ETH zürich

ETH Library

Untersuchung der Stabilität von markierten Neuropeptiden in vitro, in Plasma und in Organhomogenaten

Master Thesis

Author(s):
Holzer, Barbara

Publication date:
2001

Permanent link:
https://doi.org/https://doi.org/10.3929/ethz-a-004261144

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

Untersuchung der Stabilität von markierten Neuropeptiden *in vitro*, in Plasma und in Organhomogenaten

Diplomarbeit

von

Barbara Holzer

Bürgerin von Moosseedorf

Referent: Prof. Dr. P. A. Schubiger

Korreferent: Dr. P. Bläuenstein

05. März 01 bis 27. Juli 01

Inhaltsverzeichnis

Aufgabenstellung 2
Zusammenfassung 3
1. Einleitung 4
2. Materialien und Methoden 7
2.1 Chemikalien 7
2.2 HPLC 8
2.3 Synthese der Neurotensin-Derivate und Radiomarkierung 8
2.4 Validierung der Markierung 9
2.5 Plasmastabilität von Neurotensin-Derivaten (metabolische Stabilität) 9
2.5.1 Validierung der Methode für die Messung der Plasmastabilität 9
2.5.2 Plasmastabilität 9
2.6 Zellkulturen 10
2.7 Binding-Assay nach LINDMO 10
2.8 Protein-Assay 11
2.9 Aktivitätsfreisetzung nach Internalisierung 11
2.10 Form der internalisierten und der freigesetzten Aktivität 12
3. Resultate 13
3.1 Radiomarkierung der Neurotensin-Derivate 13
3.2 Validierung der Markierung 13
3.3 Plasmastabilität von Neurotensinderivaten 14
3.3.1 Validierung der Methode für die Messung der Plasmastabilität 14
3.3.2 Plasmastabilität 16
3.4 Protein-Assay 17
3.5 Aktivitätsfreisetzung 17
4. Diskussion 20
5. Danksagung 26
6. Literatur 27

Aufgabenstellung

Stabilitätsuntersuchungen von Neuropeptiden umfassen metabolische und chemische Analysen unter verschiedenen Bedingungen. Während der metabolische Abbau der Peptide ausschliesslich zu Fragmenten führt, welche mittels HPLC-Analyse feststellbar sind, können chemische Veränderungen zu Formen führen, die nicht zwingend eine andere Retentionszeit aufweisen (z.B. Oxidation eines Amins oder Racemisierung). Die Überprüfung der Bindungsaffinität ist deshalb eine wichtige zusätzliche Kontrolle. Als erstes sollten folglich extreme Bedingungen bezüglich pH-Wert und Temperatur, wie sie während der Markierung und den Analysen auftreten können, *in vitro* untersucht und ihren potentiellen Einfluss auf die Struktur der Peptide analysiert werden.

Bei den bisher durchgeführten Plasmastabilitätstests zeigten sich Probleme bei der Reproduzierbarkeit. Das Problem liegt unter anderem darin, dass grosse Mengen der Peptide die Enzyme blockieren, so dass nur markierte Peptide und keine inaktiven Träger eingesetzt werden können. Dazu bleibt nur die HPLC mit Aktivitätsdetektor als Analysenmethode übrig, wobei ein weiteres Problem darin besteht, dass keine ganzen Zellen, Zellbestandteile oder Proteine eingespritzt werden können, ohne die HPLC-Säule zu blockieren. Es ist also wichtig, die Abtrennung der markierten Peptide und Metaboliten so durchzuführen, dass dadurch keine Veränderung verursacht wird. Es gilt deshalb, die Proteinfällung zu optimieren, eine geeignete Methode zur Messung der Plasmahalbwertszeit zu validieren und die metabolische Stabilität einiger interessanter Neuropeptid-Analoge zu untersuchen.

Die Stabilität eines markierten Peptids im Blut muss möglichst hoch sein, damit eine Anreicherung im Tumor stattfinden kann. Der therapeutische Nutzen ist umso grösser, je länger das Peptid im Tumor bleibt. Die Untersuchung der Stabilität internalisierter Peptide und der Externalisierung von Peptid oder Metabolit liefert entscheidende Resultate für die Evaluation verschiedener Analoga.

Es gilt deshalb die Aktivitätsfreisetzung aus den Zellen und die Stabilität der Peptide in den Zellen und der Umgebung zu untersuchen.

Zusammenfassung

Neuropeptide haben in der Nuklearmedizin ein vermehrtes Interesse zur Diagnose und Radiotherapie von Neuropeptidrezeptoren exprimierenden Tumoren geweckt. Die schnelle Degradierung des Neurotensins (NT) schränkt seine klinische Verwendung in der Krebsdiagnose und –therapie ein. Neue NT-Analoge wurden deshalb synthetisiert, wobei Änderungen in der bioaktiven NT (8-13)–Sequenz gemacht wurden mit dem Ziel, das Molekül gegen enzymatischen Abbau zu stabilisieren. Die Analoge NT-VIII, NT-X, NT-XI und NT-XII wurden in dieser Arbeit *in vitro* bezüglich ihrer Stabilität charakterisiert. Das native NT-II wurde dabei als Vergleich verwendet.

Die neuen Analoge wurden mit $^{99m}Tc(CO)_3$ markiert. Ihre metabolische Stabilität wurde in menschlichem Plasma und in HT-29 Zellen, welche das Tumormodell darstellen, analysiert und mit HPLC verfolgt. Die chemische Stabilität wurde unter verschiedenen Bedingungen untersucht, ebenfalls mit HPLC verfolgt und zusätzlich mit LINDMO überprüft. Resultate wurden folgende erhalten: NT-VIII, NT-XI und NT-XII zeigten eine hohe Plasmastabilität, das Peptid blieb nach 24 h Inkubation bei 37 °C zu über 85 % intakt. NT-X zeigte eine geringere Stabilität mit einer Plasmahalbwertszeit von 4.4 h. NT-II degradierte mit einer Plasmahalbwertszeit von 6.25 min. Die Bindungs-Assays mittels LINDMO wurden nach Inkubation unter verschiedenen Bedingungen, wie sie während Markierung und Stabilitätstests auftreten können, durchgeführt. Dabei entstand nach einer Inkubationszeit von 18 h bei 37 °C in PBS im HPLC-Chromatogramm ein neuer Peak und im LINDMO-Assay kam es zu einer Reduktion der totalen gebundenen Aktivität. Saurer pH-Wert und gleichzeitige Erhöhung der Temperatur auf 75 °C während 1 h bewirkten eine leichte Verschlechterung der Bindungsaffinität. Grundsätzlich zeigten die LINDMO-Assays jedoch eine hohe Affinität für NT mit Kd-Werten von unter 0.65 nM und eine sehr tiefe nicht-spezifische Bindung. Nach Interaktion mit NTR1 wurden die NT-Analoge gemäss früheren Arbeiten [6] schnell internalisiert (mehr als 90 % nach 1 h bei 37 °C). Nach einer Vorinkubation von 1 h konnte deshalb die Aktivitätsfreisetzung gemessen werden. Dabei zeigten alle NT-Analoge nach Internalisation in HT-29 Zellen eine Degradierung des Peptids und eine Freisetzung sowohl der Metaboliten wie auch des intakten Peptids. NT-XII zeigte die langsamste Aktivitätsfreisetzung mit weniger als 50 % nach 24 h, während NT-X nach 24 h praktisch zu 100 % freigesetzt wurde.

Schlussfolgerung: Die Stabilisierungen beeinträchtigen die Rezeptoraffinität nicht, erhöhen aber die Plasmahalbwertszeit. Die verlangsamte Aktivitätsfreisetzung aus den Zellen bei NT-XII machen dieses Analogon zu einem möglichen Kandidaten für die Radionuklidtherapie.

1. Einleitung

Die Suche nach neuen tumorlokalisierenden Radiopharmazeutika ist ein wichtiger Aspekt in der Krebsforschung. Während langer Zeit war das Hauptaugenmerk in der Forschung der Nuklearmedizin auf monoklonale Antikörper (MAK) gerichtet. Seit der Entdeckung der Peptid-Rezeptoren und der Synthese von kleinen, biologisch aktiven Peptiden, welche viel robuster sind als MAK, wurde erkannt, dass diese Moleküle neue, vielversprechende Ansätze in der Radiopharmazie sein könnten [3].

Viele menschliche Tumorgewebe überexprimieren verschiedene Typen von hochaffinen Rezeptoren wie Neuropeptid-Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche, welche als Targets für die *in vivo* Diagnose und die Therapie ausgenützt werden können. In diesem Zusammenhang haben in den letzten Jahren Regulatorpeptide an Interesse zugenommen. Die erfolgreiche Anwendung von radioaktiv markierten Somatostatin- und vasoaktiven intestinalen Peptid-Analogen für die Bildgebung einiger rezeptorexprimierender Tumore haben die Entwicklung anderer Regulatorpeptide wie Bombesin, Substanz P, Cholecystokinin oder Neurotensin als potentielle Tumordiagnostika und –therapeutika vorangetrieben. Neurotensin (NT) und seine Analoge könnten gute Kandidaten für die Diagnose und die Therapie von Pankreas-, Kolon- und Prostatakarzinomen sein.

Neurotensin ($pGlu^1$-Leu^2-Tyr^3-Glu^4-Asn^5-Lys^6-Pro^7-Arg^8-Arg^9-Pro^{10}-Tyr^{11}-Ile^{12}-Leu^{13}) ist ein Tridecapeptid, das ursprünglich aus Rinderhypothalamus isoliert wurde, später aus dem Intestinaltrakt. Man hat dieses Peptid in vielen Organismen des Tierreiches gefunden, was seine Bedeutung in wichtigen Prozessen im Körper verdeutlicht. In Säugern ist Neurotensin (NT) sowohl im zentralen Nervensystem, wie auch im peripheren Gewebe, vor allem im Gastrointestinaltrakt, lokalisiert. Zentralnervös spielt Neurotensin die Rolle eines Neurotransmitters oder Neuromodulators für die Dopamin-Transmission und der Hormonsekretion. Es zeigt auch hypothermische und analgesische Effekte im Gehirn. In der Peripherie bewirkt NT als lokales Hormon eine parakrine und endokrine Modulation des Verdauungstraktes und des Herz-Kreislaufsystems der Säuger und wirkt als Wachstumsfaktor in vielen normalen Zellen, wie auch in Krebszellen [7, 16]. Die Sequenz Arg^8-Arg^9-Pro^{10}-Tyr^{11}-Ile^{12}-Leu^{13} (NT 8-13) ist die kürzeste Sequenz des nativen Peptids, die eine Rezeptorbindung ausbilden kann [7]. Einige der pharmakologischen Effekte von NT resultieren in der spezifischen Interaktion des Peptids mit den Rezeptoren der Zelloberfläche. Für NT wurden verschiedene Binding-Sites charakterisiert: Der NT1-Rezeptor (NTR1) hat eine hohe Affinität und eine tiefe Kapazität, während der NT2-Rezeptor

(NTR2) eine tiefe Affinität und eine hohe Kapazität zeigt. Beide Rezeptor-Subtypen gehören zu der Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR). NTR3 ist ein neuer Typ des NT-Rezeptors und ist identisch mit gp95/Sortilin, einem 100 kDa–Protein mit einer einzigen transmembranen Domäne. Alle drei Rezeptor-Subtypen erkennen die gleiche C-terminale 8–13 Sequenz und zeigen ähnliche Struktur-Wirkungsbeziehungen gegenüber NT [7, 16].

