

Radiolabeled Peptides for Cancer Diagnosis & Therapy.

Proefschrift ingediend ter verkrijging van de graad van doctor in de wetenschappen

Maes Veronique

Laboratorium voor organische chemie

2006

1 Samenvatting

Het voorkomen van receptoren voor neuropeptiden, zoals neurotensine en bombesine, in hoge densiteit op tal van tumorcellen heeft ertoe geleid dat het gebruik van radiogemerkte peptiden voor receptor "targeting" tijdens de laatste jaren een belangrijke plaats heeft verworven in de nucleaire oncologie. Internalisatie van de receptor-gebonden liganden biedt een mogelijkheid voor radioisotoop accumulatie in de doelcellen. Incorporatie van radionucliden die vervallen door γ -straling laat visualisatie van de tumor toe gebruik makend van de SPECT ("single-photon emission computed tomography") of PET ("photon emission tomography") techniek. Wanneer α - of β -stralers worden gebruikt, kan een stralingsdosis binnenin de tumorcellen gebracht worden die deze cellen kan vernietigen. Ondanks het feit dat het gebruik van peptiden als vectormoleculen in radiofarmaca tal van voordelen biedt, moeten de welgekende snelle enzymatische degradatie en de ongunstige biodistributie eigenschappen verholpen worden. Dit werk beschrijft de synthese van radiofarmaca gebaseerd op stabiele analogen van neurotensin(8-13) (Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu) en bombesin(7-14) (Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂) voor de diagnose, en latere therapie, van exocrine pancreas carcinoma (NTR1 receptoren) en borst- en prostaat tumoren (GRP receptoren) respectievelijk. Een zeer belangrijk aspect in de ontwikkeling van nieuwe radiofarmaca is de verbetering van de farmacokinetische eigenschappen met het oog op een betere tumor/achtergrond verhouding in het geval van diagnose en om aan de meer strikte vereisten voor biodistributie voor therapie te voldoen. In dit project werden verscheidene strategieën toegepast om het biodistributie profiel van de radiofarmaca te verbeteren. De aangebrachte modificaties mogen in geen geval de receptoraffiniteit nadelig beïnvloeden.

De synthese van de neurotensine (NT) analogen werd manueel uitgevoerd via de vaste fase peptidensynthese op een Merrifield polystyreen hars gebruik makend van de Boc/OBn strategie. Voor radiomerking met ^{99m}Tc werd de retro-Na-carboxymethyl histidine ((NaHis)Ac) aan het amine uiteinde van het peptide gehecht, terwijl DTPA werd gekoppeld aan de peptiden die gebruikt werden voor merking met ¹¹¹In. De (NaHis)Ac chelator werd gesynthetiseerd op vaste fase. Voor de conjugatie van DTPA aan de peptiden werden verschillende strategieën zowel in oplossing als op vaste fase geëvalueerd. De halfwaardetijd van NT(8-13) in plasma van slechts enkele minuten kon verlengd worden tot meer dan 20 dagen door N-methylering van Arg9 en substitutie van Ile12 door het volumineuze Tle, resulterend in het NT-XII analoog ((NaHis)Ac-Arg-MeArg-Pro-Tyr-Tle-Leu). Dit analoog wordt momenteel klinisch geëvalueerd. Om de accumulatie in lever en nieren te verminderen, werden de peptiden meer hydrofiel gemaakt. De invoering van het hydrofiele shikiminezuur via een Lys linker tussen de (NaHis)Ac chelator en de dubbel gestabiliseerde NT sequentie resulteerde in het NT-XVIII analoog (NaHis)Ac-Lys(shikimyl)-

