



Master Thesis

## Stabilität von Bombesin-Derivaten gegen enzymatischen Abbau

**Author(s):**

Leonardi, Christa

**Publication Date:**

2002

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004428146> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).



Eidgenössische Technische Hochschule Zürich  
Swiss Federal Institute of Technology Zurich

Departement  
Angewandte Biowissenschaften

Institut für Pharmazeutische Wissenschaften

# Stabilität von Bombesin-Derivaten gegen enzymatischen Abbau

Diplomarbeit

von

Christa Leonardi

Bürgerin von Bedretto

Leiter: Prof. Dr. P. A. Schubiger

Betreuerin: Dr. E. Garcia Garayoa

04. März bis 26. Juli 2002

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>Aufgabenstellung</b>	<b>3</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>4</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>5</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>8</b>
2.1. Chemikalien	8
2.2. Bombesin-Derivate	9
2.3. Blut-Plasma, Vollblut	9
2.4. Zellkulturen	9
2.5. Mäuse	9
2.6. HPLC	10
2.7. Radiomarkierung der Bombesin-Derivate	10
2.8. Metabolische Stabilität von Bombesin-Derivaten	11
2.8.1. Stabilität in Plasma	11
2.8.2. Stabilität in Vollblut	11
2.8.3. Stabilität in PC-3 Zelllysaten	12
2.9. Protein Assay	12
2.10. Biodistribution und in vivo Metabolismus	12
<b>3. Resultate</b>	<b>13</b>
3.1. Radiomarkierung der Bombesin-Derivate	13
3.2. Stabilität in Plasma	13
3.3. Stabilität in Vollblut	16
3.4. Stabilität in PC-3 Zelllysaten	18
3.5. Biodistribution und in vivo Metabolismus	19
<b>4. Diskussion</b>	<b>22</b>
<b>5. Danksagung</b>	<b>27</b>
<b>6. Literatur</b>	<b>28</b>

## Aufgabenstellung

Diese Arbeit hat zum Ziel, einerseits die metabolische Stabilität zweier Bombesin-Derivate *in vitro* zu untersuchen und andererseits erste Abklärungen bezüglich deren Biodistribution und des *in vivo* Metabolismus zu machen. Untersuchungen in Blutplasma, Blut und in Zellkulturen erlauben es, den Metabolismus dieser Derivate zu studieren. Der metabolische Abbau von Peptiden wie Bombesin führt ausschliesslich zu Fragmenten, die durch das Einwirken von endogenen Peptidasen entstehen. Die Radiomarkierung der Peptide erlaubt die Analyse dieser Fragmente mittels HPLC mit Aktivitätsdetektor. Um den Einfluss verschiedener Peptidasen auf die Stabilität der Bombesin-Derivate zu untersuchen, sollen Enzyminhibitoren eingesetzt werden. Diese Arbeit soll Informationen liefern, damit später gezielt Veränderungen in der Peptidkette vorgenommen werden können, die eine grössere Stabilität des Peptids bewirken. Eine hohe Stabilität des markierten Peptids ist wichtig, damit einerseits eine Anreicherung im Tumor erfolgen kann und andererseits die Radiotoxizität der Metaboliten gegenüber Organen und dem Knochenmark möglichst klein ist.

---

## Zusammenfassung

Seit der Entdeckung, dass neoplastische Zellen Neuropeptid-spezifische Rezeptoren hoher Affinität und Spezifität überexprimieren, haben sich diese in der Nuklearmedizin als interessante Targets für die gezielte Tumorthherapie entwickelt. Bombesin, ein 14 Aminosäuren langes Neuropeptid, welches verschiedene physiologische Vorgänge wie beispielsweise die gastrointestinale Hormonfreisetzung steuert, ist auch an der Bildung von Brust- und Prostatakrebs beteiligt. Radiomarkierte Bombesin-Analoga scheinen daher eine interessante Möglichkeit zur Diagnose sowie zur Therapie solcher Tumoren zu sein. Die schnelle metabolische Inaktivierung von Bombesin, schränkt allerdings seine Verwendung als Radiopharmakon bislang ein.

In der vorliegenden Arbeit wurden mit zwei Bombesin-Derivaten (BBS II und BBS III), welche mit  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$  markiert wurden, Untersuchungen in Blutplasma, Blut und Kulturen von Tumorzellen durchgeführt, um diesen Metabolismus zu studieren. Ebenso wurden Abklärungen über deren Biodistribution gemacht. Die Verwendung von verschiedenen Enzyminhibitoren erlaubte es, die für den Abbau verantwortlichen Enzyme auszumachen. Beide Derivate wurden in Plasma bei 37°C ziemlich rasch metabolisiert, insbesondere BBS III, welches eine Plasma-Halbwertszeit von nur ca. 10 min aufwies und nach 1 h nur noch zu 20% als intaktes Peptid vorlag. BBS II war nach ungefähr 30 min zur Hälfte und nach 2 h zu 88% abgebaut. Der Inhibitor Prolin-Isoleucin konnte die Stabilität von BBS II deutlich erhöhen (88% intakt nach 1 h), ebenso der Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Inhibitor (93% intakt). Die Kombination von Prolin-Isoleucin und dem ACE Inhibitor konnte den Anteil an intaktem Peptid sogar auf 100% erhöhen. Bei BBS III konnte Prolin-Isoleucin die Stabilität auf 47% erhöhen, wobei wiederum der ACE Inhibitor die grösste Wirkung bezüglich Stabilitätserhöhung zeigte (92%). In Vollblut wies BBS II eine Halbwertszeit von ca. 48 min auf und lag nach 2 h noch zu 23% als intaktes Peptid vor. BBS III war nach ungefähr 7 min zur Hälfte abgebaut und nach 1 h war kein intaktes Peptid mehr ersichtlich. Der Einfluss der Inhibitoren im Blut war ähnlich wie im Plasma. Allerdings schien Phosphoramidon im Blut eine Stabilitätserhöhung zu bewirken, was im Plasma nicht der Fall war. In den PC-3 Zelllysaten fand eine noch schnellere Degradation der Derivate statt, wobei kein Inhibitor die Stabilität markant verbessern konnte. Die Biodistribution zeigte auch bei Co-Injektion der Enzyminhibitoren Phosphoramidon und Enalapril keine signifikant erhöhte Anreicherung in Organen, in denen aufgrund Bombesin-spezifischer Rezeptoren eine solche zu erwarten gewesen wäre.

Damit scheinen zumindest im Plasma und Blut die Metallendopeptidase EC 3.4.24.16 und das Angiotensin Converting Enzyme (ACE) einen starken Einfluss auf den Abbau von Bombesin auszuüben, wobei ACE bisher noch nie zusammen mit Bombesin beschrieben wurde. Als deren Spaltungsstellen werden die Bindungen  $\text{Gln}^7\text{-Trp}^8$  und  $\text{His}^{12}\text{-Leu}^{13}$  der bioaktiven Sequenz von Bombesin vermutet. Diese Resultate dienen als Basis für die Entwicklung neuer, stabiler Bombesin-Derivate.

## 1. Einleitung

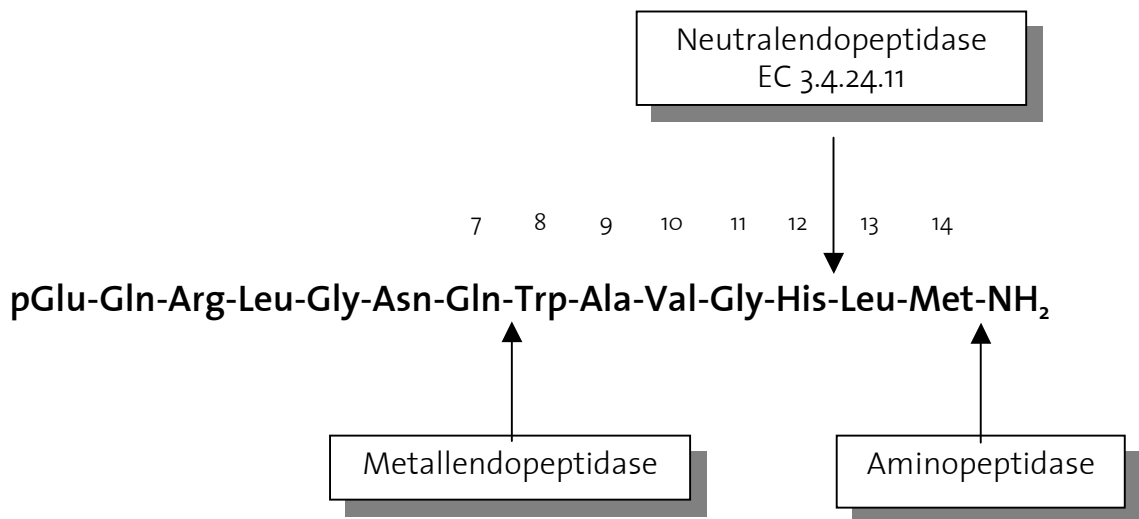
Mitte der achtziger Jahre wurde entdeckt, dass gewisse Tumoren Rezeptoren für Neuropeptide überexprimieren [12]. Seither haben in der Krebsforschung Neuropeptide ein verstärktes Interesse geweckt für die *in vivo* Diagnose und Radiotherapie von Neuropeptid-Rezeptoren überexprimierenden Tumoren. Der Gebrauch von Neuropeptid-Rezeptoren als Targets könnte sich damit zu einer neuen Klasse von Radiopharmazeutika entwickeln, die eine spezifische, tumor-gezielte und nicht invasive Radiotherapie erlauben [5].

Im Vergleich zu Makromolekülen wie monoklonalen Antikörpern hat die Anwendung von kleinen Peptiden (weniger als 30 Aminosäuren) als tumorlokalisierende Radiopharmazeutika den Vorteil, dass sie ein kleines Molekulargewicht aufweisen, was erfahrungsgemäss die Penetration ins Tumorgewebe verbessert. Ebenso ist eine schnellere Clearance des gesunden Gewebes zu erwarten und damit ein besseres Radioaktivitätsverhältnis Tumor/Nicht-Tumor. Die Peptide, beziehungsweise deren Analoge, besitzen keine antigenen Eigenschaften, jedoch eine hohe Affinität zum Rezeptor. Sie ertragen auch harte chemische Bedingungen während der Modifikation und des Radiolabelings.

Die erfolgreiche Anwendung von radioaktiv markierten Somatostatin- und vasoaktiven intestinalen Peptid-Analogen für die Bildgebung von rezeptorexprimierenden Tumoren haben die Entwicklung anderer Regulatorpeptide wie Neurotensin, Substanz P, Cholecystokinin oder Bombesin als mögliche Tumordiagnostika und -therapeutika vorangetrieben. Diese Arbeit beschäftigt sich nun mit einem dieser Peptide und zwar mit Bombesin.

Bombesin (pGlu<sup>1</sup>-Gln<sup>2</sup>-Arg<sup>3</sup>-Leu<sup>4</sup>-Gly<sup>5</sup>-Asn<sup>6</sup>-Gln<sup>7</sup>-Trp<sup>8</sup>-Ala<sup>9</sup>-Val<sup>10</sup>-Gly<sup>11</sup>-His<sup>12</sup>-Leu<sup>13</sup>-Met<sup>14</sup>-NH<sub>2</sub>) ist ein amphibisches Tetradecapeptid, das 1970 erstmals aus der Haut des Frosches *Bombina orientalis* isoliert wurde. Es gehört zusammen mit dem Gastrin Releasing Peptide (GRP), welches das Säugetier-Homolog von Bombesin darstellt, und Neuromedin B zur Familie der bombesinähnlichen Peptide. Diese Peptide können verschiedene biologische Antworten am G-Protein-gekoppelten GRP-Rezeptor auslösen. Auf diese Weise werden zum Beispiel die gastro-intestinale Hormonfreisetzung und exokrine Sekretionen stimuliert, wie auch zirkadiane Rhythmen aufrecht erhalten. Es ist bekannt, dass Bombesin auch an der Bildung von Brust- und Prostatakrebs beteiligt ist, welche mit einer enormen Überexprimierung des GRP-Rezeptors verbunden ist [9]. Daher wird nun der Einsatz von radiomarkierten Bombesin-Analogen zur Diagnose und Therapie solcher Tumoren untersucht.