Der Gebrauch von kleinen Peptiden wie dem NT bietet viele Vorteile. Sie sind einfach herzustellen und zu modifizieren, da sie harte chemische Bedingungen für Modifikation und Markierung ertragen. Die meisten sind entweder endogene bioaktive Peptide oder ihre Analoge, welche nicht antigene Eigenschaften, jedoch eine hohe Affinität für den Rezeptor aufweisen. Ihre Plasmaclearance ist sehr schnell und oft wird eine hohe Konzentration im Zielgewebe erreicht. Ihr Hauptnachteil jedoch ist der schnelle Abbau im Plasma durch endogene Proteasen und Peptidasen [11, 14]. Viele proteolytische Enzyme zerschneiden intaktes NT: Angiotensin Converting Enzyme (EC 3.4.15.1) hydrolysiert die Tyr^{11}-Ile^{12} Bindung, Metallendopeptidase EC 3.4.24.15 die Arg^{8}-Arg^{9} Bindung, Metallendopeptidase EC 3.4.24.16 die Pro^{10}-Tyr^{11} Bindung, und Metallendopeptidase EC 3.4.24.11 schneidet sowohl die Pro^{10}-Tyr^{11}, wie auch die Tyr^{11}-Ile^{12} Bindung (Abb.1).

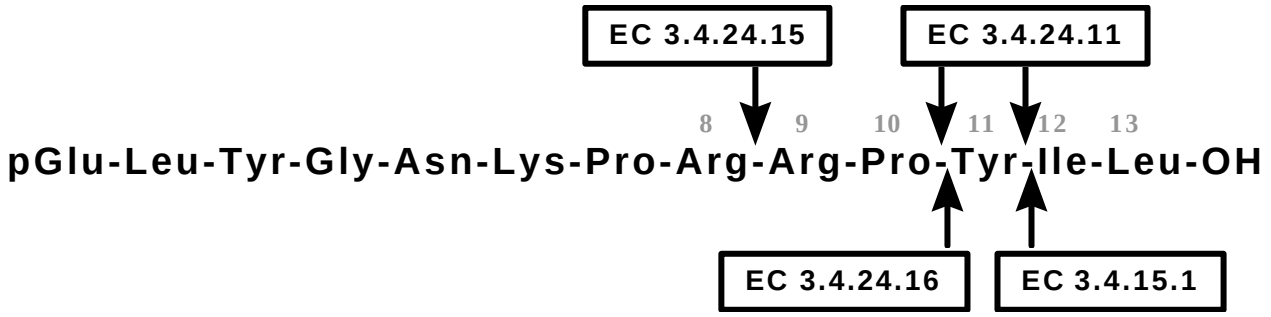


Abbildung 1. Mechanismus der NT-Inaktivierung durch Peptidasen: *Die Pfeile zeigen die Bindungen, welche durch die Enzyme gespalten werden [5, 10]*

Alle diese Enzyme sind mögliche Kandidaten für die physiologische Inaktivierung des NT und seiner Derivate. Deshalb ist es wichtig, neue Analoge mit stabilisierten Bindungen gegenüber der metabolischen Deaktivierung zu synthetisieren, welche aber ihre Bindungsaffinität nicht verlieren. Die Stabilisierung sollte erstens zu einer Verlängerung der Halbwertszeit des Peptids führen und die Chancen, den Tumor zu erreichen und an dessen Rezeptoren zu binden, erhöhen. Zweitens sollten

die nach Internalisierung des Peptids in den Tumor entstehenden Metaboliten in ihrer Eliminationsgeschwindigkeit verlangsamt werden. Dadurch würden sie zu einem grossen Potential in der Tumortherapie.

In unseren Untersuchungen wurden die Peptid-Analoge mit dem Gamma-Strahler ^{99m}Tc(I)-Carbonyl markiert. Das fac-[^{99m}Tc$(OH_2)_3(CO)_3]^+$ wird durch direkte Carbonylierung des Pertechnetats in Gegenwart von Natriumborhydrid als Reduktionsmittel erhalten. Das Tc(I)-Carbonyl kann sehr leicht an die Peptide gekoppelt werden unter Verwendung von Histidin oder seinen Derivaten als Liganden. Das (NαHis)Ac als tridentater Ligand hat sich dabei als speziell geeignet erwiesen, da es die drei Wassermoleküle ersetzen kann und eine Carboxylatgruppe frei hat für die Bindung an den N-Terminus des Peptids [6, 13, 14]. Für therapeutische Anwendungen würden dann die Beta-Strahler ^{186}Re oder ^{188}Re verwendet, da sie ähnliche chemische Eigenschaften wie das ^{99m}Tc aufweisen. Sie zerfallen mit einer Halbwertszeit (HWZ) von ca. 90 Std. (^{186}Re) respektive ca. 17 Std. (^{188}Re) (HWZ ^{99m}Tc: ca. 6 h).

Tabelle 1. Bezeichnung und Sequenz der ausgewählten NT-Derivate: *Während bei NT-II im Vergleich zum nativen Neurotensin erst der Ligand anstelle von Pro eingeführt wurde, sind die anderen Derivate an den Positionen 8 und 12 (NT-X nur in Position 12) stabilisiert.*

Analoges	**Sequenz**
NT 7 - 13	Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu
NT - II	(NαHis)Ac-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu
NT - VIII	(NαHis)Ac-(N-CH_3)-Arg-Lys-Pro-Tyr-Tle-Leu
NT - X	(NαHis)Ac-Arg-Arg-Pro-Tyr-Tle-Leu
NT - XI	(NαHis)Ac-Lys-(CH_2NH)-Arg-Pro-Tyr-Tle-Leu
NT - XII	(NαHis)Ac-Arg-(N-CH_3)-Arg-Pro-Tyr-Tle-Leu

In dieser Arbeit ging es darum, einige der interessanten NT-Analoge mit den Bezeichnungen NT-VIII, NT-X, NT-XI und NT-XII bezüglich ihrer Stabilität zu charakterisieren, wobei NT-II als Referenz verwendet wurde (Tab.1). Diese neuen Peptidsequenzen enthalten Veränderungen in der Grundstruktur des kleinsten bindenden Fragments des NT [NT(8–13)], die nötig waren, um die

metabolische Stabilität zu erhöhen, die Bindungsaffinität aber nicht zu verkleinern. Zur Stabilisierung wurde bei den vier Derivaten NT-VIII, NT-X, NT-XI und NT-XII in Position 12 das Ile durch Tle ersetzt. Zusätzlich wurde NT-VIII an Position 8 durch eine Methylgruppe stabilisiert, NT-XI durch eine reduzierte Amidbindung an Position 8-9 und NT-XII ebenfalls durch eine Methylgruppe, jedoch an Position 9. Arg^8 (in NT-XI) oder Arg^9 (in NT-VIII) wurde ersetzt durch ein Lys, um die Peptidsynthese zu vereinfachen. Um einen möglichst hohen Therapieeffekt zu erreichen, müssen die eingeführten Stabilisierungen zu einer möglichst langen Verweildauer der Aktivität in den Tumorzelle führen. Die oben genannten Analoge wurden deshalb im Folgenden in Bezug auf ihre Plasmahalbwertszeit, ihre Aktivitätsfreisetzung nach Internalisierung in human colon adenocarcinoma HT-29 Zellen und die Form der freigesetzten Aktivität verglichen. Zusammen mit anderen, früher durchgeführten Studien sollte dies eine Beurteilung über die weitere Verwendbarkeit dieser Analoge zulassen.

2. Materialien und Methoden

2.1 Chemikalien

Die Neurotensinderivate wurden durch Festphasen-Synthese auf einem „Merrifield Harz“ unter Verwendung eines halbautomatischen Labortec Peptide Synthesizer SP640B von Prof. Dr. D. Tourwé in Brüssel synthetisiert. Kulturmedium McCoy’s 5A-GLUTAMAX ITM, Foetales Rinder Serum (FBS), antibiotische/antimykotische Lösung (PSF), Trypsin/EDTA, Rinder Serum Albumin (BSA) und Soybean Trypsin Inhibitor wurden von GIBCO BRL Life Technologies AG (Basel, Schweiz) erhalten, das Working Reagent (für den Protein-Assay) von SOCOCHIM SA (Lausanne, Schweiz). Neurotensin-Fragment 8–13, HEPES, Chymostatin und Bacitracin wurden von Sigma (Buchs, Schweiz), EGTA (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-Tetraessigsäure), Trifluoressigsäure (TFA), Na_2CO_3, $NaBH_4$, $C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$ (Kalium-Natriumtartrat Tetrahydrat) und Glycine von Fluka (Buchs, Schweiz), Acetonitril und Methanol von Macherey-Nagel (Oensingen, Schweiz) erhalten. Wasser für Injektionszwecke BRAUN stammte von Braun Medical (Emmenbrücke, Schweiz). HCl, NaCl, $MgCl_2$, NaOH, KCl, Na_2HPO_4 und $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ wurden bei Merck (Dietikon, Schweiz), das Ionentauscherharz AG 1-X4 (Analytical grade anion exchange Resin) bei BIO-RAD (Rheinach, Schweiz) eingekauft. $Na[^{99m}TcO_4]$ wurde aus einem Mallinckrodt $^{99}Mo/^{99m}Tc$–Generator (Petten, Niederlande) unter Verwendung von 0.9 % physiologischer

Kochsalzlösung eluiert. Die humane Zellinie HT-29 wurde von der „European Collection of Cell Culture“ (ECACC, Salisbury, England) erhalten.

