



Doctoral Thesis

Novel radiolabelled Exendin-4 derivatives for the targeting of β -cells

Author(s):

Jodal, Andreas

Publication Date:

2015

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010485488> →

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](#).

Diss. ETH N° 22618

Novel radiolabelled Exendin-4 derivatives for the targeting of β -cells

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES OF ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

ANDREAS JODAL

Pharmacist, Albert-Ludwigs Universität Freiburg

born on 31.12.1985

citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Roger Schibli, examiner
Dr. Martin Béhé, co-examiner
Prof. Dr. Simon Ametamey, co-examiner

2015

The Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) receptor is specifically expressed on pancreatic β -cells. Upon activation it elicits various effects on the cells such as increased insulin biosynthesis and secretion. **Radiolabelled derivatives of exendin-4**, an agonist on the GLP-1 receptor, are currently being developed for the **diagnosis and treatment of β -cell related diseases**. A lot of progress has been made recently, however, some of the properties, such as the susceptibility to oxidation and high kidney uptake, are not ideal for the application as a drug. First of all, we wanted to elucidate how the **modification of various amino acids** influences the biological properties of exendin-4.

On one hand, the peptide contains a methionine, which is susceptible to oxidation potentially altering the biological properties with an unfavourable effect. In addition, this might complicate the development of an approved drug, as they are required to have a **consistent pharmaceutical quality and stability**. In order to evaluate the influence of such an oxidation we:

- a) Compared the both the oxidised and non-oxidised peptide.
- b) Substituted the methionine with norleucine.

Substitution of the methionine did not have an influence on the binding to the receptor in our transfected model CHL cell line expressing the GLP-1 receptor. The *in vivo* uptake was as high as for the reference compound. Even though the oxidation of the methionine did not have a significant effect on the biological properties, these results suggest that **methionine should be replaced with norleucine** in all future peptides as it increases the pharmaceutical stability of the tracer.

On the other hand, we assessed **new possible modification sites** in addition to the established C-terminal lysine in the hope of finding additional modifiable positions, potentially allowing the conjugation of multiple functional groups. We tested the possibility of conjugating at:

- a) The resident lysines in position 12 and 27.
- b) The C- and N-terminal tails of the peptide.

Modifications at the lysines in position 12 and 40, and to a lesser extent, position 27 showed the most suitable properties and uptake in GLP-1R positive tissue was similar. The modification on the N-terminal end of the peptide, however, strongly affected the properties of the peptide. Binding was not impaired, but the peptide was not internalised at all, in contrast to the other tested peptides (20-33%). As a consequence, the uptake in GLP-1R positive organs was strongly reduced. The accumulation of the N-terminally modified tracer was up to 37 times lower compared to the lead compound. This leads to the conclusion that a C-terminal lysine as well as the lysine 12 and possibly lysine 27 are most suitable for attaching multiple functionalities. Additional chelators, for instance, would allow to **increase the specific activity** of the tracer, which is important for the determination of β -cell mass where the receptor is not overexpressed. Conjugation of both a chelator and a fluorescent moiety would result in a **dual imaging probe**, allowing both preoperative whole body imaging as well as intraoperative laparoscopic imaging using the same tracer.

The high non-GLP-1 receptor specific **accumulation of the tracer in the kidneys is probably the most critical challenge**. This uptake causes several issues. For imaging purposes it causes a high background hampering the visualisation of the pancreas. As a therapeutic probe it

exposes the patient to a very high radiation burden, potentially damaging the kidneys. In the second part, we investigated three different approaches to reduce the kidney accumulation:

- a) We tested **various cleavable linker** sequences placed between the peptide and the radiolabelled chelator. This linker is supposed to be cleaved at the brush border membrane of the kidney, liberating the chelator and allowing the small moiety to be easily excreted into the urine.
- b) A **poly-His-Glu tag** was attached to the peptide, increasing its negative charge, which has been shown to affect the kidney uptake of multiple compounds.
- c) An **albumin-binding moiety** was attached to the peptide, causing it to non-covalently bind to serum albumin *in vivo*, extending its blood circulation time. This approach has been shown to reduce the accumulation in the kidneys and increase the tumours uptake of a multitude of different probes.