Das Hauptproblem der Anwendung von Neuropeptiden in der Nuklearmedizin liegt darin, dass sie *in vivo* durch endogene Peptidasen schnell abgebaut werden [10]. Bislang sind allerdings nur wenige Peptidasen bekannt, welche intaktes Bombesin schneiden: eine Metallendopeptidase soll die Bindung Gln<sup>7</sup>-Trp<sup>8</sup> hydrolysieren, die Neutralendopeptidase EC 3.4.24.11 die His<sup>12</sup>-Leu<sup>13</sup> Bindung und eine Aminopeptidase spaltet die Aminogruppe am Met<sup>14</sup> ab [6] (Abb.1).



**Abbildung 1: Bombesin-Inaktivierung durch Peptidasen.**

Die Pfeile geben die Bindungen an, welche durch die Enzyme gespalten werden.

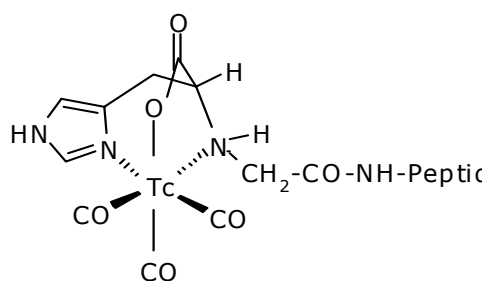
Die Aminosäuren-Sequenz Trp<sup>8</sup>-Ala<sup>9</sup>-Val<sup>10</sup>-Gly<sup>11</sup>-His<sup>12</sup>-Leu<sup>13</sup>-Met<sup>14</sup>-NH<sub>2</sub> (BBS (8-14)) ist die kürzeste Sequenz des nativen Peptids, die an Rezeptoren binden kann. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Bombesin-Analogen handelt es sich um die Derivate mit den Bezeichnungen BBS II und BBS III. BBS II besitzt als einzige Modifikation den N<sub>α</sub>-Histidiny-Acetat-Rest ((N<sub>α</sub>His)Ac), welcher als Ligand für die Radiomarkierung dient. Um störende Wechselwirkungen zwischen diesem Liganden und der Rezeptorbindungsstelle zu vermeiden, wurde bei der Synthese nicht die kürzeste Sequenz sondern BBS (7-14) verwendet. BBS III besitzt zusätzlich ein D-Phenylalanin, anstelle des Glycins ein β-Alanin und Leucin-Methionin sind durch Phenylalanin und Norleucin ersetzt (Tab.1).

**Tabelle 1: Bezeichnung und Sequenz der ausgewählten BBS-Derivate.**

BBS II besitzt im Vergleich zum nativen Bombesin nur den Chelator (N<sub>α</sub>His)Ac, der für die Markierung mit <sup>99m</sup>Tc nötig ist. BBS III ist an den Positionen 6, 11, 13 und 14 modifiziert.

Analoges	Sequenz
BBS (7-14)	Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH <sub>2</sub>
BBS II	(N <sub>α</sub> His)Ac-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH <sub>2</sub>
BBS III	(N <sub>α</sub> His)Ac- <b>DPhe</b> -Gln-Trp-Ala-Val- <b>βAla</b> -His- <b>Phe-Nle</b> -NH <sub>2</sub>

BBS III wurde ursprünglich zur Untersuchung und Charakterisierung des GRP-Rezeptors synthetisiert. Jetzt soll untersucht werden, ob seine Modifikationen den Abbau durch Peptidasen hemmen können. Die Peptid-Analoga wurden für die Stabilitätsuntersuchungen mit dem Gamma-Strahler  $^{99m}\text{Tc}$  in Form des Carbonyl-Komplexes markiert. Das  $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$ -Tricarbonyl  $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$  wird durch Carbonylierung des Pertechnetats in Gegenwart von Natriumborhydrid als Reduktionsmittel erhalten. Die Kopplung des  $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$ -Tricarbonyl an die Peptide erfolgt unter Verwendung des tridentaten Ligands (N $\alpha$ His)Ac, welcher bei der Peptid-Synthese an das Amino-Ende des Peptids gebunden wird. Während der Markierung werden die drei Wassermoleküle des  $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$ -Tricarbonyl durch die drei Ligandatome von Histidin ersetzt [1,3,7,13] (Abb.2).



**Abbildung 2:**

**Kopplung des  $^{99m}\text{Tc}$ -Tricarbonyl-Komplexes an Bombesin.**

Der tridentate Ligand (N $\alpha$ His)Ac verbindet das Peptid mit dem Radionuklid.

In den Stabilitätsuntersuchungen in Plasma und Blut wurde darauf geachtet, dass die eingesetzte Peptidkonzentration möglichst die *in vivo* Situation wiedergibt. Geht man davon aus, dass später einem Patienten ungefähr 500 MBq  $^{99m}\text{Tc}$ -markiertes Peptid injiziert werden, ist unter der Annahme einer gleichmässigen Verteilung im Blut mit einer Konzentration von ca. 100 kBq / ml zu rechnen. Dies entspricht einer Peptidkonzentration von 20-100 fmol. Deshalb, und weil bei höheren Konzentrationen eine Enzymsättigung zu erwarten ist, wurde in den *in vitro* Versuchen nicht wesentlich davon abgewichen. Aus praktischen Gründen wurde allerdings eine etwas höhere Konzentration verwendet, damit man bei der Analyse nicht unterhalb der Nachweisgrenze lag. Diese geringe Peptidkonzentration ist mitunter ein Grund dafür, dass die Analysen nicht mittels Massenspektrometrie, sondern mittels HPLC mit Aktivitätsdetektor durchgeführt wurden.

Durch die Zugabe von Enzyminhibitoren bei den Stabilitätsmessungen wurde der Einfluss verschiedener Peptidasen auf die Stabilität untersucht (Tab.2). Die Wahl der Inhibitoren erfolgte aufgrund von Hinweisen aus der Literatur [6,8,11,15,16].

Nebst den Untersuchungen in Plasma und Blut wurde abgeklärt, ob die in den Zellen vorhandenen Enzyme andere Metaboliten der Bombesin-Derivate liefern als im Plasma und Blut, wie schnell die Degradation verläuft und ob mit verschiedenen Enzyminhibitoren eine bessere Stabilität erreicht werden kann.



**Tabelle 2: Peptidasen und ihre Inhibitoren.**

Die aufgelisteten Inhibitoren wurden bezüglich ihrer Stabilitätsverbesserung untersucht.

Enzym	Inhibitor
Neutralendopeptidase EC 3.4.24.11	Phosphoramidon
Aminopeptidase N EC 3.4.11.2	Bestatin
Metallendopeptidasen EC 3.4.24	1,10-Phenanthrolin
Endopeptidase EC 3.4.24.16	Prolin-Isoleucin
Angiotensin Converting Enzyme (ACE)	ACE-Inhibitor* Enalapril
Prolylendopeptidase u.a.	Bacitracin
Trypsin u.a.	Soybean Trypsin Inhibitor

\* pGlu-Trp-Pro-Arg-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro

Diese Informationen sollen später mithelfen, weitere Stabilisierungen in der Peptidkette vorzunehmen, die erstens eine Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit bewirken und damit die Chance, den Tumor zu erreichen, erhöhen und zweitens die nach der Internalisierung des Peptids in den Tumor entstehenden Metaboliten in ihrer Eliminationsgeschwindigkeit verlangsamen. Wichtig ist, dass die Bindungsaffinität der Peptide zum Rezeptor trotz Modifikationen erhalten bleibt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Chemikalien

Kulturmedium Dulbecco's MEM mit GLUTAMAX I, antibiotische/ antimykotische Lösung (PSF), Trypsin/ EDTA und Soybean Trypsin Inhibitor wurden von GIBCO BRL Life Technologies AG (Basel, Schweiz) bezogen, Trifluoressigsäure (TFA), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaBH<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>KNaO<sub>6</sub>·4H<sub>2</sub>O (Kalium-Natriumtartrat Tetrahydrat) und 1,10-Phenanthrolin von Fluka (Buchs, Schweiz), Acetonitril und Methanol von Macherey-Nagel (Oensingen, Schweiz). Fetales Kälber Serum (FCS) stammte von AMIMED (Allschwil, Schweiz), Wasser für Injektionszwecke von Braun Medical (Emmenbrücke, Schweiz), HCl, NaCl, MgCl<sub>2</sub>, NaOH, KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O von Merck (Dietikon, Schweiz). Das Working Reagent für den Protein-Assay wurde bei SOCOCHIM SA (Lausanne, Schweiz) eingekauft. Bacitracin, Phosphoramidon, Enalapril-Maleat und der ACE-Inhibitor (pGlu-Trp-Pro-Arg-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro) wurde von der Firma SIGMA (Buchs, Schweiz) erhalten, Bestatin und Prolin-Isoleucin (H-Pro-Ile-OH) stammte von BACHEM

(Bubendorf, Schweiz). Ein Mallinckrodt  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Generator (Petten, Niederlande) lieferte das  $\text{Na}[^{99\text{m}}\text{TcO}_4]$  unter Verwendung von 0.9% physiologischer NaCl-Lösung.

## 2.2. Bombesin-Derivate

Die Bombesin-Derivate wurden von Prof. Dr. D. Tourwé in Brüssel mittels einer Festphasen-Synthese auf einem "Merrifield Harz" unter Verwendung eines halbautomatischen Labortec Peptide Synthesizer SP640B synthetisiert.

## 2.3. Blut-Plasma, Vollblut

Für die Stabilitätsuntersuchungen in Plasma wurde menschliches Plasma von gesunden Probanden verwendet. Das frische Vollblut wurde in BD Vacutainer (LH 143 IU) entnommen und sofort bei 4°C und 20'000g während 20 min zentrifugiert (BECKMAN GS-15R Zentrifuge). Nicht verwendetes Plasma wurde eingefroren und innerhalb von maximal 30 Tagen verwendet. Die Untersuchungen in Vollblut erfolgten in Blut, welches maximal 24 Stunden bei 4°C in heparinisierten Behältern aufbewahrt wurde.

## 2.4. Zellkulturen

Bei den verwendeten Zellen handelte es sich um eine humane Prostatakarzinom-Zelllinie (PC3-Zellen). Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen (75 cm<sup>3</sup>) mit 20 ml in DMEM-Medium, ergänzt mit FCS und PSF (100 IU/ml Penicillin, 100 g/ml Streptomycin und 0.25 g/ml Fungizone) bei 37°C und 7.5% CO<sub>2</sub> gezüchtet. Zweimal wöchentlich erfolgte abwechselnd entweder ein Mediumwechsel (DMEM + 1% FCS) oder eine Umsetzung der Zellen. Dabei wurden die Zellen mit Trypsin 0.25% in EDTA während 5 min bei 37°C vom Boden abgelöst, in 10% FCS-Medium suspendiert und im Verhältnis 1:2 bis 1:7 verdünnt (je nach Zelldichte).

