlichen  
Exemplars der **ANGEWANDTEN** im  
kreativen Aufschwung

Bestellen auch Sie gleich Ihr  
persönliches Abonnement der Angewandten!  
Anruf beim VCH-Leserservice genügt:  
0 62 01/ 606-199 (Fax -117).