Arg-MeArg-Pro-Tyr-Tle-Leu) en zorgde voor de verwachte vermindering van opname in lever en nieren. Helaas werden tevens een gereduceerde receptoraffiniteit en tumor opname vastgesteld. Daarom werd besloten om een bAlaAla linker in te bouwen tussen de gestabiliseerde NT(8-13) sequentie en de chelator-shikiminezuur groep. Dit resulteerde echter niet een verbeterde bindingsaffiniteit. De vervanging van Tyr11 door 2',6'-dimethyltyrosine (Dmt) in NT-XIX ((NaHis)Ac-Arg-MeArg-Pro-Dmt-Tle-Leu), hoewel een daling in receptor affiniteit werd waargenomen, vertoonde een gelijkaardige tumoropname als NT-XII. Dit NT-XIX analoog beschikt over de beste karakteristieken van alle neurotensine analogen die tot nog toe werden gepubliceerd en zal weldra klinisch geëvalueerd worden. Dit onderzoek gebeurde in samenwerking met de groep van Dr. P. Bläuenstein en Dr. E. Garcia-Garayoa van het Paul Scherrer Instituut (Villigen, Zwitserland), die instond voor de radiomerking en alle biologische studies.

Voor de radiomerking van de neurotensine analogen met ¹¹¹In werd getracht de beste methode te vinden voor de conjugatie van het DTPA aan de peptiden. De koppeling van het monoreactieve tri-tBu-DTPA aan de harsgebonden peptiden is de meest algemene methode. De gewenste DTPA-NT analogen konden echter niet met een hoge opbrengst bekomen worden. Het voornaamste probleem tijdens de synthese van de DTPA-peptiden is de vorming van complexen met metallische onzuiverheden. In de toekomst zal veel aandacht moeten geschonken worden aan methoden om deze onzuiverheden te vermijden of aan het vinden van betere methoden om het metaal uit het complex te extraheren. De interactie van de gestabiliseerde ¹¹¹In-DTPA-neurotensine analogen met de NTR1 receptoren in aanwezigheid van een bispecifiek antilichaam ter verhoging van de tumorselectiviteit werd onderzocht door de groep van Dr. A. Gruaz-Guyon (Universiteit Parijs VII). Tegen alle verwachtingen in vertoonden de gestabiliseerde DTPA-neurotensine analogen een verlaagde affiniteit voor de NTR1 receptor op de HT-29 tumorcellen.

Naast de synthese van stabiele neurotensine analogen voor radiomerking werden een aantal fluorescente en stabiele NT(8-13) analogen bereid. Hierbij werd FITC gekoppeld aan het amine uiteinde van het peptide op vaste-fase. De invoering van de FITC groep had een nadelige invloed op de receptor affiniteit. De daling in affiniteit kon verminderd worden door de invoering van een Ava linker. Er werd aangetoond dat, gebruik makend van het beste analoog, het fluorescent gemerkte neurotensine in de cellen geïnternaliseerd wordt.

De bombesine (BN) analogen werden gesynthetiseerd op een Rink amide hars gebruik makend van de Fmoc/OtBu vaste fase peptidensynthese strategie. Aangezien alle bombesine analogen bereid werden met het doel ze te merken met ^{99m}Tc, werd tevens de (NaHis)Ac chelator ingevoerd. Omdat de His12-Leu13 peptidenbinding heel gevoelig is aan enzymatische hydrolyse, werden nieuwe BN(7-14) analogen gesynthetiseerd waarin Leu in positie 13 werd vervangen door b²hLeu, b³hLeu en Cha. Deze wijzigingen leidden tot verhoogde plasma stabiliteit, maar enkel het Cha bevattende analoog behield voldoende affiniteit voor de GRP receptor. Om oxidatie van het zwavel atoom in Met te vermijden, werd Met vervangen door Nle. De invloed van de invoering van zowel verscheidene linkers als van het hydrofiële shikiminezuur via een Lys linker tussen de stabiele BN(7-14) sequentie ((NaHis)Ac-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Cha-Nle-NH₂) en de (NaHis)Ac chelator op het biodistributie patroon van de peptiden werd bestudeerd. De introductie van het shikiminezuur in BBS-42 resulteerde in een enorme daling van accumulatie in lever en nieren, zonder verlies aan receptor affiniteit. Dit peptide analoog en het bombesine analoog BBS-43 waarin een b³hSer-bAla-bAla spacer werd ingebouwd, zijn de eerste analogen waarbij de tumor tot achtergrond verhoudingen met de tijd toenemen. Dit betekent dat het analoog sneller verdwijnt uit het bloed en "non-target" organen dan uit de doelcellen. SPECT beelden met BBS-42 in muizen met PC-3 tumor xenograften toonden aan dat de tumor duidelijk kon gevisualiseerd worden. Deze resultaten zijn veelbelovend voor de verdere evaluatie van deze radiopharmaca.