## 2.5. Mäuse

Für die *in vivo* Untersuchungen wurden NMRI-Mäuse (weiblich, ca. 8 Wochen) von Biological Research Laboratories Ltd. (Füllinsdorf, Schweiz) eingesetzt.

## 2.6. HPLC

Die Analysen der Stabilitätsversuche erfolgten mit einem HPLC Varian Pro Star, bestehend einer Varian ProStar 230 Solvent Delivery-Pumpe, einem Varian Photodiode Array Detector Model 330, einem Varian ProStar Autosampler Model 410 und einer Reversed-Phase Säule (CC 250/4.6 Nucleosil 100-5 C<sub>18</sub> Säule, 5 µm, 250 mm Länge, 4.6 mm Durchmesser von Macherey-Nagel, Oensingen, Schweiz). Für die Aktivitätsmessung wurde der Detektor Radiomatic Flo-one Beta (Packard Canberra) verwendet. Als mobile Phase wurde Solvens A: Acetonitril mit 0.1% Trifluoressigsäure, Solvens B: Wasser mit 0.1% Trifluoressigsäure und Solvens C: Methanol eingesetzt. Für die Qualitätskontrolle der Radiomarkierungen wurde folgender Gradient mit Solvens A, B und C verwendet:

- 0-7 min: A: 0%, B: 90%, C: 10%
- 7-20 min: A: 0% → 95%  
B: 90% → 0%  
C: 10% → 5%
- 20-35 min: A: 95%, B: 0%, C: 5%

Mit diesem Gradienten wies BBS II eine Retentionszeit von 17-18 min auf, BBS III eine von 18-19 min, wodurch die Qualität relativ schnell beurteilt werden konnte.

Für die Analyse der Stabilitätsmessungen wurde der Gradient so angepasst, dass die Metaboliten deutlich vom intakten Peptid getrennt wurden:

- 0-5 min: A: 15%, B: 80%, C: 5%
- 5-35 min: A: 15% → 80%  
B: 80% → 20%  
C: 5% → 0%

## 2.7. Radiomarkierung der Bombesin-Derivate

Für die Herstellung des <sup>99m</sup>Tc-Tricarboxylkomplexes [<sup>99m</sup>Tc (OH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (Carboxylierung) wurde ein Kit aus 5.5 mg Natriumborhydrid (0.15 mmol), 4.0 mg Natriumcarbonat wasserfrei (0.04 mmol) und 15.0 mg Kalium-Natriumtartrat Tetrahydrat (0.07 mmol) verwendet. Diese Mischung wurde während 20 min in einem Reacti-Vial mit CO begast. Anschliessend wurden 1-1.5 ml [<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub>]<sup>-</sup> Eluat in physiologischer Kochsalzlösung aus dem Generator hinzugefügt und die Mischung während 30 min bei 75°C erhitzt. Danach wurde die Lösung mit Eis gekühlt und mit 300 µl einer Mischung von 1 M Phosphatpuffer (pH 7.4) (11.59 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 2.53 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O in 100 ml) und 1 M HCl 1:1 versetzt. Der pH-Wert wurde auf 6.5 bis 7 eingestellt. Für die Markierung wurden 500 µl der <sup>99m</sup>Tc-Tricarboxyl-Lösung mit 15 µl einer 1 mM Lösung des gewünschten Bombesin-Derivates versetzt und während 60 min bei 75°C erhitzt. Mittels Reversed-Phase HPLC wurde auf vollständiges Umsetzen der beiden

Reaktionen (Carbonylierung und Markierung) geprüft. Während unvollständiger Austausch von Luft gegen Kohlenmonoxid zu Pertechnetat führte, zeigte sich bei Heizen von weniger als 1 h  $^{99m}\text{Tc}$ -Tricarbonyl als Verunreinigung im Endprodukt.

## 2.8. *Metabolische Stabilität von Bombesin-Derivaten*

### 2.8.1. *Stabilität in Plasma*

Für die Stabilitätsuntersuchungen ohne Zugabe von Inhibitoren wurden Plasmaproben von 500  $\mu\text{l}$  mit 25  $\mu\text{l}$  (0.5 – 1.5 MBq) markiertem Peptid bei 37°C inkubiert (Heidolph Inkubator 1000) und zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert. Bei der HPLC-Analyse sollten ungefähr 20 kBq eingespritzt werden. Nach der Inkubation wurden zur Proteinfällung 250  $\mu\text{l}$  jeder Probe entnommen und mit 750  $\mu\text{l}$  Ethanol/ Acetonitril 1:1 (+ 0.1 % TFA) versetzt. Dann wurde während 10 min bei 4°C und mit  $2 \times 10^4$  g zentrifugiert und der Überstand durch einen zuvor mit dem Fällungsreagens befeuchteten Filter (Chromafil Einmalfilter, Typ P-20/25, PVDF, Poren 0.22  $\mu\text{m}$ ) filtriert. 50  $\mu\text{l}$  des Filtrates wurden mittels RP-HPLC analysiert. Als In-Prozess-Kontrollen wurden nach der Inkubation, nach der Proteinfällung und nach der Filtration Proben à 10  $\mu\text{l}$  entnommen und im Gamma-Counter (Packard Canberra, COBRA II) auf Aktivitätsverluste untersucht.

Bei der Verwendung von Enzyminhibitoren wurden jeweils 500  $\mu\text{l}$  Plasma mit den Inhibitoren Phosphoramidon (100  $\mu\text{M}$ ), Prolin-Isoleucin (50 mM), ACE-Inhibitor (100  $\mu\text{M}$ ), Bestatin (100  $\mu\text{M}$ ), 1,10-Phenanthrolin (1 mM), Bacitracin (100  $\mu\text{M}$ ) und Soybean Trypsin Inhibitor (>7000 units / mg; 50  $\mu\text{g}$  / 500  $\mu\text{l}$ ) versetzt und 10 – 15 min bei 37°C inkubiert. Die Konzentrationsangaben der Inhibitoren beziehen sich auf das Endvolumen (500  $\mu\text{l}$ ). Danach wurden 25  $\mu\text{l}$  (0.5 – 1.5 MBq) markiertes Peptid zugegeben und ungefähr eine Plasma-Halbwertszeit des Bombesin-Derivates inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde wie oben beschrieben weitergefahren.

### 2.8.2. *Stabilität in Vollblut*

Blutproben von 1 ml wurden mit 25  $\mu\text{l}$  (0.5 – 1.5 MBq) markiertem Peptid versetzt und bei 37°C unterschiedlich lange inkubiert. Dann wurden zuerst die Zellen mittels Zentrifugation (4 min bei 4°C mit  $2 \times 10^4$  g) abzentrifugiert und danach eine Proteinfällung, wie in Kapitel 2.8.1. beschrieben, durchgeführt. 50 – 100  $\mu\text{l}$  (ca. 20 kBq) des Filtrats wurden mittels RP-HPLC analysiert.

Als Inhibitoren wurden bei der Stabilität in Vollblut nur die Inhibitoren Phosphoramidon (100  $\mu\text{M}$ ), Prolin-Isoleucin (50 mM) und ein ACE-Inhibitor (100  $\mu\text{M}$ ) getestet, wobei sich die Konzentrationsangaben wiederum auf das Endvolumen beziehen (1 ml). Nachdem diese 10 – 15 min in 1 ml Blut bei 37°C inkubiert wurden, wurden 25  $\mu\text{l}$  (0.5 – 1.5 MBq) markiertes Peptid zugegeben und

ungefähr eine Halbwertszeit des Peptids in Blut inkubiert. Die Aufbereitung der Proben für die HPLC-Analyse erfolgte wie in Kapitel 2.8.1. beschrieben.

### *2.8.3. Stabilität in PC-3 Zelllysaten*

Es wurde eine PC-3 Zellsuspension mit 10 Mio Zellen / ml in PBS hergestellt. Diese Suspension wurde während 4 min mittels Ultraschall lysiert (Branson Sonifier 250, Output Control 4, Duty Cycle 40%). Mit Proben à 500 µl (5 Mio Zellen) wurde gleich verfahren wie in Kapitel 2.8.1. beschrieben. Die Stabilität wurde sowohl ohne als auch mit Zugabe von Enzyminhibitoren untersucht. Die zugegebene Aktivität betrug 1.5 MBq (in 25 µl). Die Proben konnten nach der Proteinfällung direkt, ohne Zentrifugation, filtriert und anschliessend mittels HPLC analysiert werden.

### *2.9. Protein Assay*

Nach den Stabilitätsuntersuchungen in den PC-3-Zelllysaten wurden Protein-Assays durchgeführt. Als Referenz wurden 150 µl BSA 2 mg/ml in Verdünnungen von 1.2 µg/ml bis 80 µg/ml mit Dilution Buffer (H<sub>2</sub>O + PBS 14:1) in Duplikaten verwendet. Um innerhalb der Eichgerade zu liegen, wurde die Zellsuspension 1:1, 1:2, 1:5 und 1:10 mit PBS verdünnt. Von jeder Verdünnung wurde im Duplikat 10 µl in eine Micro-Platte pipetiert und 140 µl H<sub>2</sub>O dazugegeben. Alle Löcher wurden mit 150 µl Working Reagent (7.5 ml Reagens A, 7.2 ml Reagens B, 0.3 ml Reagens C) aufgefüllt. Die Platte wurde in Alufolie eingewickelt und während 120 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde 30 min lang auf Raumtemperatur abgekühlt und die Proteinbestimmung mittels Microplate Reader (Model 550 von BIO-RAD) durchgeführt.

### *2.10. Biodistribution und in vivo Metabolismus*

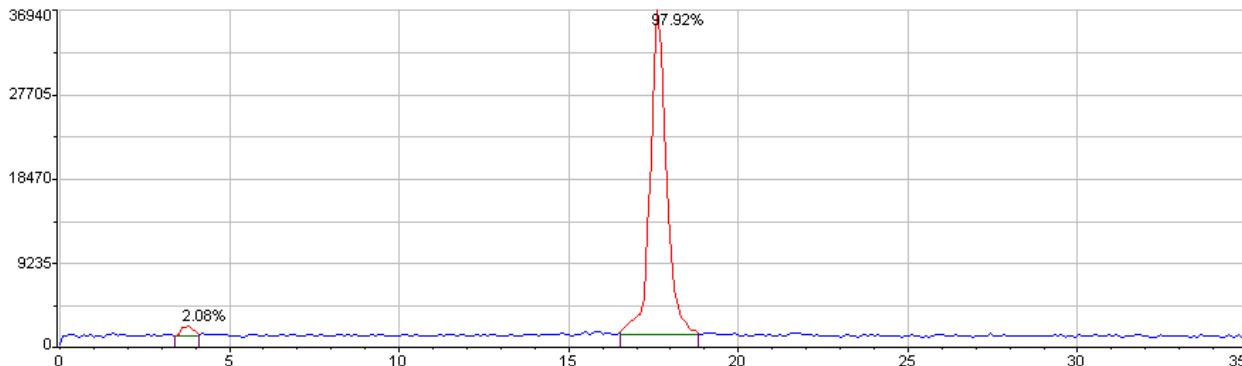
Die Untersuchung der Biodistribution beider Bombesin-Derivate erfolgte in weiblichen NMRI-Mäusen (ca. 8 Wochen). Der Hälfte der Mäuse wurde 45 min vor der Peptid-Zugabe intraperitoneal ein Enzyminhibitor (Phosphoramidon bzw. Enalapril, jeweils 15 mg/kg Körpergewicht) gespritzt. Die radiomarkierten Derivate wurden den Mäusen intravenös in die Schwanzvene appliziert (1-4 MBq / Maus). Nach 30 min wurden die Mäuse getötet, Blut und Urin gesammelt und ihre Organe entnommen (Herz, Lunge, Milz, Nieren, Leber, Magen, Pankreas, Dünndarm, Dickdarm, Gehirn, Muskeln, Knochen). Die Gewebeproben wurden gewogen und deren Radioaktivität mittels  $\gamma$ -Counter bestimmt. Die Aktivität wurde in Prozent der injizierten Dosis pro Gramm Gewebe (% ID/g) angegeben.