2.2 HPLC

Die HPLC bestand aus einem Aktivitätsdetektor Radiomatic Model 500TR FLO-ONE™ (PACKARD Canberra), einer VARIAN ProStar 230 Solvent Delivery-Pumpe, einem VARIAN Model 330 Photodiode Array Detector, und einer Reversed-Phase Säule (Nucleosil 100-5 C18 Säule, 5 µm, 250 mm Länge, 4,6 mm Durchmesser von Macherey-Nagel, Oensingen, Schweiz). Im zweiten Teil der Arbeit wurde zudem mit einem VARIAN ProStar Model 410 Autosampler gearbeitet. Solvens A war Acetonitril, Solvens B 0.1 % Trifluoressigsäure in Wasser und Solvent C Methanol. Ein Gradient mit Solvens A und B lief folgendermassen: 0–5 min 100 % B, 5 bis 35 min B: 100 % → 5 %, A: 0 % → 95 %. Das Pertechnetat wurde nach ca. 4 min eluiert, der freie Tc-Tricarbonyl Komplex nach ca. 8 min und das Peptid nach ca. 21 min, in Abhängigkeit von der Struktur.

2.3 Synthese der Neurotensin-Derivate und Radiomarkierung

Die Herstellung des ^{99m}Tc-Tricarbonylkomplexes $[^{99m}Tc(OH_2)_3(CO)_3]^+$ (Carbonylierung) wurde gemäss früheren Beschreibungen durchgeführt [1, 6], mit einigen Änderungen. Eine Mischung von 4 mg Natriumcarbonat wasserfrei (0.04 mmol), 5.5 mg Natriumborhydrid (0.15 mmol) und 15 mg Kalium-Natriumtartrat Tetrahydrat (0.07 mmol) wurde in ein Reacti-Vial eingewogen und während 20 Minuten mit 1 atm CO (1-2 ml/sec) gespült. 1–1.5 ml $[^{99m}TcO_4]^-$ Generatoreluat in physiologischer Kochsalzlösung 0.9 % (ungefähr 0.1–40 GBq) wurden hinzugefügt und die Mischung während 30 Minuten bei 75 °C erhitzt und anschliessend in einem zuvor in Eis gekühlten Bleibehälter abgekühlt. Die Lösung wurde mit 300 µl einer Mischung von 1 M Phosphatpuffer (pH 7.4) (Na_2HPO_4, 11.59 g + $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 2.53 g in 100 ml) und 1 M HCl 1:2 auf einen pH-Wert von 7 eingestellt. Für das Postlabelling wurden 15 µl einer 1 mM Lösung des gewünschten NT-Derivates zu 500 µl der neutralisierten ^{99m}Tc(I)-Tricarbonyl-Lösung gegeben und während 60 min bei 75 °C erhitzt. Die Kontrollen sowohl der Carbonylierung, wie auch der Markierung erfolgte mittels Reversed-Phase HPLC. Acetonitril/Wasser gemischt mit 0.1 % Trifluoressigsäure wurde als Eluent verwendet. Unvollständiger Austausch der Luft gegen Kohlenmonoxid führte zu Pertechnetat, heizen von weniger als 1h zu Technetium tricarbonyl

$[^{99m}Tc(OH_2)_3(CO)_3]^+$ als Verunreinigungen im Endprodukt. Bei einem zu hohen Anteil an Pertechnetat wurde das markierte Peptid mittels einer Ionentauschersäule gereinigt.

2.4 Validierung der Markierung

Um die Einflüsse von Bedingungen, wie sie während der Markierung vorkommen können, zu testen (Risikoanalyse für die Anwendung bei Patienten), wurden mit verschiedenen Neurotensin-Analogen Untersuchungen der Stabilität durchgeführt, indem bewusst von der Markierungsvorschrift abgewichen wurde. Als äussere Bedingungen wurden verschiedene pH-Werte, verschiedene Medien sowie verschiedene Inkubationszeiten und Inkubationstemperaturen getestet. Es wurde dazu in den meisten Fällen das [^{99m}Tc]NT-XI verwendet und nur in einem Fall (verschiedene Inkubationszeiten) das [^{99m}Tc]NT-II, um auch zwischen den Derivaten vergleichen zu können.

2.5 Plasmastabilität von Neurotensin-Derivaten (metabolische Stabilität)

2.5.1 Validierung der Methode für die Messung der Plasmastabilität

Vorgängig an die Messung der Plasmastabilität musste die Methode dazu validiert werden. Dazu wurde in einem ersten Schritt die Menge an benötigtem Fällungsreagens von Auge und mittels Protein-Assay bestimmt. Als Fällungsreagenzien wurden Ethanol 70 %, Acetonitril und eine 1:1-Mischung dieser beiden Reagenzien getestet. In einem nächsten Schritt wurde der Einfluss der Plasmaqualität auf die Messung bestimmt. Dazu wurde einerseits frisches Vollblut unmittelbar nach Erhalt zentrifugiert und das daraus gewonnene Plasma sofort und nach unterschiedlich langer Aufbewahrungszeit bei -20 °C zur Messung der Plasmahalbwertszeit von NT-X verwendet. Andererseits wurde Vollblut bei -20 °C aufbewahrt und das Plasma erst unmittelbar vor Beginn der Inkubation für die Plasmahalbwertszeitmessung abzentrifugiert. Zur Kontrolle wurden markierte NT-Derivate mit dem Fällungsreagens gemischt, erhöhten Temperaturen ausgesetzt (Simulation von Fehlern) und mittels LINDMO-Assay und HPLC analysiert.

2.5.2 Plasmastabilität

Die metabolische Stabilität verschiedener NT-Analoge wurde *in vitro* in menschlichem Plasma bestimmt. Frisches Vollblut von gesunden Probanden wurde sofort nach Erhalt bei 4 °C und

20'000 g während 20 min zentrifugiert (BECKMAN GS-15R-Zentrifuge). Nicht verwendetes Plasma wurde eingefroren und konnte danach während mindestens 8 Tagen verwendet werden. Verfahren wurde gemäss früheren Beschreibungen [12], mit einigen Änderungen: Zur Stabilitätsmessung wurden Plasmaproben à 250 µl mit ca. 20 µl markiertem Peptid (1-12 MBq) unterschiedlich lange inkubiert. Die Aktivität sollte bei anschliessender HPLC-Analyse einen Wert von ungefähr 60 kBq aufweisen. Nach der Inkubation wurden die Plasmaproteine mittels Zugabe von 750 µl einer Mischung aus Acetonitril/Ethanol 70 % 1:1 gefällt und während 10 min bei 4 °C und 20'000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen zuvor mit dem Fällungsreagens befeuchteten Filter (Chromafil Einmalfilter, Typ P-20/25, PVDF, Poren 0.22 µm) filtriert. 100 µl des Filtrates wurden mittels RP-HPLC analysiert. Als In-Prozess-Kontrollen wurden nach der Inkubation, nach der Fällung und nach der Filtration Proben à 10 µl gezogen und mittels Gamma-Counter (PACKARD Canberra, COBRA II) auf Verluste an Aktivität überprüft.

2.6 Zellkulturen

Die HT-29 Zellen wurden in McCoy's 5A-GLUTAMAX I™, ergänzt mit 10 % FBS, und 1 % PSF (100 I.U./ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 0.25 µg/ml Amphotericin B) in einem feuchten Inkubator unter einer Atmosphäre mit 7.5 % CO_2 in Zellflaschen von 75 cm^2 kultiviert und wöchentlich umgesetzt [16]. Dabei wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA 0.25 % während 5 min bei 37 °C vom Boden abgelöst, in 10 %-igem Medium suspendiert und 1:6 bis 1:8 verdünnt.

2.7 Binding-Assay nach LINDMO

Für die Kd-Bestimmung nach LINDMO wurden am Tag vor dem eigentlichen Assay die konfluenten Zellen derart verdünnt, dass eine Suspension mit 2 Mio Zellen/ml entstand. Diese Suspension wurde so in eine 24er-Lochplatte (4 x 6) plattiert, dass die erste Kolonne eine Zellkonzentration von 2 Mio Zellen/ml, die Kolonnen 2–6 jeweils eine mit Kulturmedium (McCoy's 10 % FBS) hergestellte 50 %-ige Verdünnung der vorangehenden Kolonne enthielten. Die Zellen wurden über Nacht im Inkubator fixiert, danach zweimal mit eiskaltem Binding Buffer (50 mM Hepes, 125 mM NaCl, 7.5 mM KCl, 5.5 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, 5 g/l BSA, 2 mg/l Chymostatin, 100 mg/l Soybean Trypsin Inhibitor, 50 mg/l Bacitracin) oder eiskaltem Kulturmedium ohne Zusätze gewaschen. Zu allen Zellen wurden 200 µl des [^{99m}Tc]NT-Derivats

(20 kBq/Loch) gegeben. Um die Totale Bindung (TB) zu bestimmen, wurden zur Hälfte der Löcher zusätzlich 200 µl Binding Buffer gegeben, zur anderen Hälfte zusätzlich 200 µl 2 µM inaktives Peptid (NT 8–13), zur Bestimmung der nicht-spezifischen Bindung (NSB). Die Platte wurde während 120 min bei 37 °C und unter leichtem Schütteln (100 rpm) inkubiert. Die Zellen wurden anschliessend zweimal mit PBS 1x [aus PBS 5x (0.5 M NaCl (29.22 g/l), 0.21 M $NaHPO_4$ (29.81 g/l), 0.055 M $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ (7.59 g/l) durch 1:5-Verdünnung] gewaschen und mit 500 µl 1N NaOH/Loch versetzt. Die Platte wurde abermals bei 37 °C und unter Schütteln (300 rpm) während einiger Minuten inkubiert und die Zellen zerstört. Die Proben wurden gesammelt, die Löcher mit erneut 500 µl 1 N NaOH gewaschen und diese Suspension zusammen mit den Proben im Gamma-Counter gemessen. [10].

2.8 Protein-Assay

Im Anschluss an den Bindungs-Assay nach LINDMO wurde der Protein-Assay durchgeführt. Die Suspensionen des Bindungs-Assays wurden dazu mit Wasser 1:14 verdünnt und von jeder Probe 150 µl in eine Micro-Platte pippetiert. Als Referenz wurden 150 µl BSA 2 mg/ml in Verdünnungen von 1.2 µg/ml bis 80 µg/ml mit Dilution Buffer (H_2O + NaOH 14:1) in Duplikaten verwendet. Alle Löcher wurden mit 150 µl Working Reagent (7.5 ml Reagens A, 7.2 ml Reagens B, 0.3 ml Reagens C) aufgefüllt und die Platte, in Alufolie eingewickelt, während 120 min bei 37 °C inkubiert. Nach Abkühlen bei Raumtemperatur während 30 min wurde der Protein-Assay mittels Microplate Reader (Model 550 von BIO-RAD) durchgeführt.

