ETH zürich

ETH Library

PEGylation

a strategy to improve the diagnosis and therapy relevant pharmacokinetic properties of bombesin analogues for targeting GRP receptor-positive tumours

Doctoral Thesis

Author(s):
Däpp, Simone Irene

Publication date:
2012

Permanent link:
https://doi.org/https://doi.org/10.3929/ethz-a-007618414

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 No. 20477

PEGylation: a strategy to improve the diagnosis and therapy relevant pharmacokinetic properties of bombesin analogues for targeting GRP receptor-positive tumours

A dissertation submitted to the
ETH ZURICH
for the degree of
DOCTOR OF SCIENCES

presented by
SIMONE IRENE DÄPP
Eidg. dipl. Apothekerin, ETH Zurich
born 23.05.1983
citizen of Oppligen BE

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. R. Schibli, examiner
Prof. Dr. S. M. Ametamey, co-examiner
Dr. M. Béhé, co-examiner

2012

Summary

Prostate cancer is the most frequently diagnosed type of cancer in Switzerland and in the United States. The current treatment options for advanced metastatic prostate cancer show limited efficacy and severe side effects. Therefore, a successful management of prostate cancer seems to require an early detection and a therapy option to which response is guaranteed and which provides an improved quality of life during treatment. Radiolabelled bombesin (BN) conjugates are promising radiotracers for imaging and therapy of prostate tumours, in which BN_2/gastrin-releasing peptide (GRP) receptors are overexpressed. However, low enzymatic *in vivo* stability of BN conjugates as well as accumulation in non-target-tissues may limit their clinical application.

In an attempt to improve the pharmacokinetics of the BN conjugates and counteract their rapid enzymatic degradation, we prepared a series of polyethylene glycol (PEG)-ylated BN(7-14) analogues for radiolabelling with $^{99m}Tc(CO)_3$ and evaluated them *in vitro* and *in vivo*. Derivatisation of a stabilised (N^{α}His)Ac-BN(7-14)[Cha^{13},Nle^{14}] analogue with a branched PEG molecule (2.4 kDa ($PEG_{2.4}$)) and with linear PEG molecules of various sizes (5 kDa (PEG_5), 10 kDa (PEG_{10}) and 20 kDa (PEG_{20})) was performed by PEGylation of the ε-amino group of a β^3hLys-βAla-βAla spacer between the stabilised BN sequence and the (N^{α}His)Ac chelator. As a consequence of PEGylation, binding affinity of the BN analogues to BN_2/GRP receptors was not significantly reduced and remained high ($K_d < 0.9$ nM). However, the specificity for BN_2/GRP receptors and the total cell binding was slightly reduced for PEGylated BN analogues compared to the non-PEGylated compound. Besides, *in vitro* binding kinetics of the PEGylated analogues was slower, which was demonstrated by the fact that steady-state condition

was reached only after 4 h. Furthermore, PEGylation improved the stability of the ^{99m}Tc-tricarbonyl BN analogue *in vitro* and *in vivo*. Out of the series of PEGylated $^{99m}Tc(CO)_3$-labelled BN analogues, the BN derivative conjugated with a PEG_5 molecule showed best pharmacokinetics *in vivo*, i.e. fast blood clearance and predominant renal excretion. The tumour uptake of the ^{99m}Tc-PEG_5-Lys-BN conjugate was slightly higher compared to the non-PEGylated analogue (3.91±0.44% *vs* 2.80±0.28% injected dose per gram, 1 h p.i.). Tumour retention was also increased resulting in a 3-fold higher amount of radioactivity in the tumour at 24 h p.i. Furthermore, decreased hepatobiliary excretion and increased tumour-to-non-target ratios (tumour-to-blood: 17.1 *vs* 2.1; tumour-to-kidney: 1.1 *vs* 0.4; tumour-to-liver: 5.8 *vs* 1.0, 24 h p.i.) were observed and confirmed further via small animal SPECT images 1 h p.i.