Die Blut- und Urinproben wurden zusätzlich mittels HPLC auf Metaboliten untersucht (Kapitel 2.8.2). Der Urin wurde aufgrund des geringen Volumens und der hohen Aktivität vor der Proteinfällung mit PBS verdünnt.

### 3. Resultate

#### 3.1. Radiomarkierung der Bombesin-Derivate

Die Markierung beider Bombesin-Derivate ergab in der Regel eine Ausbeute von mehr als 90%. Bei der Analyse mittels HPLC zeigte sich der Hauptpeak von [ $^{99m}\text{Tc}$ ]-BBS II nach einer Retentionszeit von 17-18 min, bei [ $^{99m}\text{Tc}$ ]-BBS III nach 18-19 min (Abb.3). Nach einer Retentionszeit von 3,5-4,5 min erschien der Peak von Pertechnetat mit einem Anteil von 0-10% an der totalen Aktivität. Freies [ $^{99m}\text{Tc}$ ]-Tricarbonyl wurde nach ungefähr 6 min eluiert, sein Anteil betrug jedoch nur 0-1%.



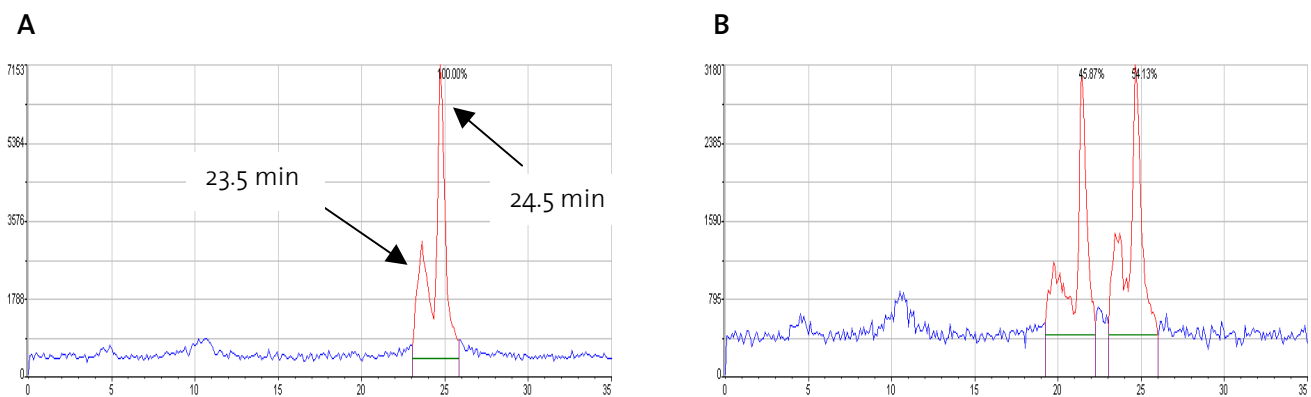
**Abbildung 3:** HPLC-Analyse [ $^{99m}\text{Tc}$ ]-BBS-II.

Im Aktivitäts-Chromatogramm der Markierung von BBS II ist nach 3,5 min der Peak von Pertechnetat ersichtlich, nach 17,5 min derjenige des [ $^{99m}\text{Tc}$ ]-BBS II.

#### 3.2. Stabilität in Plasma

Die metabolische Stabilität von BBS II und BBS III in Plasma wurde als erstes ohne Verwendung von Enzyminhibitoren untersucht, um die Halbwertszeit (HWZ) beider Derivate zu bestimmen. Die Plasmaproben wurden nach verschiedenen Inkubationszeiten mittels HPLC analysiert und das Verhältnis intaktes Peptid / Metabolit durch Integration beider Peaks bestimmt. Bei BBS III betrug dieses Verhältnis nach 10 min schon 1:1 (Abb.4 A / B), das heisst, dass bereits 50% metabolisiert

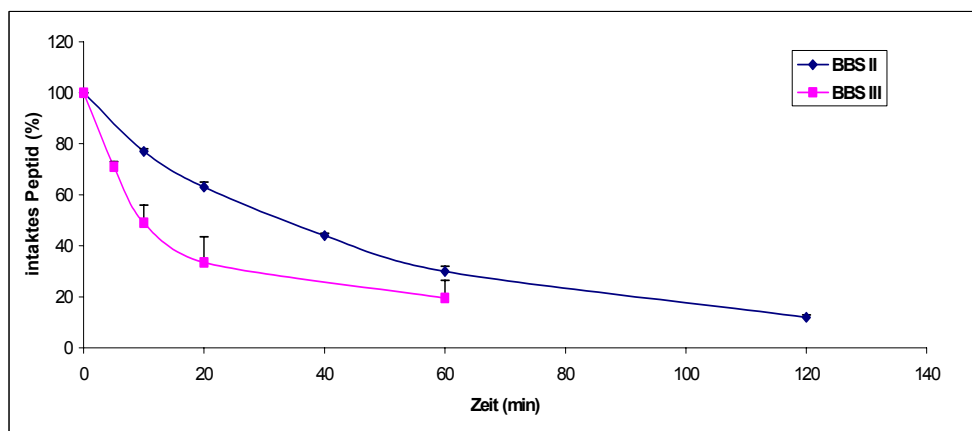
wurde. Zu bemerken ist, dass für die HPLC-Analyse der Metaboliten die Laufmittelzusammensetzung so angepasst wurde, dass diese optimal vom intakten Peptid getrennt wurden (vgl. 2.6.). Diese Optimierung hatte zur Folge, dass zwei Isomere des  $[^{99m}\text{Tc}]$ -BBS, welche während der Radiomarkierung entstehen [4], sichtbar wurden (bei BBS III: 23,5 und 24,5 min). Ein weiterer kleiner Peak zeigte sich unter diesen Bedingungen bei ca. 10 min, wobei es sich wahrscheinlich um eine Verunreinigung handelt.



**Abbildung 4:** Aktivitäts-Chromatogramm von  $[^{99m}\text{Tc}]$ -BBS III im Plasma.

Inkubationszeit bei 37°C: **A)** 0 min, **B)** 10 min; intaktes BBS III erscheint nach einer Retentionszeit von 23,5 und 24,5 min (2 Isomere), der Metabolit nach 20,5 und 21,5 min.

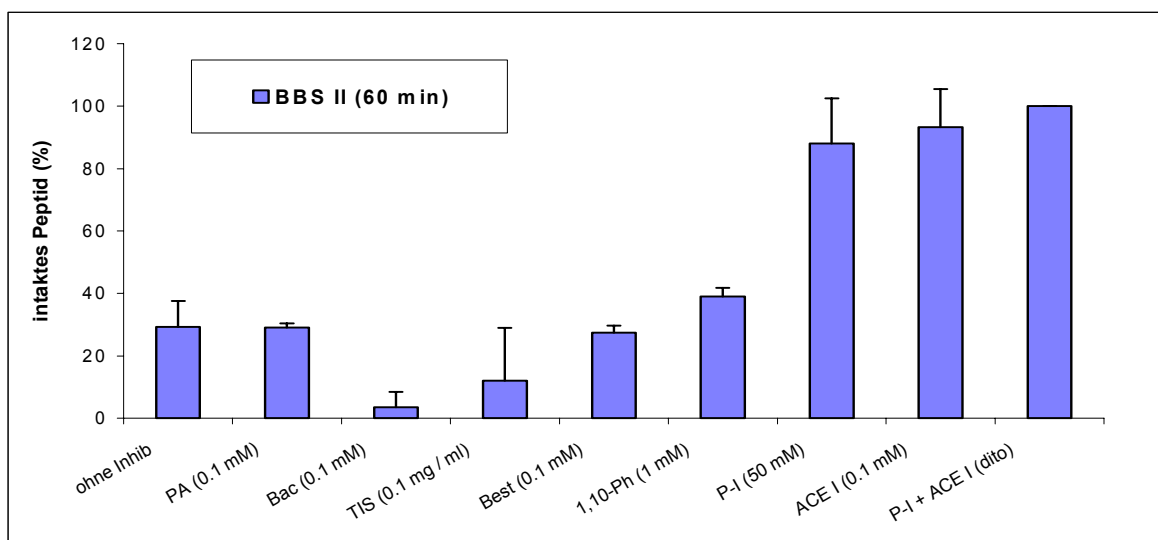
Beide Derivate wurden in Plasma ziemlich rasch metabolisiert, insbesondere BBS III, welches eine Plasma-Halbwertszeit von nur ca. 10 min aufwies und nach 1 h nur noch zu 20% als intaktes Peptid vorlag. BBS II war nach ungefähr 30 min zur Hälfte abgebaut und nach 2 h zu 88% (Abb.5).



**Abbildung 5:** Stabilität von  $[^{99m}\text{Tc}]$ -BBS II und  $[^{99m}\text{Tc}]$ -BBS III in Plasma nach Inkubation bei 37°C.

BBS II weist eine HWZ von ca. 30 min auf, BBS III ist nach ca. 10 min zur Hälfte metabolisiert.

BBS II wurde zusammen mit verschiedenen Enzyminhibitoren im Plasma während 60 min inkubiert (Abb.6). Ohne Zugabe eines Inhibitors lag BBS II nach 60 min nur noch zu 29% als intaktes Peptid vor. Phosphoramidon (100  $\mu$ M), Bacitracin (100  $\mu$ M), Trypsin Inhibitor Soybean (50  $\mu$ g/ 500  $\mu$ l) und Bestatin (100  $\mu$ M) vermochten die Degradation von BBS II nicht zu verhindern. Der positive Einfluss von 1,10-Phenanthrolin (1 mM) auf die Stabilität ist gering und nicht signifikant. Pro-Ile (50 mM) konnte die Stabilität deutlich erhöhen (88% intakt), ebenso der ACE Inhibitor (100  $\mu$ M) (93% intakt). Die Kombination von Pro-Ile und ACE Inhibitor konnte den Anteil an intaktem Peptid sogar auf 100% erhöhen.