Even though all of the cleavable linkers were digested *in vitro* they failed to show a reduction in the kidney uptake compared to the lead compound *in vivo*. Similarly, the poly-His-Glu tag did not show any effect on the biological properties of the peptide *in vitro* or *in vivo*.

In contrast, attaching the **albumin-binding moiety massively reduced the kidney uptake** from 179 to 22 %iA/g after 24 h while having a similar uptake in receptor positive tissue as the lead compound. This allowed a clear SPECT/CT visualisation of the pancreas and lungs in mice for first time. This albumin-binding tracer is a huge improvement to previous probes and might **allow routine diagnostics** in patients and potentially even **radionuclide therapy of GLP-1R positive tumours**.

Der Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) Rezeptor wird spezifisch auf den β -Zellen des Pankreas exprimiert. Die Aktivierung des Rezeptors führt zu einer Vielzahl von Effekten, wie zum Beispiel der Zunahme der Insulin Synthese und erhöhter Insulinsekretion. Substanzen, die an den GLP-1 Rezeptor binden, wie zum Beispiel **radiomarkierte Exendin-4 Derivate**, können sowohl **diagnostisch wie auch therapeutisch beim Vorliegen von pathologisch veränderten β -Zellen** eingesetzt werden.

Obwohl die Entwicklung inzwischen weit fortgeschritten ist, verhindern einige Eigenschaften des Tracers, wie die mangelnde oxidative Stabilität und hohe Nierenaufnahme, den routinemäßigen Einsatz in der Klinik.

Als erstes wurde untersucht, wie **Modifikationen an verschiedenen Aminosäuren** die biologischen Eigenschaften von Exendin-4 beeinflussen. Einerseits enthält Exendin-4 das leicht oxidierbare Methionin, was die biologischen Eigenschaften beeinflussen kann. Zusätzlich kann diese hohe Oxidationsempfindlichkeit die Zulassung von Exendin-4-Analoga als Arzneimittel erschweren, da es dafür eine **gleichbleibende pharmazeutische Qualität und Stabilität** vorweisen muss. Um den Einfluss der Oxidation abzuschätzen haben wir:

- a) Sowohl das oxidierte als auch nicht oxidierte Peptid miteinander verglichen.
- b) Das Methionin durch Norleucin ersetzt.

Die Verwendung von Norleucin hatte keinen negativen Einfluss auf die Eigenschaften des Tracers. Die *in vivo* Organaufnahme war genauso hoch wie für die Ursprungssubstanz. Obwohl die Oxidation des Methionins die biologischen Eigenschaften nicht signifikant beeinflusst haben, sollte in zukünftigen Exendin-4 Derivaten das **Methionin durch Norleucin ersetzt werden**, da es die pharmazeutische Stabilität des Tracers verbessert.

Andererseits wurden **mehrere potentielle Modifikationspunkte evaluiert** und mit der bereits bekannten C-terminalen Position verglichen in der Hoffnung zusätzliche Aminosäuren zu finden, die man zur Konjugation von funktionellen Gruppen benutzen kann. Folgende Positionen wurden getestet:

- a) Die natürlichen Lysine in den Positionen 12 und 27.
- b) Sowohl das N-terminale als auch das C-terminale Ende des Peptides.