In a next step, we tested the strategy PEGylation on its applicability to differently radiolabelled BN analogues containing the DOTA chelating system. The BN analogues were based on the same conjugate as we had used for the ^{99m}Tc-tricarbonyl radiolabelling. For this study, however, the peptide was equipped with a DOTA chelator. PEGylation of the DOTA-BN(7-14)[Cha^{13},Nle^{14}] analogue with a linear PEG_5 molecule was performed with the PEGylation strategy as described above. ^{67}Ga-labelled DOTA-BN analogues were evaluated on their pharmacokinetic properties with focus on their use in metal-based SPECT imaging. Furthermore, the ^{67}Ga-labelled DOTA-BN analogues were evaluated as surrogates for potential ^{68}Ga-labelled PET agents. Beside diagnostic purposes, we wanted to evaluate our non-PEGylated and PEGylated DOTA-Lys-BN analogues as potential radiotherapeutic agents. For this, we selected the therapeutic radionuclide ^{177}Lu. The specificity and the binding affinity of the DOTA-BN analogue for BN_2/GRP receptors was only slightly reduced by PEGylation ($IC_{50} < 16$ nM). *In vitro* binding kinetics of the PEGylated analogue was slower, since steady-state condition was reached after 4 h. PEGylation improved the stability of DOTA-

BN conjugate *in vitro* in human plasma by a factor of 5.6. The *in vivo* biodistribution studies of the non-PEGylated ^{67}Ga-labelled DOTA-BN analogue revealed more favourable tumour-to-non-target ratios than the non-PEGylated ^{99m}Tc-labelled version. This could be ascribed to the more hydrophilic character of the DOTA-conjugate (log D = -2.36 and -0.74). PEGylation of the ^{67}Ga-labelled DOTA-BN analogue led to better tumour-to-liver (11.5 *vs* 5.1), tumour-to-pancreas (0.8 *vs* 0.2) and tumour-to-intestine ratios (5.9 *vs* 1.5) at 1 h p.i. and thus improved the diagnosis relevant characteristics further. Regarding radiotherapy, the tumour uptake of the ^{177}Lu-DOTA-PEG$_5$-BN derivative was higher at 1 h p.i. compared to the non-PEGylated analogue (3.43±0.63% ID/g *vs* 1.88±0.47 %ID/g). Moreover, the increased tumour retention resulted in a 2-fold higher tumour accumulation at 24 h p.i. and increased tumour-to-non-target ratios (tumour-to-kidney: 0.6 *vs* 0.4; tumour-to-liver: 8.8 *vs* 5.9, 24 h p.i.).

Therapy studies were performed with the non-PEGylated and the PEGylated ^{177}Lu-labelled DOTA-BN analogues. Apart from looking at their antitumour efficacy, we also rated the optimal risk-benefit profile concerning treatment by varying the specific activity of the ^{177}Lu-DOTA-PEG$_5$-Lys-BN analogue. Besides, we assessed the efficacy of the radiotherapy by varying the number and the interval of the ^{177}Lu-DOTA-PEG$_5$-Lys-BN doses. In these therapy studies, both ^{177}Lu-labelled DOTA-BN analogues significantly inhibited tumour growth. The therapeutic efficacy, however, was highest for the PEGylated derivative at high specific activity administered in two fractions at day 0 and day 7 (73% tumour growth inhibition, 3 weeks after therapy). In conlusion, PEGylation proved to be an effective strategy to enhance diagnosis and therapy relevant properties of BN radiopharmaceuticals and revealed to be applicable for both ^{99m}Tc-tricarbonyl BN analogues and DOTA-BN analogues, radiolabelled with various radioisotopes. PEGylation and increasing the specific activity of DOTA-based BN conjugates as well as administering multiple dose regimens and shortening the injection interval provided a

protocol for targeted radionuclide therapy with a beneficial antitumour effectiveness and a favourable risk-profile at the same time.

Zusammenfassung

Prostatakrebs ist die am häufigsten diagnostizierte Krebsart in der Schweiz und den USA. Weil die aktuellen Behandlungsmethoden für Prostatakrebs im fortgeschrittenen, metastasierenden Stadium limitierte Effizienz und schwere Nebenwirkungen aufweisen, scheint eine frühzeitige Erkennung und eine Therapiemöglichkeit, auf welche die Krankheit anspricht und welche eine grösstmögliche Lebensqualität zulässt, vonnöten. Radioaktiv markierte Bombesin (BN) Konjugate sind vielversprechende Radiotracer für die Diagnose und die Therapie von Brust- und Prostatatumoren, die Gastrin-freisetzende Peptidrezeptoren (BN_2/GRP-Rezeptoren) überexprimieren. Die tiefe enzymatische Stabilität *in vivo*, aber auch die Anreicherung dieser BN Analoga in gesundem Gewebe könnten deren Anwendung in der Klinik einschränken.