2.9 Aktivitätsfreisetzung nach Internalisierung

Die Aktivitätsfreisetzung aus HT-29 Zellen nach Internalisation wurde gemäss früheren Beschreibungen [7] durchgeführt, mit kleinen Änderungen: Konfluente HT-29 Zellen wurden am Tag vor dem eigentlichen Assay in 10 % McCoy's Medium suspendiert und in Proben zu 5 ml in Petrischalen (∅ 5 cm) pipetiert. Am Tag des Assays wurden die Zellen zweimal mit jeweils 1 ml Kulturmedium ohne Zusätze gewaschen, die Waschungen verworfen. Danach wurden die Zellen mit 5 ml einer Lösung von 1 % McCoy's Kulturmedium und 20 kBq [^{99m}Tc]NT während 60 min bei 37 °C inkubiert, um Rezeptorbindung und Internalisierung zu erreichen. Nach dieser Vorinkubation wurden die Überstände verworfen und die Zellen zweimal mit PBS 1x gewaschen,

um alles Ungebundene zu entfernen, und die Waschungen verworfen. In jede Petrischale wurden 5 ml 1 % McCoy's Kulturmedium gegeben und die Zellen während 0 min, 30 min, 60 min, 2.5 h, 5 h und 24 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde von jeder Inkubation 1 ml des Überstandes gesammelt und die Zellen zweimal mit PBS 1x gewaschen, die Waschungen erneut verworfen. Die an der Zelloberfläche gebundene Aktivität wurde in zwei Schritten von je 5 min mit saurer Waschung (50 mM Glycin-HCl/100 mM NaCl, pH 2.8, Volumen: 0.75 ml/Loch) bei Raumtemperatur entfernt. Schliesslich wurde die Menge an internalisiertem Peptid durch Zerstören der Zellen mit zweimal je 0.75 ml/Loch 1 N NaOH bei 37 °C und unter Schütteln (330 rpm) weggelöst. Die an der Zelloberfläche gebundene und die internalisierte Aktivität wurden mittels Gamma-Counter gemessen. Die Resultate wurden in Prozent der maximal an die Zellen assoziierten Aktivität angegeben (oberflächengebunden und internalisiert).

2.10 Form der internalisierten und der freigesetzten Aktivität

Am Tag vor dem eigentlichen Assay wurde gleich verfahren, wie bei der Bestimmung der Aktivitätsfreisetzung (2.9). Am Tag des Assays wurden die Zellen zweimal mit jeweils 1 ml Kulturmedium ohne Zusätze gewaschen, die Waschungen verworfen. Die Zellen wurden mit 5 ml einer Lösung von 1 % McCoy's Kulturmedium und 1,2 MBq [^{99m}Tc]NT versetzt und während 1 h vorinkubiert. Danach wurden die Überstände verworfen, die Zellen zweimal mit PBS 1x gewaschen, die Waschungen verworfen, die Zellen mit 2.5 ml 1 % McCoy's Kulturmedium versetzt und die Petrischalen während den festgesetzten Zeiten (0 min, 30 min, 60 min, 2.5 h, 5 h und 24 h) inkubiert. Anschliessend wurden die Überstände je in ein Falcon PP Tube transferiert, die Zellen zweimal mit PBS 1x gewaschen und die Waschungen verworfen. Die Zellen wurden in 1 ml EDTA 0.05 mM während 15 min bei 37 °C unter Schütteln solubilisiert und die Petrischalen mit erneut 1 ml EDTA 0.05 mM gewaschen. Diese 2 ml Lösung wurden in einem zweiten Falcon Tube gesammelt. Die Zellen in der Suspension wurden mittels Ultraschallhomogenisator (Branson Sonifier 25, SKAN AG) lysiert (Duty cycle: 40; Output Control: 4) und die Proteine in beiden Falcon Tubes mit je 0.5 ml Fällungsreagens (Acetonitril-Ethanol 70 % 1:1) präzipitiert. Beide Tubes wurden während 1 min ins Ultraschall-Bad gestellt, die Lösungen anschliessend filtriert und jeweils 500 µl beider Lösungen in die HPLC injziert. Zur Sicherstellung, dass die eingesetzten Medien und Verfahren keinen Einfluss auf die Peptide haben, wurden Blindproben (enthielten markierte NT-Derivate, jedoch keine Zellen) durchgeführt und mittels HPLC überprüft.

3. Resultate

3.1 Radiomarkierung der Neurotensin-Derivate

Die Markierung ergab mit allen Analogen in der Regel Ausbeuten von mehr als 95 %. Mit dem hier verwendeten Gradienten wurde nach der Markierung, nach einer Retentionszeit von 20-22 min, ein Hauptpeak beobachtet, der dem [^{99m}Tc]Peptid entsprach (Abb. 2). Normalerweise betrug Pertechnetat 0–5 % und Tricarbonyl 0–1 % der totalen Aktivität nach der Markierung.

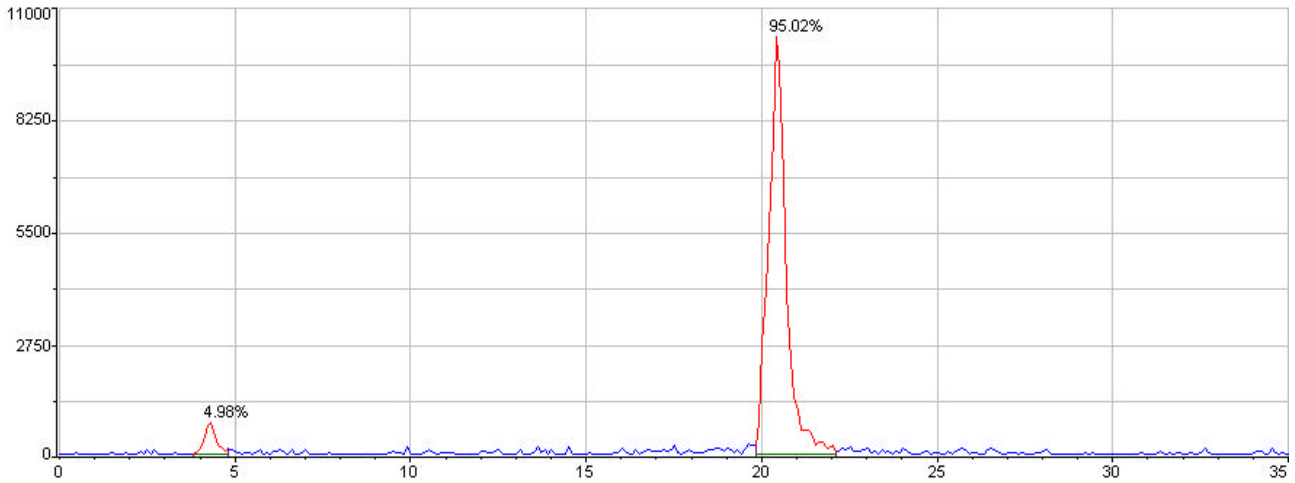


Abbildung 2. HPLC: *Aktivitätsverlauf von [^{99m}Tc]NT-X mit den beiden charakteristischen Peaks bei ca. 4 min (Pertechnetat) und ca. 21 min (Peptid). Bei ca. 8 min wäre Tc-Tricarbonyl sichtbar.*

3.2 Validierung der Markierung

Beim Testen der Einflüsse auf die chemische Stabilität mittels LINDMO-Assay zeigte sich, dass neutrale und basische pH-Werte bei 20-75 °C keinen Einfluss haben, ein saurer pH-Wert (pH = 3) jedoch bei einer gegenüber physiologischen Bedingungen erhöhten Temperatur von 75 °C während 1 h den Kd-Wert erhöht (0.62, im Vergleich zu 0.38 bei neutralem resp. alkalischem pH-Wert) und die gebundene Aktivität bei 2 Mio Zellen erniedrigt (0.15 im Vergleich zu 0.21, resp. 0.24). Auch war die nicht-spezifische Bindung gegenüber neutralem und basischem pH-Wert erhöht. Die Auswahl des Milieus bei 37 °C während 1 h spielte keine Rolle, die Kd-Werte (0.3–0.49) und die totale gebundene Aktivität (0.23) waren bei allen getesteten Medien (PBS 1x, 1 % TFA in Wasser (HPLC-Laufmittel)) nicht signifikant verschieden, was auch die Analyse mittels HPLC bewies, die drei identische Chromatogramme lieferte. Der gleiche Versuch führte jedoch bei

einer verlängerten Inkubationszeit von 18 h (bei 37 °C) im Fall von PBS 1x als Medium im HPLC-Chromatogramm zu der Entstehung eines neuen Peaks (Abb. 3) und im LINDMO-Assay zu einer erniedrigten totalen gebundenen Aktivität. [^{99m}Tc]NT-II zeigte gegenüber [^{99m}Tc]NT-XI eine viel höhere gebundene Aktivität (0.53, im Vergleich zu 0.23) und einen extrem tiefen Kd-Wert (0.02 im Vergleich zu 0.21).

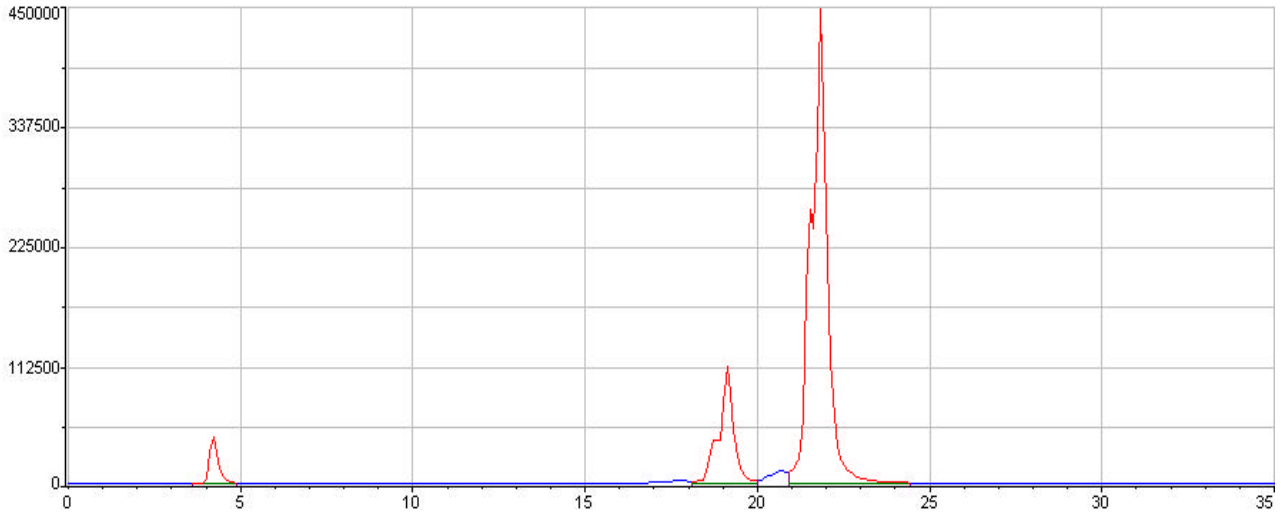


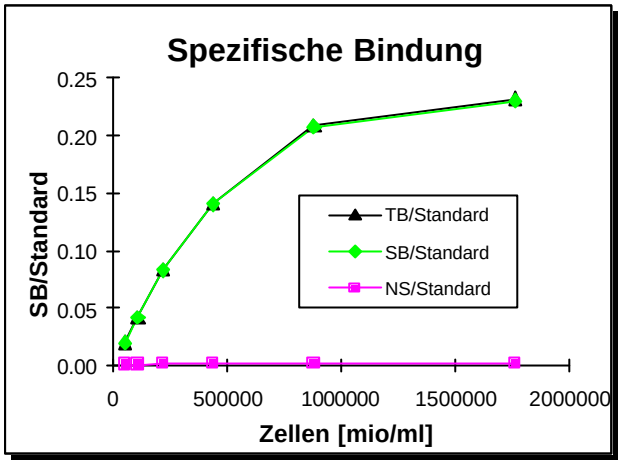
Abbildung 3. HPLC-Chromatogramm von [^{99m}Tc]NT-II in PBS 1x nach 18 h bei 37 °C. *Neben dem charakteristischen Pertechnetat-Peak (4 min) und dem Peak des intakten Peptids (21 min) entstand unter diesen Bedingungen ein Metabolitenpeak (19 min).*

Grundsätzlich zeigten die getesteten Analoge in allen Fällen eine sehr niedrige nicht-spezifische Bindung (Abb. 4).