Die Modifikationen an den Lysinen in Position 12 und 40, sowie im geringeren Maße in der Position 27, haben ähnliche *in vitro* Eigenschaften und eine ähnliche Aufnahme in GLP-1R positive Organe *in vivo*. Die N-terminale Modifikation dagegen hat einen Einfluss auf die Funktion des Peptides. Obwohl die Bindung zum Rezeptor nicht vermindert wurde, internalisierte der Tracer praktisch nicht im Gegensatz zu den anderen Peptiden, die eine Internalisierung zwischen 20 und 33% vorwiesen. Das hatte zur Folge, dass die Aufnahme in die GLP-1R positiven Organe stark vermindert war, im Vergleich zur Leitsubstanz wurde bis zu 37 Mal weniger Tracer aufgenommen. Das lässt den Schluss zu, dass sowohl das C-terminale Lysin als auch die natürliche Lysine in den Positionen 12 und 27 zur Konjugation von verschiedenen Funktionalitäten genutzt werden können. Dies kann potentiell dazu genutzt werden um mehrere Chelatoren anzufügen **um die spezifische Aktivität zu erhöhen**, was für die Diagnose in Gewebe, dass den Rezeptor nicht überexprimiert, nötig ist. Die Konjugation eines Chelators und eines Fluoreszenzfarbstoffs würde zu einem Peptid führen, das man zur **dualen Bildgebung** verwenden kann. Das würde sowohl eine Ganzkörper-Aufnahme vor der Operation

mittels PET/SPECT, als auch die laparoskopische Bildgebung während der Operation mit dem gleichen Tracer ermöglichen.

Die nicht GLP-1R abhängige, **hohe Nierenanreicherung der Exendin-4 basierten Radiotracer ist vermutlich der am stärksten limitierende Faktor** für den klinischen Einsatz. Diese Akkumulation führt zu einer Reihe von Problemen. Bei der Bildgebung führt es zu einem hohen Hintergrund, was die Darstellung des Pankreas erschwert. Beim therapeutischen Einsatz führt es zu einer hohen Strahlenbelastung was potentiell zur Schädigung der Nieren führen kann. Im zweiten Teil dieser Dissertation wurden drei verschiedene Ansätze untersucht, welche die Nierenaufnahme vermindern sollten.

- a) Wir haben **verschiedene spaltbare Linker** untersucht, die zwischen den radiomarkierten Chelator und dem Peptid eingebaut wurden. Diese Linker sollten dann an der Bürstensaummembran der Niere gespalten werden, was die Abspaltung des Chelators zur Folge haben würde. Die kleinen Fragmente könnten dann leichter mit dem Urin ausgeschieden werden.
- b) Ein **Poly-His-Glu Tag** wurde an das Peptid angefügt, was die negative Ladung des Peptides erhöht hat. Es wurde an verschiedenen Verbindungen gezeigt das eine Änderung der Ladung die Nierenaufnahme beeinflussen kann.
- c) Um die Blutzirkulationszeit zu erhöhen wurde eine an **Albumin bindende Funktionalität** an das Peptid konjugiert. Mit diesem Ansatz wurde bei mehreren Molekülen die Nierenakkumulation vermindert, während gleichzeitig die Tumoraufnahme erhöht wurde.

Obwohl alle spaltbaren Linker *in vitro* von dem Enzym zerteilt wurden, war die Nierenaufnahme *in vivo* im Vergleich zur Referenzsubstanz nicht verändert. Die Konjugation des Poly-His-Glu Tags hatte ebenso wenig einen Einfluss auf die *in vitro* und *in vivo* Eigenschaften des Tracers.

Im Gegensatz zu diesen beiden Peptiden **hatte die Albumin bindende Funktionalität eine massive Verringerung der Aktivität in der Niere zur Folge**. Nach 24 h waren anstatt 179 nur noch 22 %iA/g in den Nieren, während die Aufnahme in den GLP-1R positiven Organen ähnlich wie die der Leitsubstanz war. Das ermöglichte zum ersten Mal eine Visualisierung des Pankreas und der Lungen in Mäusen mittels SPECT/CT. Der Tracer mit der Albumin bindenden Funktionalität ist eine starke Verbesserung zu bisher getesteten Peptiden und könnte zum ersten Mal **den routinemäßigen Einsatz zur Diagnose** in Patienten ermöglichen und möglicherweise zur **Behandlung von GLP-1R positiven Tumoren** eingesetzt werden.