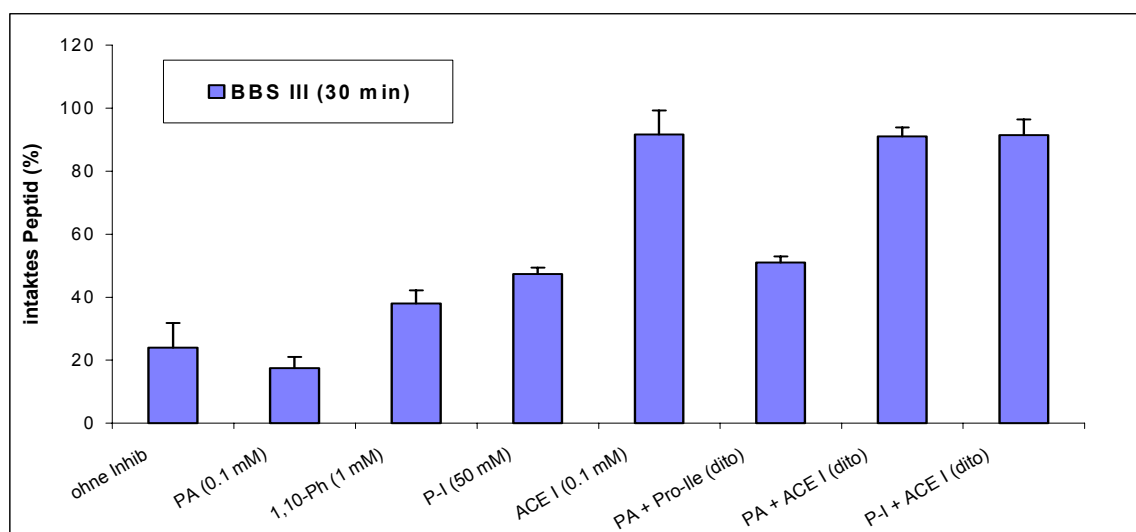


**Abbildung 6:** Inhibition des Abbaus von [ $^{99m}$ Tc]-BBS II in Plasma.

Stabilitätsveränderungen durch Zugabe verschiedener Inhibitoren (Inkubation 60 min) (PA: Phosphoramidon, Bac: Bacitracin, TIS: Trypsin Inhibitor Soybean, Best: Bestatin, 1,10-Ph: 1,10-Phenanthrolin, P-I: Prolin-Isoleucin, ACE I: Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor).

Die Untersuchung der Stabilität von BBS III (Abb.7) mit Inhibitoren lieferte ähnliche Resultate wie diejenige von BBS II. Ohne Inhibitor lag BBS III nach 30 min noch zu 24% als intaktes Peptid vor. Phosphoramidon (100  $\mu$ M) zeigte ebenfalls keine Stabilitätsverbesserung, 1,10-Phenanthrolin (1 mM) nur eine geringe. Pro-Ile (50 mM) konnte die Stabilität auf 47% erhöhen. Wiederum zeigte der ACE Inhibitor (100  $\mu$ M) die grösste Wirkung bezüglich Stabilitätserhöhung (92%). Die Kombination des ACE Inhibitors mit Phosphoramidon und Pro-Ile zeigte jedoch keinen gesteigerten Einfluss.



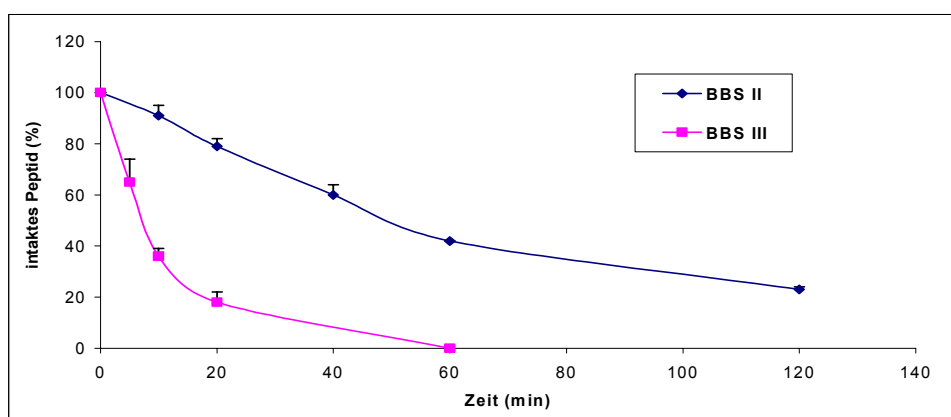


**Abbildung 7:** Inhibition des Abbaus von  $[^{99m}\text{Tc}]$ -BBS III in Plasma.

Stabilitätsveränderungen in Plasma durch Zugabe verschiedener Inhibitoren (Inkubation 30 min) (PA: Phosphoramidon, Bac: Bacitracin, TIS: Trypsin Inhibitor Soybean, Best: Bestatin, 1,10-Ph: 1,10-Phenanthrolin, P-I: Prolin-Isoleucin, ACE I: Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor).

### 3.3. Stabilität in Vollblut

Die Stabilitätsuntersuchungen in Blut erfolgten wiederum zuerst ohne Verwendung von Enzyminhibitoren. Beide Derivate wurden relativ schnell abgebaut, wobei BBS II auch im Blut eine höhere Stabilität aufwies als BBS III. Die Stabilitätsunterschiede von BBS II und BBS III waren im Blut noch deutlicher zu erkennen als im Plasma (Abb.8).



**Abbildung 8:** Stabilität von  $[^{99m}\text{Tc}]$ -BBS II und -BBS III in Vollblut nach Inkubation bei 37°C.

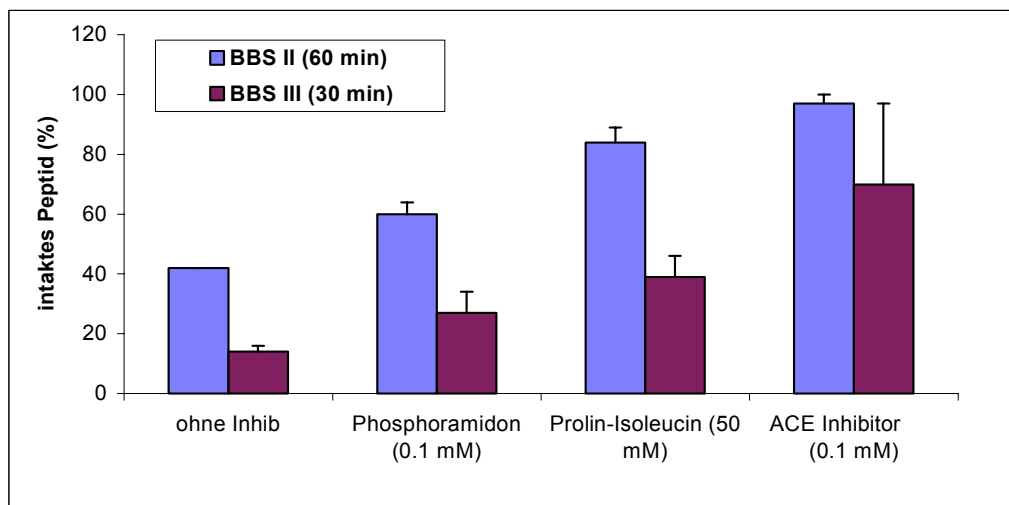
BBS II weist eine HWZ von ca. 48 min auf, BBS III ist nach ungefähr 7 min zur Hälfte metabolisiert.

Während BBS III im Blut schneller metabolisiert wurde als im Plasma, wurde BBS II eher etwas langsamer abgebaut (Tab.3 A / B). BBS II zeigte im Vollblut eine Halbwertszeit von ca. 48 min und lag nach 2 h noch zu 23% als intaktes Peptid vor. BBS III war nach ungefähr 7 min zur Hälfte abgebaut und nach 1 h war kein intaktes Peptid mehr ersichtlich.

**Tabelle 3: Übersichtstabelle: Stabilität von  $[^{99m}\text{Tc}]$ -BBS II und –BBS III in Plasma und Blut.**  
 Prozentualer Anteil an intaktem  $[^{99m}\text{Tc}]$ -BBS II (A) und  $[^{99m}\text{Tc}]$ -BBS III (B) nach verschiedenen Inkubationszeiten in Plasma und Blut.

<b>A</b>			<b>B</b>		
Inkubationszeit [min]	intaktes BBS II [%]		Inkubationszeit [min]	intaktes BBS III [%]	
	Plasma	Blut		Plasma	Blut
0	100	100	0	100	100
10	77	91	5	71	65
20	63	79	10	49	36
40	44	60	20	34	18
60	30	42	60	20	0
120	12	23			

In Vollblut wurden die Inhibitoren Phosphoramidon (100  $\mu\text{M}$ ), Pro-Ile (50 mM) und der ACE Inhibitor (100  $\mu\text{M}$ ) getestet (Abb.9). Der Einfluss dieser Inhibitoren war ähnlich wie im Plasma. Allerdings schien Phosphoramidon im Blut eine Stabilitätserhöhung zu bewirken, was im Plasma nicht der Fall war. Pro-Ile konnte bei BBS II eine Degradation soweit verhindern, dass nach 60 min noch 84% intaktes Peptid vorhanden war (Plasma 88%), bei BBS III war die Wirkung wie im Plasma nach 30 min Inkubation weniger ausgeprägt (39% intakt). Der ACE Inhibitor zeigte auch im Blut die grösste Wirkung, wobei er die Stabilität bei BBS II auf 97% und bei BBS III auf ungefähr 70% erhöhen konnte.

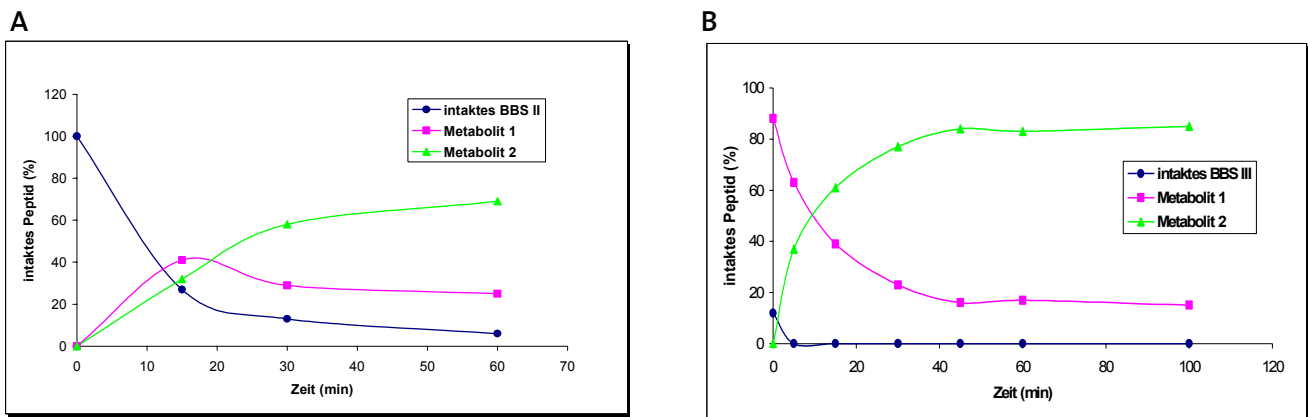


**Abbildung 9:** Inhibition des Abbaus von  $[^{99m}\text{Tc}]$ -BBS II und -BBS III in Vollblut.

Stabilitätsveränderungen in Blut durch Zugabe verschiedener Inhibitoren. BBS II wurde 60 min, BBS III 30 min bei 37°C inkubiert.

### 3.4. Stabilität in PC-3 Zelllysaten

Die Stabilitätsuntersuchungen in PC-3 Zelllysaten zeigten, dass beide Derivate noch viel schneller als im Plasma und Blut metabolisiert wurden. Zusätzlich zum Peak des Metaboliten, der auch im Plasma und Blut erschien (Metabolit 1) tauchte in den Zelllysaten noch ein weiterer Peak auf (Metabolit 2). Dieser zweite Metabolit schien aus dem ersten hervorzugehen, denn der Anteil des zweiten Metaboliten erhöhte sich mit der Abnahme des ersten (Abb.10). Es zeigte sich weiter, dass die Degradation trotz gleich eingesetzter Zellzahl in mehreren Untersuchungen unterschiedlich schnell verlief. Um eine Relation zwischen der Konzentration der Zellen und derjenigen der Proteine machen zu können, wurden deshalb im Anschluss an die Stabilitätsuntersuchungen in PC-3 Zelllysaten Protein Assays durchgeführt. Bei einer Zellsuspension mit etwa 5 Mio Zellen pro 0.5 ml ergaben sich Konzentrationen von 3.2 bis 4.8 mg Protein/ml. Tatsächlich manifestierte sich dieser Unterschied in einer veränderten Degradationsgeschwindigkeit. So war BBS III bei 3.2 mg Protein/ml nach 0 min (gemeint ist keine Inkubation, aber Metabolismus, der während des Mischens stattfand) noch zu 66% intakt, bei 4.8 mg/ml nur noch zu 12%. Trotzdem zeigte sich auch bei verschiedenen Proteinkonzentrationen bei BBS III dasselbe Muster bezüglich Abnahme und Zunahme von intaktem Peptid bzw. Metaboliten.