3.3 Plasmastabilität von Neurotensinderivaten

3.3.1 Validierung der Methode für die Messung der Plasmastabilität

Vollständige Fällungen gemäss Protein-Assay wurden nach Zugabe von 450 µl Acetonitril und nach Zugabe von 750 µl einer Mischung aus Acetonitril/Ethanol 70 % 1:1 erhalten. Nach einer Ethanol-Zugabe von 1 ml war von Auge immer noch keine vollständige Fällung sichtbar, so dass dieses Reagens nicht mittels Protein-Assay untersucht wurde.



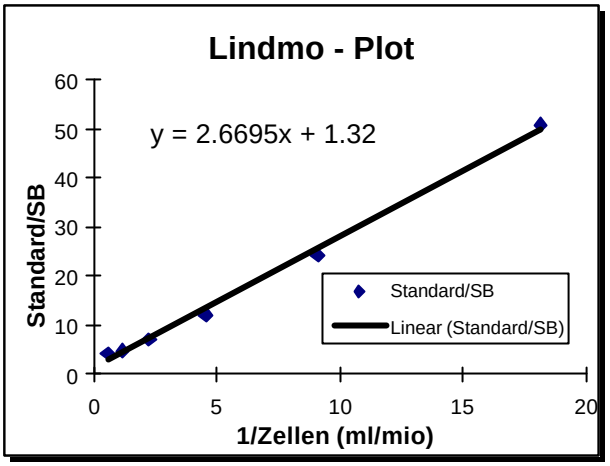


Abbildung 4. LINDMO-Assay: Sättigungskurve für [^{99m}Tc]NT-XI in HT-29 Zellen nach 1 h in pH = 9 bei 37 °C. *Der Achsenabschnitt von 1.32 bedeutet ein Maximum von 77 % gebundenes Peptid (Extrapolation auf unendliche Zellzahl).*

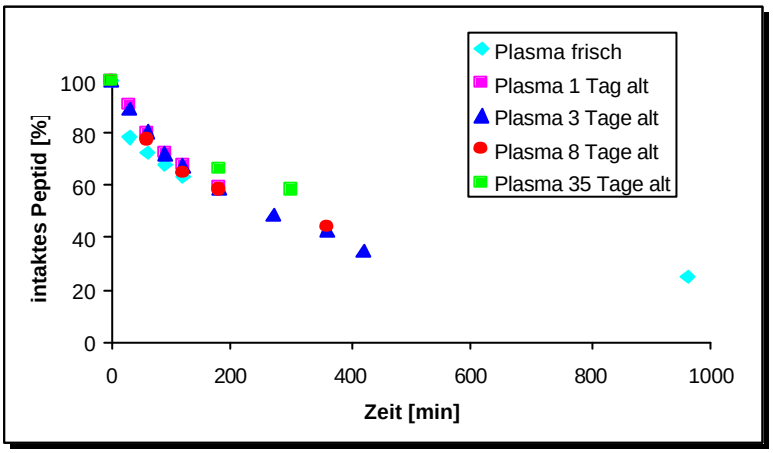


Abbildung 5. Validierung des Plasmas anhand von [^{99m}Tc]NT-X. *Während frisches, sowie bis zu 8 Tage altes Plasma einen identischen Kurvenverlauf zeigen flacht die Kurve des 35 Tage alten Plasmas ab.*

Die Vorversuche bezüglich des Einflusses der Plasmaqualität zeigten, dass nicht reproduzierbare Resultate erhalten wurden, wenn das Vollblut nicht sofort nach Erhalt zentrifugiert wurde. Dies äusserte sich darin, dass Plasma, welches sofort nach Erhalt des Vollblutes gewonnen

wurde, stabil war und keine Degradierung zeigte. Demgegenüber wurden in Plasmastabilitätstests, die mit Plasma aus nicht sofort zentrifugiertem Vollblut durchgeführt wurden, bereits ohne Inkubation Ansätze von Zersetzung beobachtet. Das Plasma blieb, gelagert bei -20 °C, während 8 Tagen stabil. Nach 35 Tagen wurde eine Abflachung der Plasmastabilitätskurve beobachtet (Abb. 5). Wurde das Fällungsreagens ACN/EtOH 70 % 1:1 mit Wasser anstatt Plasma gemischt, blieben alle markierten NT-Derivate stabil.

3.3.2 Plasmastabilität

Die Halbwertszeit (HWZ) wurde in menschlichem Plasma unter Verwendung von Peptid in einer Konzentration von weniger als 0.2 pmol/ml gemessen. Diese Konzentration gibt recht genau die wirklichen Peptidkonzentrationen, die man in *in vivo* Studien erreicht, wieder. Studien bezüglich metabolischer Stabilität wurden mit den Derivaten NT-II, NT-VIII, NT-X, NT-XI und NT-XII durchgeführt (Abb. 6).

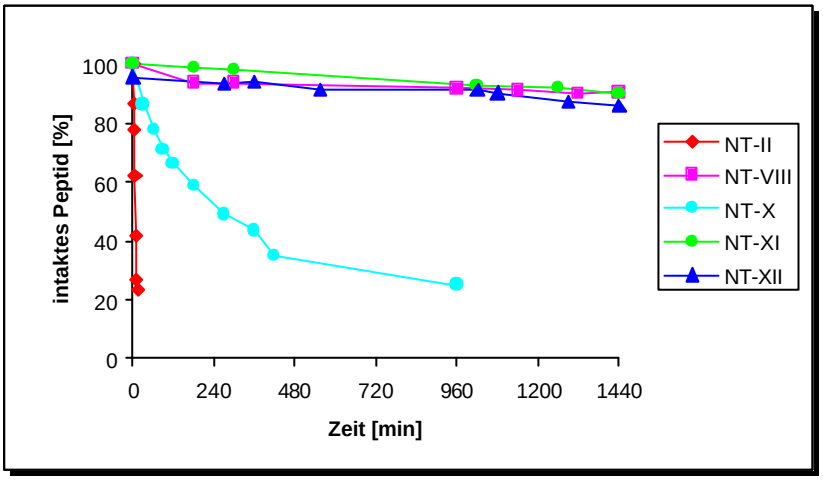


Abbildung 6. Plasmastabilität der Analoge [^{99m}Tc]NT-II, NT-VIII, NT-X, NT-XI und NT-XII. *Dabei weist NT-II eine Plasmahalbwertszeit von ca. 6 min auf, NT-X eine von ca. 4.5 h, während NT-VIII, NT-XI und NT-XII über 24 h stabil sind.*

Dabei wurde [^{99m}Tc]NT-II sehr rasch metabolisiert: Nach 1 min Inkubation im Plasma waren noch 89.8 % des Peptides intakt, nach 15 min Inkubation nur noch 35.7 %. [^{99m}Tc]NT-VIII war nach 5 h noch zu 93.8 % intaktes Peptid, nach 24 h noch zu 90.4 %. Im Fall von [^{99m}Tc]NT-X waren nach

30 min Inkubation noch 80.5 % intaktes Peptid, nach 270 min Inkubation noch 48.9 %. [^{99m}Tc]NT-XI war nach 5 h noch zu 98.1 % intakt, nach 24 h noch zu 89.7 % und [^{99m}Tc]NT-XII schliesslich war nach 24 h Inkubation noch 86 % intaktes Peptid (Tab. 2).

Tabelle 2. Plasmahalbwertszeiten und Anteil des intakten Peptids nach 24 h.
Nur die Analoge NT-VIII, NT-XI und NT-XII sind während mehr als 24 h stabil.

Analoges	T1/2	Anteil an intaktem Peptid nach 24 h
NT-II	5.6 min	-
NT-VIII	> 24 h	90.4 %
NT-X	4.2 h	-
NT-XI	> 24 h	89.7 %
NT-XII	> 24 h	86.0 %

3.4 Protein-Assay

Um die unter 3.3 erhaltenen Resultate richtig auswerten zu können, wurden im Anschluss an die Binding-Assays Protein-Assays durchgeführt. Dabei wurde eine Relation zwischen der Konzentration der Zellen und derjenigen der Proteine gemacht. In allen hier durchgeführten Binding-Assays und den dazugehörigen Protein-Assays war die Proteinmenge proportional zu der eingesetzten Anzahl Zellen.

3.5 Aktivitätsfreisetzung

Aus Internalisierungsversuchen [9] war bekannt, dass nach 60 min bei 37 °C die maximale Internalisation für die Analoge [^{99m}Tc]NT-VIII, NT-X, NT-XI und NT-XII erreicht wurde mit Werten von ca. 90 %. Die Verweildauer der Aktivität in den Zellen war bei den verschiedenen Analogen unterschiedlich, obwohl sie sich in der Menge an freigesetzter Aktivität bis und mit zum Zeitpunkt 2.5 h noch kaum voneinander unterschieden (Abb. 7 & 8). Einzig NT-X zeigte nach 30 min eine gegenüber den anderen Analogen um ca. 4 %, nach 2.5 h um ca. 6 % erhöhte Freisetzung, während sich nach 60 min NT-XI durch eine um ca. 6 % verminderte Aktivitätsfreisetzung ein wenig von den anderen Analogen unterschied. Nach 5 h zeigte sich bereits

eine Tendenz, die dann nach 24 h bestätigt wurde: NT-X hat zu diesem Zeitpunkt mit fast 100 % am meisten Aktivität freigesetzt, gefolgt von NT-VIII mit ca. 70 %. NT-XI hat nach 24 h ca. 60 % der Aktivität freigesetzt und NT-XII ca. 50 %. Die erhaltenen Resultate für die verschiedenen [^{99m}Tc]-Analoge sind detailliert in Tab. 3 dargestellt.