In het laatste gedeelte van dit werk, werd de carbohydratatie van de (NaHis)Ac-bombesine analogen via de Maillard reactie en Amadori omlegging bestudeerd. De onverwachte reactiviteit van het α -amine van de (NaHis)Ac groep, leidde ertoe dat verscheidene chemische strategieën moesten onderzocht worden om de Maillard reactie te kunnen uitvoeren op peptiden die deze chelator bevatten. De beste resultaten werden bekomen wanneer de Maillard reactie werd uitgevoerd op de hars gebonden peptiden na constructie van de chelator. Desondanks zorgden moeilijke reactie controle en slechte RP-HPLC scheidingen ervoor dat het gewenste peptide slechts met kleine opbrengsten kon worden bekomen. Een alternatieve methode om de bombesine analogen te glycosyleren, gebaseerd op de chemoselectieve oxime vorming, werd reeds uitgetoet. De eerste experimenten toonden een selectieve reactie aan tussen het glucose en de hydroxylamine functie en niet met het secundair amine van de (NaHis)Ac chelator. Verdere optimalisatie van deze strategie moet nog gebeuren, maar de resultaten zien er veelbelovend uit.

2 Summary

Since many tumors overexpress receptors for neuropeptides, such as neurotensin and bombesin, the use of radiolabeled peptides for receptor targeting has become a powerful tool in nuclear oncology. Internalization of the receptor-bound ligands can result in the accumulation of radioactivity within the target cells. Incorporation of γ -emitting radionuclides allows the visualization of the tumor using the single-photon emission computed tomography (SPECT) or positron emission tomography (PET) techniques, whereas α - and β -radiations are able to destroy the tumor cells. Although many advantages have been associated with the use of peptides as targeting molecules, strategies to overcome their rapid metabolic degradation and poor biodistribution properties have to be evaluated. This thesis deals with the synthesis of radiopharmaceuticals based on stable analogs of neurotensin(8-13) (Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu) and bombesin(7-14) (Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂) for the diagnosis and treatment of exocrine ductal pancreatic carcinoma and breast- and prostate carcinoma respectively. An important aspect in the design of new radiopharmaceuticals is the improvement of the pharmacokinetic properties of the targeting peptides in order to obtain better tumor-to-background ratios for diagnosis and to meet the more stringent requirements for biodistribution for therapeutic applications. Different strategies have been applied in this project to optimize the biodistribution profile of the labeled peptides. These modifications should not have a negative influence on the binding affinity.

The synthesis of the neurotensin (NT) analogs was performed on a Merrifield polystyrene resin using the Boc/OBn solid-phase peptide synthesis protocol. For radiolabeling with ^{99m}Tc, the retro-Na-carboxymethyl histidine ((NaHis)Ac) was attached to the N-terminus of the peptides, whereas DTPA was coupled to the neurotensin analogs for labeling with ¹¹¹In. The construction of the peptides containing the (NaHis)Ac chelator was achieved on solid support. For the conjugation of DTPA to the peptides, different strategies in solution and on solid-phase have been evaluated. The half-life of the native NT(8-13) sequence of only a few minutes in plasma could be increased to more than 20 days by N-methylation of the Arg9 and substitution of the Ile12 by the voluminous Tle, resulting in the NT-XII analog ((NaHis)Ac-Arg-MeArg-Pro-Tyr-Tle-Leu). This analog already made it into clinical trials. With the purpose to reduce the accumulation of the radiopharmaceuticals in liver and kidneys, the peptides were made more hydrophilic. The introduction of the hydrophilic shikimic acid through a Lys spacer between the (NaHis)Ac chelator and the double stabilized NT sequence, leading to NT-XVIII ((NaHis)Ac-Lys(shikimyl)-Arg-MeArg-Pro-Tyr-Tle-Leu), did result in the expected lower kidney and liver accumulation. However, the receptor affinity and especially tumor uptake were also reduced. The introduction of a bAlaAla spacer between the NT sequence and the chelator-shikimic acid moiety did not improve the receptor affinity. The replacement of the Tyr11 residue by the bulky 2',6'-dimethyltyrosine (Dmt) in NT-XIX ((NaHis)Ac-Arg-MeArg-Pro-Dmt-Tle-Leu), despite resulting in a decreased receptor affinity, maintained the accumulation in the tumor at the

same level as in NT-XII. This analog has the best characteristics of all published NT-analogs so far and it will soon be evaluated in clinical trials. This research was performed in collaboration with the group of Dr. P. Bläuenstein and Dr. E. Garcia-Garayoa from the Paul Scherrer Institute (Villigen, Switzerland), who carried out the radiolabeling and all biological assays.