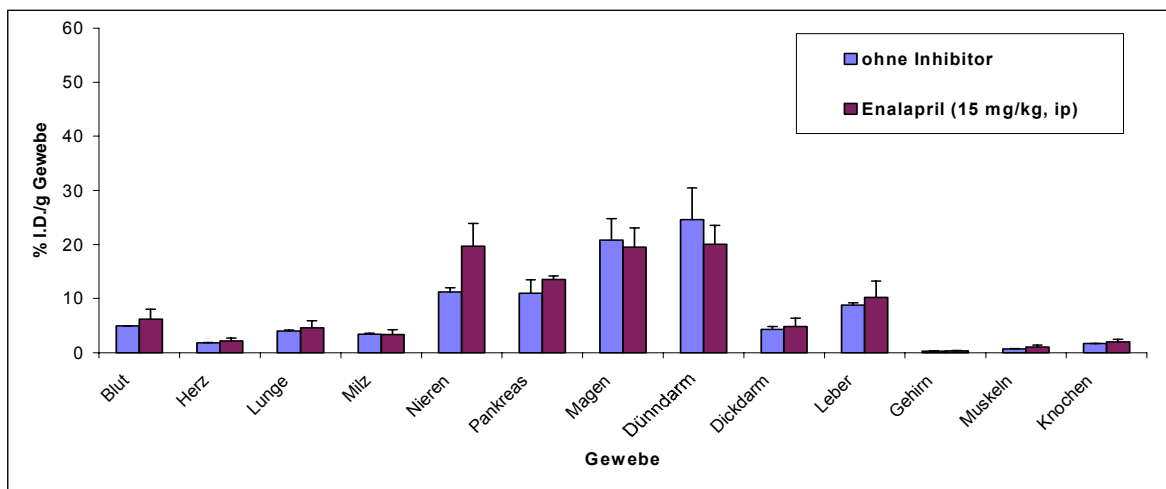


**Abbildung 10:** Stabilität von  $[^{99m}\text{Tc}]$ -BBS II und -BBS III in PC-3 Zelllysaten nach Inkubation bei 37°C. Die Degradation von BBS II (A) und BBS III (B) führt zu den Metaboliten 1 und 2 (Experiment mit 4.8 mg Protein/ml).

Die Inkubation mit Enzyminhibitoren zeigte keine ausgeprägte Stabilitätserhöhung. Nach 30 min Inkubation lag BBS II noch zu 13% intakt vor. Weder Phosphoramidon (100  $\mu\text{M}$ ), Bestatin (100  $\mu\text{M}$ ), Enalapril (100  $\mu\text{M}$ ) noch der ACE Inhibitor (100  $\mu\text{M}$ ) konnte die Stabilität verbessern. Mit Pro-Ile (50 mM) war BBS II nach 30 min noch zu 25% intakt, die grösste Wirkung (40% intakt) zeigte 1,10-Phenanthrolin (1 mM). Bei BBS III konnte mit keinem Inhibitor erreicht werden, dass nach 30 min noch intaktes Peptid vorhanden war. Alle Inhibitoren führten jedoch zu einer verminderten Degradation von Metabolit 1 zu Metabolit 2, wobei wiederum 1,10-Phenanthrolin die stärkste Wirkung zeigte; der Anteil an Metabolit 2 betrug ohne Inhibitor nach 30 min 64% (0% intakt), mit 1,10-Phenanthrolin 27% (0% intakt), wobei die absoluten Prozent-Angaben wieder abhängig von der Proteinkonzentration waren.

### 3.5. Biodistribution und in vivo Metabolismus

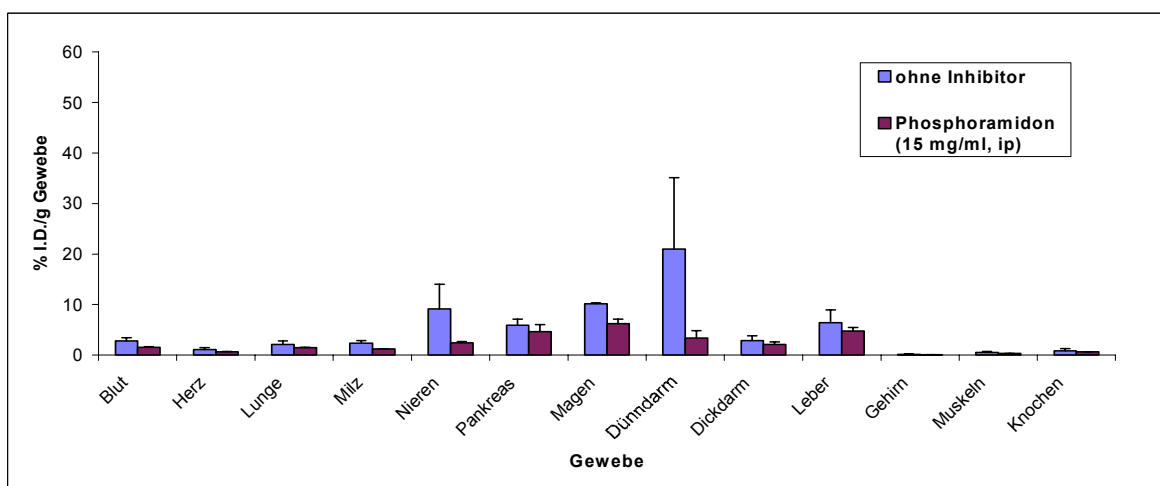
Die Biodistribution beider Bombesin-Derivate in NMRI-Mäusen (ca. 8 Wochen, weiblich) wurde einerseits ohne vorherige Injektion eines Inhibitors und andererseits mit Injektion von Enalapril und Phosphoramidon (15 mg/kg Körpergewicht) untersucht. Die Inhibitoren wurden jeweils 45 min vor der Injektion des markierten Peptids intraperitoneal appliziert. Die Organe wurden 30 min nach der Peptid-Injektion analysiert. Ohne Inhibitoren wiesen bei Injektion von  $[^{99m}\text{Tc}]$ -BBS II Nieren, Pankreas, Magen, Dünndarm und Leber eine erhöhte Aufnahme auf. Die Verwendung von Enalapril zeigte nur in den Nieren eine Anreicherung von Aktivität (Abb.11).



**Abbildung 11: Biodistribution von  $[^{99m}\text{Tc}]$ -BBS II 30 min nach Injektion.**

Die Aufnahme von Radioaktivität in verschiedene Organe ohne Inhibitor (n=2) und mit Enalapril (15 mg/kg i.p., n=2). Nieren, Pankreas, Magen, Dünndarm und Leber zeigten die höchste Aufnahme.

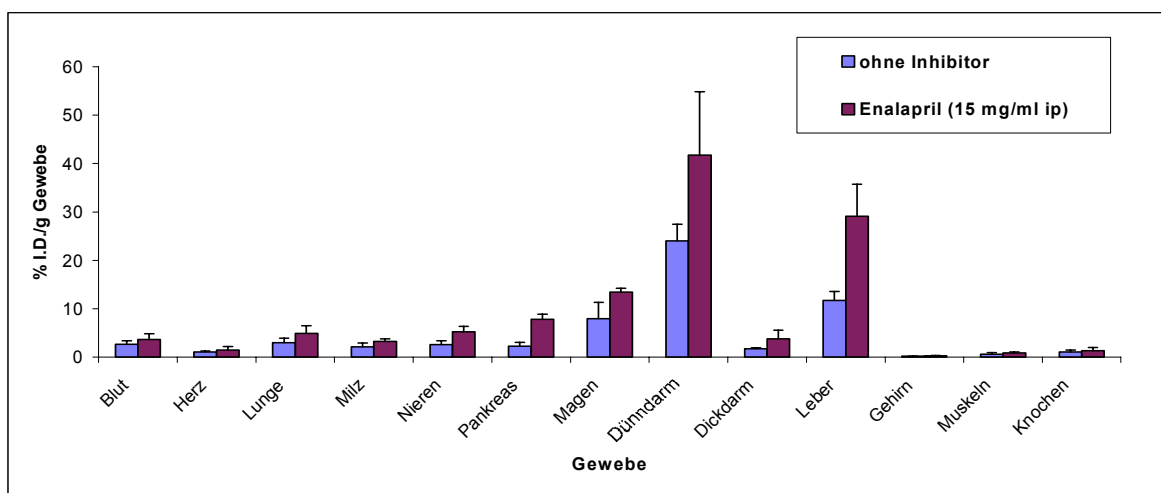
Die Co-Injektion von  $[^{99m}\text{Tc}]$ -BBS II und Phosphoramidon schien die Aufnahme der Radioaktivität in die Organe zu vermindern. Besonders die Aufnahme in die Nieren und den Dünndarm wurde durch diesen Inhibitor gesenkt. Die höchste Aufnahme zeigten die mit Phosphoramidon behandelten Tiere im Pankreas, Magen und in der Leber (Abb. 12).



**Abbildung 12: Biodistribution von  $[^{99m}\text{Tc}]$ -BBS II 30 min nach Injektion.**

Phosphoramidon (15 mg/kg i.p., n=3) senkte die Aufnahme von Aktivität besonders in die Nieren und den Dünndarm, im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=3)

Bei [ $^{99m}\text{Tc}$ ]-BBS III (Abb.13) zeigten Magen, Dünndarm und Leber die grösste Aufnahme. Die Verwendung von Enalapril ergab in allen Organen eine gesteigerte Anreicherung von Aktivität, wobei diese im Pankreas, Dünndarm und in der Leber am deutlichsten war. In einem weiteren Versuch konnte diese erhöhte Anreicherung durch Co-Injektion mit Enalapril allerdings nicht bestätigt werden. BBS III wurde nicht mit Phosphoramidon getestet.



**Abbildung 13: Biodistribution von [ $^{99m}\text{Tc}$ ]-BBS III 30 min nach Injektion.**

Die Aufnahme von Radioaktivität in verschiedene Organe ohne Inhibitor (n=2) und mit Enalapril (15 mg/kg i.p., n=2). Magen, Dünndarm und Leber zeigten die höchste Aufnahme.

Blut und Urin der behandelten Tiere wurden zusätzlich mittels HPLC auf Metaboliten untersucht. Im Blut konnten sowohl bei BBS II als auch BBS III weder intaktes Peptid noch Metaboliten nachgewiesen werden, wahrscheinlich aufgrund zu niedriger Aktivität und des zu hohen Backgrounds. Einzig ein Peak von Pertechnetat bei ca. 4 min war ersichtlich. Im Urin zeigten sich verschiedene Signale, die allerdings kaum reproduzierbar waren. Bei BBS II erschien sowohl mit Phosphoramidon, Enalapril als auch ohne Inhibitor bei 6.5 min ein Peak mit einer Intensität zwischen 50 und 100% und bei 20 min ein Peak, der zwischen 12 und 25% der Aktivität ausmachte. In einem weiteren Versuch wurde zudem ein drittes Signal bei 17 min erhalten, sowohl bei Verwendung von Enalapril als auch ohne Inhibitor. Mit BBS III zeigten sich in der Kontrollgruppe (ohne Inhibitor) im Urin ein Signal bei 9.5 min (33-77%) und eines bei 19.5 min (23-30%). Mit Enalapril wurden bei BBS III die gleichen Signale erhalten, wobei die Aktivität bei 9.5 min 39-99% und bei 19.5 min 1-25% ausmachte. In einem Versuch wurde zusätzlich ein Peak bei 6.8 min beobachtet mit ca. 35% in beiden Gruppen.