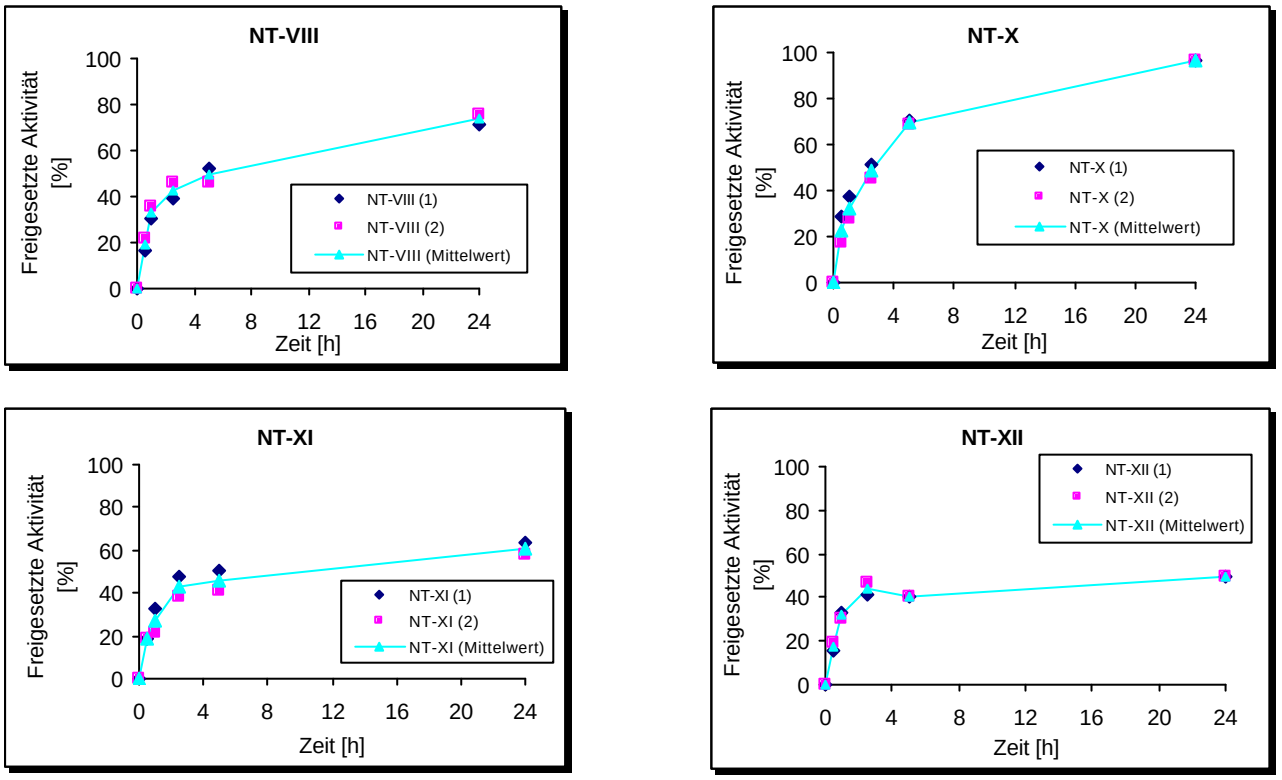


Abbildung 7. Aktivitätsfreisetzung: *Die aus jeweils 2 Messungen erhaltenen Freisetzungskurven zeigen die nach 24 h freigesetzte Menge an Radioaktivität. Dabei setzt NT-XII mit ca. 50 % die Radioaktivität am langsamsten frei.*

Weiter interessierte, in welcher Form die Aktivität freigesetzt wurde, als intaktes Peptid oder als Metabolit, und in welcher Form sie internalisiert war. HPLC-Analysen gaben darüber Auskunft (Abb. 9). Die Resultate zeigen, dass sowohl intaktes Peptid, wie auch Metabolit freigesetzt wurden.

Tabelle 3. Freigesetzte Aktivität in Prozent für die verschiedenen Analoge nach den festgesetzten Zeitpunkten. *NT-XII setzte dabei die Aktivität am langsamsten frei.*

Analoges	0 min	30 min	60 min	2.5 h	5 h	24 h
NT-VIII	0	19.1	32.7	42.7	49.1	70.9
NT-X	0	22.7	32.5	48.2	69.1	96.4
NT-XI	0	18.9	26.4	41.8	45.5	59.1
NT-XII	0	18.2	31.8	43.6	40.1	49.1

NT-VIII und NT-XII wiesen am meisten intaktes Peptid auf, sowohl innerhalb der Zellen wie auch im Überstand. Vor Allem NT-XII zeigte eine besonders langsame und über 5 h dauernde Abnahme des Peptids und gleichzeitige Zunahme des Metaboliten in den Zellen und im Überstand.

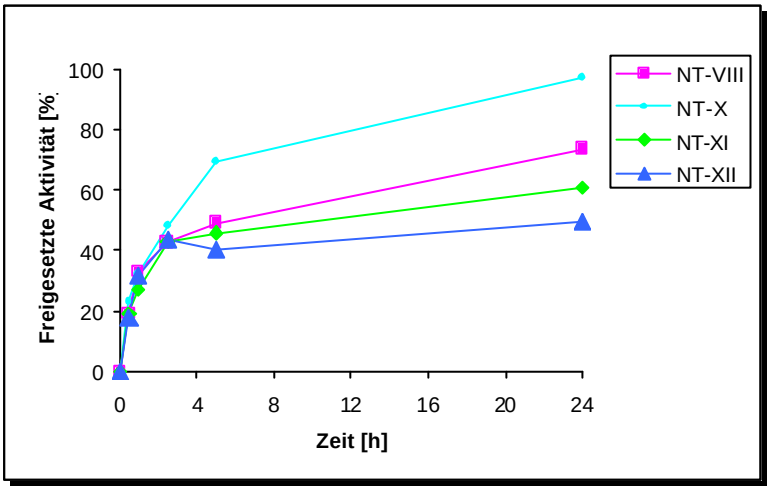


Abbildung 8. Freigesetzte Aktivität aus HT-29 Zellen nach einer Vorinkubation von 1 h bei 37 °C. *Bis zum Zeitpunkt 2.5 h unterschieden sich die Werte der einzelnen Analoge nur wenig, während nach 24 h deutliche Unterschiede sichtbar waren. Dabei wurde NT-X am schnellsten freigesetzt, NT-XII am langsamsten.*

Demgegenüber waren die Analoge NT-X und NT-XI eher schnell zu Metaboliten abgebaut und nicht mehr als intaktes Peptid in den Zellen vorhanden. Aus diesem Grund wurden die Analoge

NT-VIII, NT-X und NT-XI im Gegensatz zu NT-XII nicht über 24 h verfolgt, da diese Derivate nach 60 min (NT-X und NT-XI), spätestens aber nach 150 min (NT-VIII) vollständig metabolisiert waren (Abb. 9).

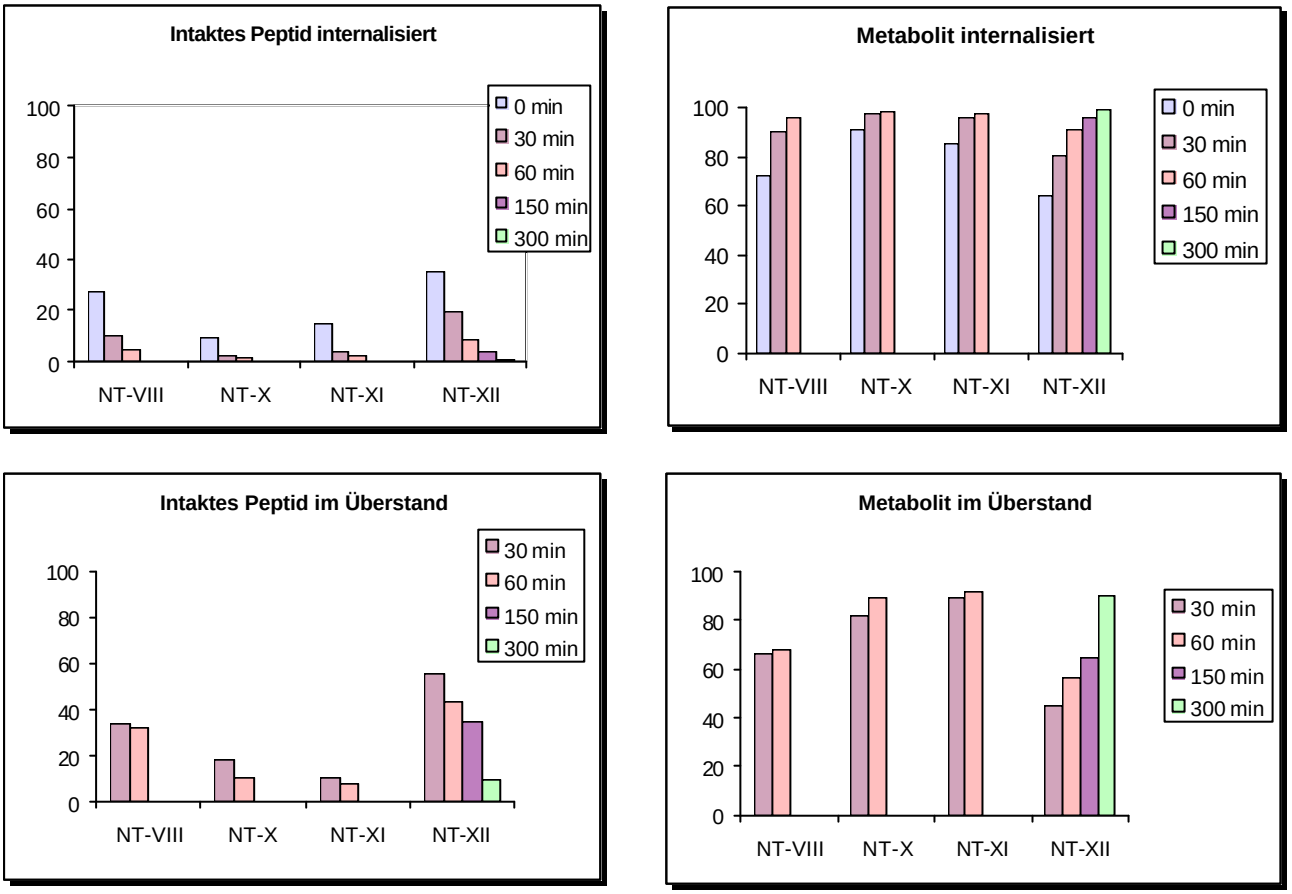


Abbildung 9. HPLC-Analyse der markierten Peptide nach Inkubation in HT-29 Zellen. *150 min und 300 min nur bei NT-XII gezeigt, bei 0 min noch keine Aktivität im Überstand (siehe Text). Die totale Aktivität (intaktes Peptid und Metabolit) internalisiert resp. im Überstand wurde auf je 100 % normiert.*

4. Diskussion

Eine Serie von neuen NT-Derivaten wurde synthetisiert um einer raschen Degradation im Plasma vorzubeugen. In dieser Arbeit wurden die NT-Analoge NT-VIII, NT-X, NT-XI und NT-XII miteinander bezüglich chemischer und metabolischer Stabilität verglichen und die gefundenen Resultate mit früher erhaltenen Resultaten [2, 9, 15] aus *in vitro* und *in vivo* Assays verglichen.