Um die pharmakokinetischen Eigenschaften dieser BN Analoga zu verbessern und um dem schnellen, enzymatischen Abbau entgegenzuwirken, erstellten wir eine Serie von PEGylierten BN(7-14) Analoga, markierten diese mit $^{99m}Tc(CO)_3$ und beurteilten deren Eigenschaften *in vitro* und *in vivo*. Die Derivatisierung eines stabilisierten (N^{α}His)Ac-BN(7-14)[Cha^{13},Nle^{14}] Analogs mit einem verzweigten PEG-Molekül (2.4 kDa ($PEG_{2.4}$)) oder mit linearen PEG-Molekülen verschiedener Grössen (5 kDa (PEG_5), 10 kDa (PEG_{10}) und 20 kDa (PEG_{20})) wurde mittels PEGylierung der ε-Aminogruppe des β^3hLys-βAla-βAla Linkers durchgeführt, der zwischen der stabilisierten BN Sequenz und dem (N^{α}His)Ac Chelator eingefügt wurde. Die PEGylierung hat die Bindungsaffinität von BN Analoga nicht beeinträchtigt, denn die Bindungsaffinität zu BN_2/GRP-Rezeptoren wurde nicht signifikant reduziert und blieb hoch ($K_d < 0.9$ nM). Die Spezifität für BN_2/GRP-Rezeptoren und die Gesamtheit der Bindung an die Tumorzellen wurden jedoch durch die PEGylierung leicht reduziert. Zudem war die *in vitro* Bindungskinetik der PEGylierten Analoga langsamer, denn die Gleichgewichts-

bedingungen stellten sich erst nach 4 h ein. Die PEGylierung verbesserte die Stabilität des ^{99m}Tc-Tricarbonyl BN Analogs *in vitro* and *in vivo*. Aus der Serie von PEGylierten ^{99m}Tc(CO)$_3$-markierten BN Analoga zeigte das BN Derivat mit dem PEG$_5$-Molekül die besten pharmakokinetischen Eigenschaften *in vivo*. Es wies eine schnelle Blutclearance und eine vorherrschend renale Ausscheidung auf. Die Tumoraufnahme des ^{99m}Tc-PEG$_5$-Lys-BN Analogs war im Vergleich zum nicht-PEGylierten Analog leicht erhöht (3.91±0.44% ID/g *vs* 2.80±0.28% ID/g, 1 h p.i.). Die Tumorretention war ebenfalls verbessert und zeigte nach 24 h p.i. eine dreifach höhere Akkumulation der Radioaktivität im Tumor. Desweiteren wurden eine reduzierte hepatobiliäre Ausscheidung und höhere Tumor-zu-Gewebe Verhältnisse beobachet (Tumor-zu-Blut: 17.1 *vs* 2.1; Tumor-zu-Nieren: 1.1 *vs* 0.4; Tumor-zu-Leber: 5.8 *vs* 1.0, 24 h p.i.). Dies konnte mittels SPECT-Bildern nach einer Stunde p.i. bestätigt werden.

In einem nächsten Schritt testeten wir, ob die Strategie PEGylierung nur für ^{99m}Tc(CO)$_3$-markierte BN Analoga anwendbar ist oder ob sie auch funktioniert bei BN Analoga, welche mit verschiedenen Radionukliden markiert sind und ein anderes Chelatorsystem enthalten. Die BN Analoga basieren auf demselben Derivat, welches wir für die ^{99m}Tc-Tricarbonyl Markierung benützt haben. Für diese Studie wurde das Peptid mit einem DOTA Chelator versehen. Die PEGylierung des DOTA-BN(7-14)[Cha^{13},Nle^{14}] Analogs mit dem linearen PEG-Molekül von 5 kDa wurde nach derselben PEGylierungsmethode durchgeführt, wie sie oben bereits beschrieben ist. Die mit ^{67}Ga markierten DOTA-BN Analoga wurden hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit für SPECT-Bilder untersucht. Zusätzlich wurden die ^{67}Ga-DOTA-BN Analoga stellvertretend für potentielle ^{68}Ga-markierte PET Derivate untersucht. Nebst dem diagnostischen Aspekt wollten wir unsere nicht PEGylierten und PEGylierten DOTA-BN Analoga auch für den potentiellen Einsatz als Radiotherapeutika evaluieren, wofür wir diese Analoga mit ^{177}Lu markierten. Die Spezifität und die Bindungsaffinität des DOTA-BN Analogs für BN$_2$/GRP-Rezeptoren