## 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen durchgeführt, die es erlauben, den Metabolismus zweier Bombesin-Derivate (BBS II und BBS III) zu studieren. Um den Einfluss verschiedener Peptidasen auf die Stabilität zu untersuchen, wurden mehrere Enzyminhibitoren eingesetzt. Sind die für die Degradation von Bombesin verantwortlichen Enzyme bekannt, fällt es einfacher, gezielt Veränderungen in der Peptidkette vorzunehmen.

Bei der Analyse der intakten Peptide mittels HPLC fiel auf, dass unter gewissen Laufmittel-Zusammensetzungen zwei Peaks erschienen. Dass es sich nicht um einen Metaboliten handelt, konnte beim Neuropeptid Neurotensin, bei welchem auch zwei Signale beobachtet wurden, belegt werden, indem die LINDMO-Assays der getrennten Peaks identische Resultate lieferten. Mittlerweile wurde bewiesen, dass es sich um Isomere handelt, die während der Radiomarkierung durch Konformationsänderung am Histidin entstehen [4]. Bei Bombesin ist allerdings der Peak mit der kürzeren Retentionszeit leicht verbreitert, was etwas ungewöhnlich erscheint.

Bei BBS II erschien nach 0 min Inkubation in Plasma, Blut und auch in PBS bereits ein kleiner Peak mit einem Anteil von ungefähr 10% der eingesetzten Aktivität. Da dieser Peak die gleiche Retentionszeit wie der Metabolit aufwies, und somit nicht von diesem unterschieden werden konnte, wurde dieser Anteil innerhalb einer Messreihe von jeder Probe subtrahiert. Bei diesem Peak könnte es sich um ein Oxidationsprodukt handeln, das durch die Oxidation von Methionin zustande kommt [2]. Dies würde auch erklären, weshalb bei BBS III dieser Peak nicht erscheint, da BBS III kein Methionin besitzt.

Im Plasma zeigte sich, dass beide Derivate sehr schnell metabolisiert wurden, wobei BBS II eine Halbwertszeit von ungefähr 30 min aufwies und BBS III schon nach 10 min zur Hälfte abgebaut war. Bei beiden Derivaten bewirkte der ACE Inhibitor eine ausgeprägte Stabilitätserhöhung, das heißt, nach 60 min (BBS II) bzw. nach 30 min (BBS III) lag noch mehr als 90% intaktes Peptid vor, im Gegensatz zu 20-30% ohne Verwendung eines Inhibitors. Bei BBS II verhalf auch der Inhibitor Prolin-Isoleucin, welcher das Enzym EC 3.4.24.16 hemmt, zu einer erhöhten Stabilität (88%). Die kombinierte Verwendung von Prolin-Isoleucin und dem ACE Inhibitor konnte dem enzymatischen Abbau während 60 min sogar zu 100% entgegenwirken (Abb.6 / 7).

Im Blut ist generell mit einer schnelleren Degradation zu rechnen als im Plasma, da im Vollblut zusätzliche Enzyme, lokalisiert auf der Zelloberfläche von zum Beispiel Erythrozyten, vorhanden sind. Dies bestätigte sich allerdings nur bei BBS III, nicht aber bei BBS II (Tab.3 A / B), was bis jetzt nicht erklärbar ist. Es ist zu beachten, dass es schwierig ist, in solchen Stabilitätsuntersuchungen eine hohe Präzision zu erreichen, was somit zu einer schlechteren Reproduzierbarkeit führt. Plasma und Blut stammten teils von verschiedenen Probanden, wodurch interindividuelle Abweichungen in die Resultate miteinbezogen wurden. Prolin-Isoleucin und der ACE Inhibitor zeigten im Blut die gleiche Wirkung wie im Plasma. Phosphoramidon konnte im Blut die Stabilität von BBS II von 42 auf 60% erhöhen, bei BBS III von 14 auf 27%. Es scheint somit, dass die Neutralendopeptidase EC 3.4.24.11 im

Blut einen grösseren Einfluss auf die Stabilität von Bombesin ausübt als im Plasma, wo Phosphoramidon keinerlei Wirkung zeigte.

Mit Prolin-Isoleucin und dem ACE Inhibitor wurden zwei Inhibitoren gefunden, welche die Stabilität von Bombesin beeinflussen, die bis anhin noch nicht in der Literatur beschrieben sind. Bei der in der Einleitung erwähnten Metallendopeptidase, welche die Bindung  $\text{Gln}^7\text{-Trp}^8$  hydrolysiert (Abb.1), könnte es sich um das Enzym EC 3.4.24.16 handeln, welches durch Prolin-Isoleucin spezifisch gehemmt wird. Eine Modifikation von BBS III ist die Aminosäure D-Phenylalanin, welche unmittelbar vor der Bindung  $\text{Gln}^7\text{-Trp}^8$  lokalisiert ist. Es wäre möglich, dass dadurch diese Bindung für das Enzym schlechter hydrolysierbar ist und Prolin-Isoleucin somit bei BBS III keinen ausgeprägten Einfluss zeigt. Der Abbau von BBS III durch das Enzym ACE würde demnach im Vordergrund stehen. Da keine Literaturhinweise über die durch ACE verursachte Degradation von Bombesin gefunden werden konnte, wurden folgende Überlegungen angestellt, um Hinweise auf die Spaltungsstelle zu bekommen. Werden die Spaltungsstellen von ACE bei verschiedenen biologisch aktiven Peptiden, darunter Substanz P, Neurotensin und  $[\text{Leu}^{15}]\text{Gastrin}$ , betrachtet, fällt auf, dass ACE bei 10 von 13 Peptiden zwei Aminosäuren vom Carboxy-Terminus abspaltet [14]. Diese Peptidbindung scheint von ACE bevorzugt zu werden und dies obwohl die betreffenden Aminosäuren sehr variabel sind. Auf Bombesin übertragen, würde diese Peptidbindung der Bindung  $\text{His}^{12}\text{-Leu}^{13}$  entsprechen, bzw. der modifizierten Form davon, His-Phe, bei BBS III. Die Frage wo die Spaltungsstelle von ACE lokalisiert ist, könnte auch anders angegangen werden. Der entstandene Metabolit könnte entweder durch HPLC oder Massenspektrometrie weiter charakterisiert werden. Nebst dem grossen Aufwand der Synthese von Bombesin-Fragmenten als Referenz, dürfte es allerdings schwierig sein, Unterschiede von nur einer Aminosäure über eine Säule aufzutrennen. Das Problem bei der Massenspektrometrie liegt bei der geringen Peptidkonzentration. Für eine solche Analyse müsste bei den Stabilitätsmessungen mehr Peptid eingesetzt werden, was die Gefahr einer Enzymsättigung mit sich bringt.

Die Bindung  $\text{His}^{12}\text{-Leu}^{13}$  wird auch durch die Neutralendopeptidase EC 3.4.24.11 hydrolysiert [6], welche ihrerseits wie erwähnt durch Phosphoramidon spezifisch gehemmt wird. Die Beobachtung, dass Phosphoramidon alleine zu keiner Stabilitätsverbesserung führte, wäre somit nicht erstaunlich, würde nämlich die betreffende Spaltungsstelle noch durch ein anderes Enzym hydrolysiert. Das Enzym EC 3.4.24.11 scheint allerdings keine so grosse Degradation von Bombesin zu bewirken, da umgekehrt die alleinige Verwendung des ACE Inhibitors die Stabilität schon auf über 90% erhöht. Eine mögliche Erklärung, warum Phosphoramidon im Blut eine grössere Wirkung als im Plasma zeigt, ist, dass die Neutralendopeptidase EC 3.4.24.11 membran-gebunden vorkommt. Sie liegt zwar auch in löslicher Form im Blut vor, aber vielleicht ist ihre Konzentration im Plasma zu klein um einen wesentlichen Einfluss auf die Stabilität auszuüben.

Nebst den zwei genannten Enzymen, der Metallendopeptidase (3.4.24.16?) und der Neutralendopeptidase EC 3.4.24.11, wurde in der Abbildung 1 noch eine Aminopeptidase als inaktivierendes Enzym erwähnt. Die Verwendung von Bestatin als Inhibitor der Aminopeptidase N



hatte keinen erkennbaren Einfluss auf die Degradation, was jedoch nicht weiter erstaunlich ist, weil ACE wie erwähnt eine Hauptrolle spielt und andere Abbauvorgänge dieser untergeordnet sind. Zu untersuchen wäre, ob ein weniger spezifischer Inhibitor, wie beispielsweise Amastatin, welches verschiedene Aminopeptidasen hemmt, zusammen mit dem ACE Inhibitor die Stabilität erhöhen kann, damit nicht irrtümlicherweise der Einfluss der Aminopeptidase unterschätzt wird.

Sind die Peptidbindungen bekannt, welche durch Peptidasen hydrolysiert werden, besteht nun der nächste wichtige Ansatz in der Einführung veränderter Peptidbindungen oder nicht-natürlicher Aminosäuren, um die Geschwindigkeit des enzymatischen Abbaus zu reduzieren. Bei BBS III wurden wie erwähnt schon Modifikationen eingeführt, allerdings nicht mit der Absicht, eine erhöhte Stabilität zu erreichen, sondern zur Identifikation von Rezeptor-Subtypen. Wie gezeigt werden konnte, wurde BBS III trotz dieser Modifikationen schneller abgebaut als BBS II. Bekannt ist, dass D-Phenylalanin und  $\beta$ -Alanin einen inhibierenden Einfluss auf die enzymatische Spaltung haben, Nor-Leucin hingegen eher keinen Einfluss zeigt. Soll nun die Bindung His<sup>12</sup>-Leu<sup>13</sup> stabilisiert werden, muss darauf geachtet werden, dass Histidin erhalten bleibt, da es für die Bindung an den Rezeptor essentiell zu sein scheint. Ebenso scheint ein lipophiler Rest nach Histidin nötig zu sein, wobei dieser nicht unbedingt aus Aminosäuren zusammengesetzt sein muss, jedoch ungefähr so gross wie Leucin-Methionin sein sollte. Die eingeführten Stabilisierungen dürfen also gleichzeitig zu keinem relevanten Verlust der Bindungsaffinität führen. Bei der Suche nach neuen Derivaten scheint es sinnvoll zu sein, zuerst nur eine Modifikation pro Derivat vorzunehmen, dessen Stabilität ohne als auch mit Inhibitoren zu testen und eine Beurteilung der Auswirkung dieser Modifikation zu machen. Nach dem Plasma und noch vor der Niere und der Leber ist der Tumor das wichtigste Gewebe. Die Zellkultur stellt ein ideales Modell für den Tumor dar. Um die Stabilität in solchen Zellen zu untersuchen, wurde eine Suspension von lysierten PC-3 Zellen verwendet. Aspekte wie Rezeptor-Binding, Internalisierung und Aktivitätsfreisetzung der Zellen wurden somit absichtlich ausser acht gelassen. Beide Bombesin-Derivate wurden durch die in den Zellen vorhandenen Enzyme sehr schnell metabolisiert und zwar in einem höheren Ausmass als im Plasma und Blut. Von den eingesetzten Inhibitoren konnte einzig 1,10-Phenanthrolin, welches verschiedene Metallendopeptidasen der Gruppe EC 3.4.24 hemmt, die Stabilität erhöhen, wenn auch nicht sehr ausgeprägt; bei BBS II konnte damit der Anteil an intaktem Peptid nach 30 min von 13 auf 40% erhöht werden, bei BBS III inhibierte 1,10-Phenanthrolin lediglich den Abbau von Metabolit 1 zum Metaboliten 2. Dessen Anteil betrug nach 30 min 27%, ohne Inhibitor 64%. Mit Pro-Ile, dem Inhibitor der Metallendopeptidase EC 3.4.24.16 konnte zwar auch eine Stabilitätsverbesserung erreicht werden, die aber unterhalb derjenigen von 1,10-Phenanthrolin lag. Das bedeutet, dass noch mindestens eine weitere Metallendopeptidase als das Enzym EC 3.4.24.16 am Abbau beteiligt ist. Der ACE Inhibitor war in den Zelllysaten wirkungslos, was damit begründet werden kann, dass ACE in den Zellen im Gegensatz zum Plasma und Blut kaum vorkommt und deshalb nicht am Abbau von Bombesin

beteiligt ist. Interessant war, dass verschiedene Proteinkonzentrationen der Zellen (bestimmt durch Protein-Assays) einen in der Geschwindigkeit veränderten Metabolismus zur Folge hatten.