Daraus hoffte man, eine Voraussage über die weitere Verwendbarkeit dieser Analoge und deren möglichen Anwendbarkeit in der Klinik machen zu können. Die wichtigste Voraussetzung für die Durchführung der Tests war jene, dass die Radiomarkierung der Analoge zu keiner Verschlechterung der Affinität zum Rezeptor führt. Diese Bedingung wurde erfüllt, wie frühere Arbeiten [2] ergaben: Die Affinität der markierten Derivate zeigten einen etwas tieferen Kd-Wert als das native Neurotensin (Kd = 1.6 nM).

In Vorproben wurde als erstes ein für die Plasmaproteinfällung geeignetes Reagens gesucht. Obwohl man mit reinem Acetonitril (ACN) mit kleineren Volumina als beim Gebrauch einer Mischung von ACN/EtOH 70 % 1:1 bereits eine vollständige Fällung erreichte, wurde trotzdem in den Stabilitätstests die Mischung verwendet. Der Grund liegt darin, dass aus früheren Arbeiten bekannt war, dass Acetonitril ein sehr guter Ligand für Tc(I) ist, was zu Ligandaustausch führte. Obwohl in dieser Arbeit nur Analoge mit (Nα-His)Ac als Ligand, welcher nicht ausgetauscht wird, verwendet wurden, wurde eine Mischung aus beiden Fällungsreagenzien vorgezogen. In weiteren Vorproben wurde der Einfluss des Plasmas auf die Reproduzierbarkeit des Plasmastabilitätstests untersucht. Die erhaltenen Resultate zeigten bei frischem, sowie bei bis zu 8 Tage altem Plasma einen identischen Kurvenverlauf, was darauf hinweist, dass die Plasmaproteasen und -peptidasen in dieser Zeitspanne nicht an Aktivität einbüssen (Abb. 5). Der Kurvenverlauf von 35 Tage altem Plasma war demgegenüber deutlich flacher, was die verminderte Aktivität der Enzyme nach dieser Zeit zeigt. Voraussetzung dazu, dass das Plasma keinen Verlust an Peptidaseaktivität aufwies und damit reproduzierbare Resultate lieferte, war, dass das Vollblut sofort nach Erhalt zentrifugiert wurde und das daraus gewonnene Plasma bis zum Gebrauch, in dieser Arbeit längstens 8 Tage, bei –20 °C aufbewahrt wurde. Versuche mit Plasma, das aus nicht sofort nach Erhalt zentrifugiertem Vollblut stammte, sondern in Form von Vollblut aufbewahrt wurde, zeigten im HPLC-Chromatogramm Ansätze von Metaboliten. Dies lässt auf einen Einfluss von im Vollblut vorhandenen Enzymen auf das Plasma schliessen (Resultate nicht gezeigt).

Wichtig für die Anwendung am Patienten ist, dass die Markierung und die Analysenmethoden validiert sein müssen. Zudem ist eine Risikoanalyse für die Patientensicherheit unerlässlich. Um die Sicherheit zu gewährleisten wurden die Messungen über einen viel grösseren Zeitraum ausgeführt, als für die Anwendung am Patienten vorgeschrieben ist. Damit ist ein Sicherheitszuschlag mit einbezogen. Um die chemische Stabilität der NT-Derivate zu untersuchen, wurden die Analoge vorgängig Bedingungen ausgesetzt, wie sie während der Markierung und den Stabilitätstests auftreten können. Dazu gehören der Einfluss verschiedener pH-Werte (während der Markierung muss von basischem pH-Wert auf neutralen pH-Wert eingestellt werden),

verschiedener Medien, unterschiedlicher Inkubationszeiten und –temperaturen. Analysiert wurden die Auswirkungen dieser Bedingungen auf die NT-Derivate mittels LINDMO-Assay und HPLC. Die Resultate nach Einsatz verschiedener Medien und verschiedener pH-Werte unterschieden sich kaum: Die Affinität der Peptide zu den Rezeptoren blieb unvermindert gut mit Kd-Werten von unter 0.5 nM, ebenso blieb die totale gebundene Aktivität in allen Fällen gleich. Zudem war die nicht-spezifisch gebundene Aktivität in allen Fällen sehr tief mit im Allgemeinen Werten von unter 2 % der totalen gebundenen Aktivität (Abb. 4). Diese Resultate wurden bestätigt durch in allen Fällen ähnlich aussehende HPLC-Chromatogramme mit den beiden charakteristischen Peaks des Pertechnetats (ca. 4 min) und des intakten Peptids (ca. 21 min). Während sich diese Resultate auch bei gleichzeitigem Einsatz von ACN/EtOH 70 % 1:1 als Medium und Inkubation von 18 h bei 37 °C zeigten, ergab die gleiche Konstellation, jedoch mit PBS 1x als Milieu zwar einen unvermindert tiefen Kd-Wert, jedoch eine um ca. 18 % erniedrigte totale gebundene Aktivität. Dieses Resultat wurde mit dem HPLC-Chromatogramm bestätigt, in welchem bei ca.19 min ein neuer Peak, der ebenfalls ca. 18 % der gesamten Fläche betrug, sichtbar war (Abb. 3). Während längerer Zeit bei 37 °C in PBS 1x scheint das Peptid nicht stabil zu sein. Es ist möglich, dass die lange Dauer der Inkubation zusammen mit der Temperatur von 37 °C in diesem Milieu zu Hydrolyse führen kann, was diese Beobachtung erklären würde. Ein weiterer Grund für die Entstehung des neuen Peaks und damit die Erniedrigung der totalen gebundenen Aktivität könnten Bakterien sein, die während der Inkubation von 18 h gewachsen sind. In diesem Fall wäre der neue Peak ein Metabolitenpeak. Die Konsequenz aus diesem Resultat ist die Massnahme, derartige Lösungen immer bei ca. 4 °C aufzubewahren und steril zu arbeiten. Nur so kann bei einer Anwendung am Patienten die Sicherheit gewährleistet werden.

Ein LINDMO-Assay, der mit Peptid, welches einem sauren pH-Wert von ca. 3 während 1 h bei 75 °C ausgesetzt war, durchgeführt wurde, ergab zwar einen erhöhten Kd-Wert, der mit 0.62 nM jedoch immer noch sehr gut ist, eine deutlich verminderte totale gebundene Aktivität und auch eine erhöhte nicht-spezifische Bindung der Aktivität (4 % gegenüber unter 2 % im Normalfall). Die Beobachtung, dass der HPLC-Peak des intakten Peptids in den meisten Fällen in 2 Peaks mit deutlich verschiedenen NMR-Spektren aufgespalten wurde, die LINDMO-Assays der getrennten Peaks aber identische Resultate lieferten, führte zu der Überlegung, dass die Bildung eines Hydrogenkomplexes dafür verantwortlich sein könnte. Sollte dies der Fall sein, müsste bei einem tiefen pH-Wert der erste Peak gegenüber dem zweiten vergrössert sein. Das HPLC-Chromatogramm zeigte jedoch ein gleich bleibendes Verhältnis der beiden Peaks, womit die

Entstehung eines Hydrogenkomplexes ausgeschlossen werden kann. Damit wird die Hypothese der Bildung von Isomeren (Diastereomeren) wahrscheinlicher.

Aus den Ergebnissen der LINDMO-Assays geht hervor, dass diese Methode geeignet ist, um die Qualität der markierten Peptide zu untersuchen. Die verschiedenen Inkubationsbedingungen (verschiedene Temperatur, verschiedene Medien, verschiedene pH-Werte) ergaben im Allgemeinen sehr ähnliche Werte, ausser dass bei einem pH-Wert von ca. 3 bei 75 °C die Affinität und die totale gebundene Aktivität abgenommen und die nicht-spezifische Bindung zugenommen hat. Die Konsequenz daraus ist, dass während der Markierung, wo unter erhöhten Temperaturen gearbeitet wird, unbedingt auf die korrekte Einstellung des pH-Wertes geachtet werden muss und nicht irrtümlicherweise im sauren pH-Bereich gearbeitet werden darf. Das heisst konkret, es darf nicht zuviel saurer Puffer zur Neutralisation der alkalischen $Tc(CO)_3$-Lösung zugegeben werden. Die LINDMO-Assays ermöglichen folglich eine schnelle Überprüfung gewisser Sicherheitsaspekte.

Die LINDMO-Assays, welche mit NT-XI durchgeführt wurden zeigten gegenüber jenen mit NT-II höhere Kd-Werte und tiefere Werte für die totale gebundene Aktivität. Dies entspricht den Erwartungen, ist NT-II doch das unstabilisierte Analogon und damit dem nativen Peptid gleichzusetzten.

Der schnellen Degradierung der Peptide im Plasma muss entgegengewirkt werden. Der wichtigste Ansatz dazu besteht in der Einführung veränderter Peptidbindungen oder nicht-natürlicher Aminosäuren, um die Geschwindigkeit des enzymatischen Abbaus zu reduzieren, indem beide der durch die Peptidasen spaltbaren Bindungen (8-9 und 11-12) stabilisiert werden. Die Resultate der Plasmastabilität entsprachen den Erwartungen: Jene Analoge, welche eine zweifache Stabilisierung aufweisen, waren nach 24 h noch zu mindestens 86 % intakt und damit sehr viel stabiler als NT-X mit nur einer Stabilisierung oder NT-II mit gar keiner Stabilisierung (Abb. 6, Tab. 2). Dieses Ergebnis entspricht früher gefundenen Resultaten [2, 7, 14]: Dort zeigte NT-VI, welches analog zu NT-XI eine reduzierte Amidbindung enthält, jedoch Ile an Position 12 nicht durch Tle ersetzt hat, gegenüber NT-II nur eine bescheidene Verlängerung der Plasmahalbwertszeit von 6 auf 10 min. Dies zeigt, dass die Stabilisierung an Position 8-9 weniger effektiv ist als jene an Position 12, in der Kombination mit der Stabilisierung an der Stelle 12 aber umso effektiver ist. Die Anzahl stabilisierter Stellen korreliert ebenfalls mit den Tumoraufnahmeraten: Die höchsten Tumoraufnahmewerte wurden zu allen Zeitpunkten mit den doppelt stabilisierten Analogen NT-VIII, NT-XI und NT-XII erhalten [7]. Es konnte demnach gezeigt werden, dass die Tumoraufnahme parallel mit der verbesserten Stabilität der NT-Analoge anstieg. Stabilisierung der Derivate ist demzufolge essentiell.