For the labeling of the neurotensin analogs with ^{111}In , the best strategy for the conjugation of the DTPA chelator to the peptides had to be found. The coupling of tri-*t*Bu-DTPA to the resin bound peptides is the most general method. However, the desired peptides were not obtained in high yields. The major problem during the synthesis is the formation of complexes with metallic impurities. Great attention should be paid in the future to avoid these impurities or to find better procedures to extract the metal from the complex. The stabilized ^{111}In -DTPA-NT analogs have been studied by the group of Dr. A. Gruaz-Guyon (University Paris 7) for their interaction with the NTR1 receptor in the presence of a bispecific antibody in order to enhance the tumor selectivity. However, the double (MeArg⁹, Tle¹²) and triple stabilized (MeArg⁹, Dmt¹¹, Tle¹²) DTPA-NT analogs showed, contrary our expectations, a reduced affinity for the receptor on HT-29 cells.

In addition to the synthesis of stable neurotensin analogs for radiolabeling, fluorescein labeled stable NT(8-13) analogs were synthesized. The fluorescent dye FITC was coupled to the N-terminus of the peptide on solid-support. The introduction of the FITC-group had a negative influence on the receptor binding affinity. This reduced receptor affinity was limited by the introduction of an aminoalcohol spacer. It was shown that for the best analog the fluorescently labeled neurotensin is internalized in the cells.

The bombesin (BN) analogs were synthesized on a Rink amide resin using the Fmoc/OtBu solid-phase peptide synthesis strategy. All synthesized bombesin analogs were used for $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeling and therefore contain the (NaHis)Ac chelator. Since the His¹²-Leu¹³ peptide bond is very susceptible to enzymatic hydrolysis, new BN(7-14) analogs have been synthesized in which the Leu in position 13 was replaced by b²hLeu, b³hLeu and Cha. These changes led to the expected improved plasma stability, but only the analog containing the Cha instead of Leu retained affinity for the GRP receptor. To prevent oxidation of the sulfur of the Met residue it was replaced by Nle. The effect of the introduction of different spacer as well as the introduction of the hydrophilic shikimic acid through a Lys spacer between the BN(7-14) sequence ((NaHis)Ac-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Cha-Nle-NH₂) and the (NaHis)Ac chelator on the biodistribution profile of the peptide has been studied. The introduction of the shikimic acid in BBS-42 resulted in an enormous decrease in liver and kidney accumulation while maintaining high affinity for the GRP receptor. This analog, together with the bombesin analog BBS-43 in which the b³hSer-bAla-bAla spacer was introduced, are the first analogs which showed increasing target-to-non target ratios, indicating the much faster clearance from the non-target organs compared to the clearance from the target tissues. SPECT images have already been made with BBS-42 in nude mice bearing PC-3 tumor xenografts and showed a clear visualization of the tumor. These results look very promising for the further evaluation of these radiopharmaceuticals.

In a last part of this thesis, the carbonylation of bombesin analogs containing the (NaHis)Ac chelator via the Maillard reaction followed by Amadori rearrangement has been studied. Since the (NaHis)Ac moiety has an unusually reactive secondary α -amine, various chemical strategies have been explored to perform the Maillard reaction on peptides containing this chelator. The best results were obtained when the Maillard reaction was carried out on the resin bound peptides after construction of the chelator. However, difficult reaction control and poor RP-HPLC separation gave the peptide in only low yields. An alternative method, based on chemoselective oxime ligation, has already been tried on a bombesin sequence. The first experiments showed a selective reaction on the

hydroxylamine function and not on the secondary α -amine of the chelator. Although still some work is left in optimizing this strategy the first results look promising.