Werden nun die Stabilität des Peptids im Plasma und in Tumor-Zellen einander gegenüber gestellt, lässt sich folgendes sagen. Ein zu schneller Metabolismus im Plasma führt zu einer verminderten Aufnahme des Peptids in den Tumor, was die nuklearmedizinische Diagnostik erschwert und eine Radionuklidtherapie gar nicht erst möglich macht. Findet ein zu schneller Metabolismus in den Zellen statt, was nur relevant ist, wenn aufgrund genügend hoher Stabilität im Plasma der Tumor überhaupt erreicht werden kann, kann dies eine gesteigerte Elimination der Radioaktivität aus den Tumorzellen zur Folge haben. Für die Diagnostik mag die erniedrigte Stabilität in den Tumorzellen ein kleineres Problem sein, wenn es gelingt, rechtzeitig Bildaufnahmen zu machen. Für die Therapie wirkt sich das allerdings sehr negativ aus, weil dadurch im Tumor eine zu kleine Konzentration des Radiopharmakons erreicht wird. Ausserdem bleibt bei zu geringer Stabilität in den Zellen das Problem der Radiotoxizität der Metaboliten im gesunden Gewebe, vor allem Niere und Leber. Allgemein lässt sich sagen, dass die biologische Halbwertszeit des Radiopharmakons im Tumor ungefähr drei bis vier Halbwertszeiten des Radionuklids betragen sollte, was im Falle des Beta-Strahlers  $^{188}\text{Re}$  (HWZ ca. 17 h), einem Radionuklid für die Therapie, ungefähr zwei Tage wären.

Gibt es zu grosse Unterschiede zwischen dem Metabolismus im Plasma und demjenigen in den Zellen und kann durch die Einführung veränderter Peptidbindungen oder nicht-natürlicher Aminosäuren keine ausreichende Stabilitätsverbesserung in den Zellen erzielt werden, kann auch ein anderer Ansatz in Betracht gezogen werden. Können die Eigenschaften der in den Zellen entstehenden Metaboliten so verändert werden, dass diese die Zellen nicht mehr verlassen können, braucht es abgesehen von den Stabilisierungen, die nötig sind, um das Peptid im Plasma zu stabilisieren, keine weiteren Stabilisierungen mehr. Dies kann beispielsweise dadurch erreicht werden, dass der Radioligand durch den enzymatischen Abbau in seiner Ladung verändert wird. Eine Möglichkeit bestünde in der Einführung eines Substituenten am  $\tau$ -Stickstoff des Ligand-Histidin.

Die Biodistribution beider Bombesin-Derivate zeigte eine Anreicherung von Aktivität im Gastrointestinaltrakt und im Pankreas, welche beide über GRP-Rezeptoren verfügen. Daneben wiesen auch Niere und Leber eine erhöhte Aufnahme auf. Bei BBS II vermochte die Co-Injektion von Enalapril die Anreicherung nur in den Nieren erhöhen und Phosphoramidon zeigte in keinem Organ eine gesteigerte Aufnahme. Enalapril erhöhte bei BBS III die Aufnahme von Aktivität in sämtlichen untersuchten Organen, wobei diese im Pankreas, Dünndarm und in der Leber am deutlichsten war. Ein weiterer Versuch mit BBS III und Enalapril zeigte allerdings im Dünndarm und in der Leber eine verminderte Aufnahme. Ein möglicher Grund dieser unterschiedlichen Resultate mag darin liegen, dass Enalapril nach der intraperitonealen Applikation ungleich absorbiert wurde. Im Gehirn, wo sich auch GRP-Rezeptoren befinden, fand keine Anreicherung statt, da die markierten Peptide die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren können. Die Möglichkeit der Co-Injektion eines Enzyminhibitors könnte auch beim Patienten in Erwägung gezogen werden, um so die Stabilität in Plasma zu erhöhen und

eine bessere Aufnahme in den Tumor zu gewährleisten. Während für diagnostische Zwecke der Enzyminhibitor keine unmittelbar toxische Wirkung besitzen dürfte, müsste für eine Therapie (mehrfache Applikation) eine Langzeit-Toxizität ausgeschlossen werden können.

Schlussfolgerung: Der schnellen Degradation der beiden Bombesin-Derivate BBS II und BBS III im Plasma und Blut wirkten der Inhibitor Prolin-Isoleucin und der ACE-Inhibitor effizient entgegen. Somit haben das Angiotensin Converting Enzyme (ACE) und die Metallendopeptidase EC 3.4.24.16 die grösste Bedeutung für den *in vitro* Metabolismus von Bombesin, zwei Enzyme, die bisher für Bombesin unbekannt waren. ACE hydrolysiert vermutlich die Bindung His<sup>12</sup>-Leu<sup>13</sup>, während Gln<sup>7</sup>-Trp<sup>8</sup> wahrscheinlich die Spaltungsstelle der Metallendopeptidase EC 3.4.24.16 ist. Die Stabilisierung dieser Bindungen steht nun im Vordergrund bei der Synthese weiterer Bombesin-Derivate.

## 5. Danksagung

Ich möchte bei allen, die mich während meiner Diplomarbeit unterstützt haben, herzlich bedanken. Herrn Prof. Dr. Schubiger danke ich, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, die Diplomarbeit am Zentrum für Radiopharmazie, PSI Villigen absolvieren zu dürfen. Herzlich bedanken möchte ich mich bei Dr. Peter Bläuenstein und Dr. Elisa Garcia-Garayoa für die sehr gute Betreuung und ihre Unterstützung, wann immer Probleme auftauchten. Alain Blanc danke ich speziell für seine unermüdliche Geduld, mir bei Fragen rund um die Gebiete Radiomarkierung und HPLC zur Seite zu stehen und Margaretha Lutz für ihre Mithilfe und die vielen Aufmunterungen.

Dem ganzen Team danke ich für die sehr angenehme Zusammenarbeit und die gute Atmosphäre im Labor.

## 6. Literatur

- [1] R. Alberto, R. Schibli, R. Egli, P. A. Schubiger (1998) *J. Am. Chem. Soc.* 120, 7987-7988, „A novel organometallic aqua complex of technetium for the labelling of biomolecules: synthesis of  $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$  from  $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$  in aqueous solution and its reaction with a bifunctional ligand“
- [2] W. Beck and G. Jung (1994) *Letters in Peptide Science*, 1, 31-37, „Convenient reduction of S-oxides in synthetic peptides, lipopeptides and peptide libraries“
- [3] P. Bläuenstein, E. Garcia Garayoa, A. Blanc, R. LaBella, P. A. Schubiger, K. Iterbeke, D. Tourwé (2001) *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* 44, Suppl.1, „Application of the organometallic Technetium and Rhenium Tricarbonyl complex on Neuropeptide labeling“
- [4] A. Blanc, E. Garcia Garayoa, M. Lutz, J. Stahel, R. Schibli, P. Bläuenstein (2002) *Nucl. Med.* 41, A3, „Technetium-99m and Rhenium-188 a pair of diagnostic and therapeutic radionuclides: Experience with labelled neurotensin analogues“
- [5] O. C. Boerman, W. J. G. Oyen and F. H. M. Corstens (2000) *Sem Nucl. Med.* 30, 195-208, „Radio-labeled receptor-binding peptides: A new class of radiopharmaceuticals“
- [6] T. P. Davis, S. Crowell, J. Taylor, D. L. Clark, D. Coy, J. Staley, T. W. Moody (1991) *Peptides*, Vol. 13 pp. 401-407, „Metabolic Stability and Tumor Inhibition of Bombesin/GRP Receptor Antagonists“
- [7] A. Egli, R. Alberto, L. Tannahill, R. Schibli, U. Abram, A. Schaffland, R. Waibel, D. Tourwé, L. Jeannin, K. Iterbeke and P. A. Schubiger (1999) *J. Nucl. Med.* 40, 1913-1917, „Organometallic  $^{99m}\text{Tc}$ -Aquaion Labels Peptide to an Unprecedented High Specific Activity“
- [8] P. Kitabgi, F. De Nadai, C. Rovère, J.-N. Bidard (1992) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 668: 30-42, „Biosynthesis, Maturation, Release and Degradation of Neurotensin and Neuromedin N“
- [9] R. Markwalder and J. C. Reubi (1999) *Cancer Res.* 59, 1152-1159, „Gastrin-releasing peptide receptors in the human prostate: relation to neoplastic transformation“
- [10] R. Mentlein, P. Dahms (1994) *J. Neurochem.* 62, 1, 27-36, „Endopeptidases 24.16 and 24.15 Are Responsible for the Degradation of Somatostatin, Neutotensin, and Other Neuropeptides by Cultivated Rat Cortical Astrocytes“
- [11] R. Mentlein, R. Lucius (1997) *Brain Research Protocols* 1, 237-246, „Methods for the investigation of neuropeptide catabolism and stability in vitro“
- [12] J. C. Reubi, R. Maurer, K. von Werder, J. Torhorst, J. G. Klijn, S. W. Lamberts (1987) *Cancer Res.* 47, 551-558, „Somatostatin receptors in human endocrine tumor“
- [13] R. Schibli, R. La Bella, R. Alberto et al. (2000) *Bioconj. Chem.* 11, 345-351, „Influence of the denticity of ligand systems on the in vitro and in vivo behavior of  $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$ -tricarbonyl complexes: a hint for the future functionalisazion of biomolecules“
- [14] R. A. Skidgel (2001) [www.uic.edu/classes/pcol/pcol425/restricted/skidgel/peptidases.pdf](http://www.uic.edu/classes/pcol/pcol425/restricted/skidgel/peptidases.pdf), „Peptides and peptidases as targets for therapeutic intervention“
- [15] L.-H. Wang, S. A. Mantey, J.-T. Lin, H. Frucht, R. T. Jensen (1993) *Biochimica et Biophysica Acta*, 1175, 232-242, „Ligand binding, internalization, degradation and regulation by guanine nucleotides of bombesin receptor subtypes: a comparative study“
- [16] W.-Y. Zhu, B. Göke, J. A. Williams (1991) *Am. J. Physiol.* 261, G57-G64, „Binding, internalization, and processing of bombesin by rat pancreatic acini“