Wichtigstes Gewebe nach dem Plasma und noch vor Niere und Leber ist der Tumor. Aus ethischen Gründen ist es nicht akzeptabel, Tumore in Tieren wachsen zu lassen, diese dann zu töten und zu sezieren und ein Tumorhomogenat herzustellen. Die Zellkultur stellt deshalb ein ideales Modell für den Tumor dar. Der für eine mögliche Tumortherapie entscheidende Punkt ist ein nach Internalisierung in die Tumorzellen möglichst langer Verbleib der Aktivität in diesen. Die Resultate bestätigten auch in diesem Versuch die vorher gemachten Aussagen: Die doppelt stabilisierten Analoge zeigten eine gegenüber NT-X deutlich verlangsamte Aktivitätsfreisetzung aus den Zellen. Sie wiesen folglich eine längere Verweildauer im Tumor auf, was wiederum durch früher gemachte Resultate [7] gestützt wurde, nämlich durch die bei doppelt stabilisierten Derivaten im Vergleich zu nur einfach Stabilisierten verbesserten Tumor/nicht-Tumor Verhältnisse. Die drei doppelt stabilisierten Analoge unterschieden sich dadurch, dass NT-XI und NT-XII zwar eine langsamere Aktivitätsfreisetzung zeigten als NT-VIII (Abb. 7 & 8), die Aufnahme in die Nieren jedoch bei NT-XI gegenüber NT-VIII und NT-XII massiv erhöht war [2, 7]. Dies könnte auf die nur in NT-XI vorhandene Stabilisierung durch Einführen einer reduzierten Amidbindung zurückzuführen sein, denn allgemein gilt, dass Peptide mit Arg und Lys in der Sequenz eine Aufnahme in die Nieren zeigen, was auf die positive Ladung dieser Aminosäuren zurückzuführen ist. Mit der Einführung der reduzierten Amidbindung weist NT-XI noch eine zusätzliche positive Ladung auf (Amin bei pH = 7 protoniert). Die in NT-VIII und NT-XII vorhandene N-Methylgruppe führte im Vergleich dazu nicht zu diesem Effekt [2]. NT-XII zeigte die höchsten Tumor/Organ-Aufnahmeverhältnisse der ganzen Serie der NT-Analoge.

Um reproduzierbare Resultate zu erhalten, ist darauf zu achten, dass die bei der Markierung zum Peptid hinzugefügte Menge Aktivität immer etwa gleich gross ist, denn nur so kann eine zu grosse Menge an inaktivem Peptid und damit eine Enzymsättigung ausgeschlossen werden. Die Analyse der in die Zellen internalisierten und aus den Zellen freigesetzten Aktivität zeigte, dass in allen Fällen nach der Vorinkubation noch intaktes Peptid in den Zellen vorhanden war. Das intakte Peptid wurde tendenziell schneller freigesetzt als der Metabolit (Abb. 9). Überraschenderweise zeigte NT-VIII im Überstand eine über 60 min konstante Menge an intaktem Peptid, welche nach 150 min vollständig verschwunden war. Diese Werte korrelieren mit den Daten aus den Biodistributionsstudien dieses Peptids [9]. Anzunehmen ist auch, dass ein schneller Wechsel von Freisetzung und Wiederaufnahme des intakten Peptids stattfindet. Diese Annahme wird gestützt durch die Resultate der „receptor-down-regulation“ [8, 9] und Reduktion der freigesetzten Aktivität bei NT-XII zwischen 2.5 h (43.6 %) und 5 h (40.1 %) (Tab. 3). NT-VIII und NT-XII wiesen bei diesen Versuchen den grössten Anteil an intaktem Peptid nach der Internalisierung auf und bei

beiden Analogen wird auch über eine längere Zeitspanne intaktes Peptid freigesetzt. NT-XII zeigte sogar bis 5 h lang eine Freisetzung des intakten Peptides. Diese Ergebnisse können mit Hilfe von Abb.1 interpretiert werden: Eine Methylgruppe, wie sie in NT-VIII und NT-XII vorkommt, erhöht die Stabilität in den Zellen, wobei die Methylgruppe an Position 9 (NT-XII) etwas besser zu sein scheint als an Position 8 (NT-VIII). NT-XI wird in den Zellen schneller metabolisiert als NT-VIII und NT-XII, weshalb gesagt werden kann, dass eine Methylgruppe besser ist als eine reduzierte Amidbindung, wie sie in NT-XI vorkommt. Diese reduzierte Amidbindung und damit das Vorhandensein einer grösseren positiven Ladung könnte auch wiederum eine Erklärung dafür liefern, warum NT-XI relativ schnell nur noch aus Metabolit besteht, denn die höhere Ladung könnte für einen im Gegensatz zu NT-VIII längeren Verbleib in den Zellen verantwortlich zeichnen, was ja durch die Freisetzungskurven bewiesen wurde. Durch diesen längeren Verbleib ist NT-XI vermehrt Zellenzymen ausgesetzt, was den Abbau des Derivates zum Metaboliten ermöglicht und beschleunigt.

Schlussfolgerung: Die doppelte Stabilisierung der Peptide ist notwendig, beeinträchtigt die Affinität für die Rezeptoren nicht und führt zu einer erhöhten Tumoraufnahme und einer verlängerten Verweildauer der Peptide im Tumor. Dadurch sind diese NT-Derivate geeignet für die Diagnose und Therapie von Tumoren, welche NTR1 überexprimieren. Die sehr langsame Freisetzung der an NT-XII gebundenen Aktivität aus den Zellen und die geringe Aufnahme in die Nieren machen dieses Derivat zu einem vielversprechenden Kandidaten für die Anwendung in der Nuklearmedizin. Weil sowohl intaktes Peptid als auch Metabolit aus den Tumorzellen freigesetzt werden, sollte das Hauptaugenmerk nicht auf eine weitere Stabilisierung einer Bindung gerichtet werden, sondern vermehrt darauf, wie sowohl intaktes Peptid als auch entstehender Metabolit noch länger in den Tumorzellen zurückbehalten werden könnten. Ein Ansatz dazu wäre möglicherweise die Veränderung der Metabolitenladung, indem am τ-Stickstoff, welcher für Substitutionsreaktionen zugänglich ist, ein Substituent eingeführt wird.

5. Danksagung

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Schubiger, dass er es mir ermöglicht hat, am Zentrum für Radiopharmazie, PSI Villigen/AG die Diplomarbeit zu absolvieren.

Speziell danken möchte ich Herrn Dr. Peter Bläuenstein für die immerwährende Unterstützung mit Rat und Tat sowohl im Labor, wie auch beim Schreiben des Berichts und die gute Zusammenarbeit während meiner Zeit am PSI.

Frau Dr. Elisa Garcia-Garayoa und Herrn Alain Blanc möchte ich von ganzem Herzen danken für die tolle Hilfestellung zu Beginn der Arbeit, die Einführungen in die Gebiete Radiomarkierung, HPLC und Pharmakologie und die gemeinsame, sehr schöne Zeit im Labor 025.

Margaretha Lutz danke ich für die Geduld, mir beim Üben des Vortrages zuzuhören.

Dem ganzen Team meinen besten Dank für die vielen amüsanten Stunden im Labor und ausserhalb.

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 $[^{99m}Tc(OH_2)_3(CO)_3]^+$ from $[^{99m}TcO_4]^-$ in aqueous solution and its reaction with a bifunctional ligand.“

[2] 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”

[3] D. Block, R. I. J. Feitsma, P. Verneij, E. J. K. Pauwels (1999) Eur J. Nucl. Med 26, 1511–1519, „Peptide radiopharmaceuticals in nuclear medicine“

[4] D. B. Bylund, H. I. Yamamura (1990) „Methods in Neurotransmitter receptor analysis“ edited by H. I. Yamamura et al., 1–35 “Methods for Receptor Binding” Raven Press New York

[5] T. P. Davies and P. N. M. Konings (1993) Critical Reviews in Neurobiology, 7 (3/4): 163-174, “Peptidases in the CNS: Formation of Biologically Active, Receptor-Specific Peptide Fragments”

[6] 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}Tc-Aquaion Labels Peptide to an Unprecedented High Specific Activity”

[7] E. Garcia Garayoa, L. Allemann-Tannahill, P. Bläuenstein, M. Willemann, N. Carrel-Rémy, D. Tourwé, K. Iterbeke, P. Conrath, P. A. Schubiger (2001) Nuc. Med. Biol. 28, 75–84, *“In vitro* and *in vivo* evaluation of new radiolabeled neurotensin (8–13) analogues with high affinity for NT1 receptors”

[8] E. Garcia-Garayoa, P. Bläuenstein, a. Blanc, D. Tourwé, P. A. Schubiger (2001) The quarterly journal of nuclear medicine Vol. 45-No. 2 S-5, “Correlation stability/Tumor uptake for three Neurotensin Analogues with different stabilisation”

[9] E. Garcia-Garayoa, P. Bläuenstein, M. Brühlmeier, A. Blanc, K. Iterbeke, P. Conrath, D. Tourwé, P. A. Schubiger (2000) “Preclinical evaluation of a new stabilized neurotensin (8-13) pseudopeptide radiolabeled with Tc-99m”
Publikation eingereicht.

[10] 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”

[11] 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”

[12] R. Mentlein, R. Lucius (1997) Brain Research Protocols 1, 237–246, „Methods for the investigation of neuropeptide catabolism and stability in vitro“

[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}Tc(I)-tricarbonyl complexes: a hint for the future functionalisazion of biomolecules.”

[14] P. A. Schubiger, L. Allemann-Tannahill, A. Egli, R. Schibli, R. Alberto, N. Carrel-Rémy, M. Willmann, P. Bläuenstein, D. Tourwé (1999) QJ Nucl. Med 23, 155–158; „Catabolism of neurotensins, Implications for the design of radiolabeling strategies of peptides“

[15] P. A. Schubiger, E. Garcia Garayoa and P. Bläuenstein (2000) 7th International Symposium on the Synthesis and Application of Isotopes, Dresden, June 18 „Design and radiolabeling of stable neurotensin derivatives“

[16] J. P. Vincent, J. Mazella, P. Kitabgi (1999) TiPS 20, 302–309, “Neurotensin and neurotensin receptors”