wurde durch die PEGylierung nur leicht reduziert ($IC_{50} < 16$ nM). Zudem war die *in vitro* Bindungskinetik des PEGylierten Analogs langsamer, denn die Gleichgewichts-bedingungen stellten sich erst nach 4 h ein. Die PEGylierung verbesserte die Stabilität des DOTA-BN Analogs um den Faktor 5.6 *in vitro* in menschlichem Plasma. Die *in vivo* Bioverteilungsstudien mit dem nicht PEGylierten ^{67}Ga-DOTA-BN zeigten bessere Tumor-zu-Gewebe Verhältnisse als das nicht PEGylierte mit ^{99m}Tc markierte Analog. Dies ist auf die erhöhte Hydrophilie der DOTA-Derivate zurückzuführen (log D -2.36 und -0.74). Die PEGylierung der ^{67}Ga-DOTA-BN Analoga führte zu verbesserten Tumor-zu-Leber (11.5 *vs* 5.1), Tumor-zu-Pankreas (0.8 *vs* 0.2) und Tumor-zu-Darm Verhältnissen (5.9 *vs* 1.5) zum Zeitpunkt 1 h p.i. und verbesserte so die relevanten Eigenschaften für die Diagnostik. Betreffend Radiotherapie zeigte das ^{177}Lu-DOTA-PEG_5-BN Derivat 1 h p.i. eine höhere Tumoraufnahme als das nicht PEGylierte Analog (3.43±0.63% ID/g *vs* 1.88±0.47 %ID/g). Die Tumorretention war ebenfalls verbessert und resultierte nach 24 h p.i. in einer zweifach höheren Akkumulation der Radioaktivität im Tumor und in höheren Tumor-zu-Gewebe Verhältnissen (Tumor-zu-Nieren: 0.6 *vs* 0.4; Tumor-zu-Leber: 8.8 *vs* 5.9, 24 h p.i.).

Die Therapiestudien wurden mit dem nicht PEGylierten und dem PEGylierten ^{177}Lu-DOTA-BN Analog durchgeführt. Nebst ihrer Antitumoreffizienz beurteilten wir auch die Risiken und den Nutzen der Behandlung, indem wir die spezifische Aktivität des ^{177}Lu-DOTA-PEG_5-Lys-BN Analogs variierten. Zusätzlich wählten wir andere Strategien, wie die Verabreichung in mehreren Dosen und das Verkürzen des Injektionsintervalls, um die Therapieeffizienz von ^{177}Lu-markierten DOTA-BN Analoga zu steigern. In den Therapiestudien erzielten beide mit ^{177}Lu markierten DOTA-BN Analoga eine signifikante Inhibition des Tumorwachstums. Die therapeutische Effizienz war jedoch dann am höchsten, wenn das PEGylierte Derivat mit einer hohen spezifischen Aktivität in zwei Dosen verabreicht wurde, nämlich am Tag 0 und am Tag 7 (73% Inhibition des

Tumorwachstums, 3 Wochen nach Therapiebeginn). Die PEGylierung erwies sich als effiziente Strategie, um die pharmakokinetischen Eigenschaften von BN Radiopharmaka für die Diagnostik und die Therapie zu verbessern, und zeigte, dass diese Strategie nicht nur für ^{99m}Tc-Tricarbonyl BN Analoga anwendbar ist sondern auch für Derivate, die DOTA als Chelatorsystem enthalten. Die PEGylierung und die Erhöhung der spezifischen Aktivität der DOTA-BN Analoga, aber auch deren Verabreichung in mehreren Dosen und in einem gekürzten Injektionsintervall lieferten ein Anwendungsschema für die Radionuklidtherapie, mit dem eine hohe Antitumoreffizienz aber gleichzeitig auch ein positives Risikoprofil erreicht wird.