

Neuropeptid-Y-Analoga zur Brustkrebsdiagnostik: von der Synthese zur klinischen Anwendung**

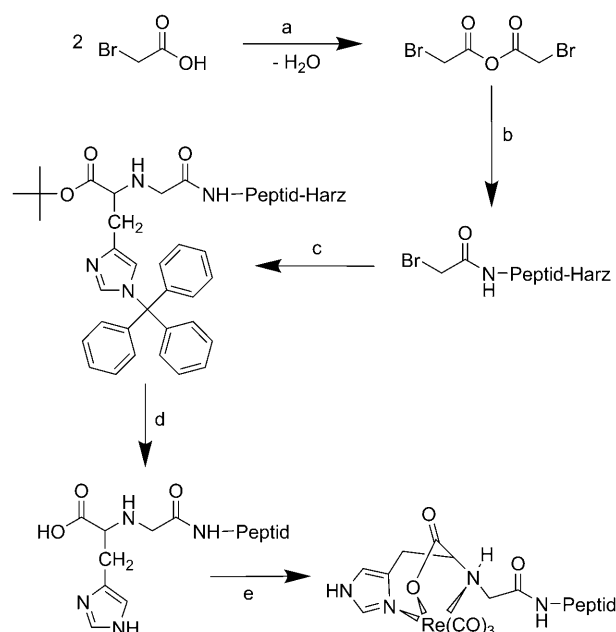
Irfan U. Khan, Denise Zwanziger, Ilka Böhme, Muhammad Javed, Hamid Naseer, Syed W. Hyder und Annette G. Beck-Sickinger*

In memoriam Rainer Rudolph

Brustkrebs ist bei Frauen nach wie vor die häufigste Krebs-erkrankung. Dabei verhindern oftmals starke Nebenwirkungen eine erfolgreiche Chemotherapie. Neue, spezifische Transportsysteme, welche die Nebenwirkungen reduzieren, sind ebenso essenziell für die Optimierung der Tumorthherapie wie Konzepte zur selektiven und frühzeitigen Diagnostik der Tumore. Das zur Familie der pankreatischen Polypeptide zählende Neuropeptid Y (NPY) ist ein C-terminal amidiertes Peptidhormon aus 36 Aminosäureresten.^[1,2] NPY bindet mit nanomolaren Affinitäten an verschiedene Y-Rezeptoren (Y₁, Y₂ und Y₅) und vermittelt über deren Aktivierung zahlreiche physiologische Funktionen. Die Signaltransduktion der Y-Rezeptoren, die zur Klasse A der Heptahelix-Rezeptoren gehören, erfolgt über ein heterotrimeres G-Protein.^[3,4]

Reubi et al. konnten die Expression der Y-Rezeptoren in humanen Brustkrebszellen aufzeigen, wobei über 90 % der untersuchten Brusttumore sowie 100 % der Metastasen den Y₁-Rezeptor exprimierten.^[5] Interessanterweise wurde dabei ein Wechsel der Rezeptorsubtyp-Expression vom Y₂-Rezeptor im gesunden Brustgewebe zum Y₁-Rezeptor im neoplastischen Gewebe beobachtet, der auf die zunehmende Entdifferenzierung des Brustkrebsgewebes zurückgeführt werden kann. Ausgehend von NPY und den Ergebnissen früherer Struktur-Aktivitäts-Studien für den Y₁-Rezeptor^[6] entwickelten und charakterisierten wir zwei NPY-Analoga zur Tumormarkierung, die sich in der Position des Chelators für die ^{99m}Tc-Markierung unterscheiden. Die Peptide **1a** und **2a** enthalten den N^α-Histidiny-Acetyl(N^αHis-ac)-Chelator^[7] am N-Terminus, wohingegen die Peptide **1b** und **2b** an der N^ε-Seitenkette von Lys⁴ modifiziert wurden. N^α-Histidiny-

Acetyl bildet als dreizähliger Ligand kinetisch stabile und biologisch aktive Komplexe.^[8,9] Die Modifikationen erfolgten nach einer effizienten Strategie (Schema 1), in deren erster



Schema 1. Synthese der Rhenium-komplexierten NPY-Analoga (siehe auch Tabelle S1 in den Hintergrundinformationen). Reagentien und Bedingungen: a) Diisopropylcarbodiimid in Dichlormethan, 20 min. b) NH₂-Peptid am Harz, Diisopropylethylamin (DIPEA), 2 h, Waschen mit Dimethylformamid (DMF). c) His(Trt)-OtBu in DMF, DIPEA, 24 h, Waschen und Trocknen; d) Abspaltung mit 95 % Trifluoressigsäure/5 % Thioanisol/Thiokresol. e) 5 % Überschuss an (NEt₄)₂[Re(CO)₃Br₃], pH 4.3, 37 °C und N₂, 2 h.

Stufe die Aktivierung von Bromessigsäure mit DIC zum Anhydrid erfolgte. Nach Zugabe von His(Trt)-OtBu sowie der Bildung der NH-CH-Bindung unter HBr-Eliminierung wurden die Peptide vom Harz abgespalten. In den In-vitro-Studien wurde Rhenium als Ersatz für ^{99m}Tc verwendet (Peptide **1c**, **1d**, **2c**, **2d**). Nach der Komplexierung der (N^αHis-ac)-Peptide mittels (NEt₄)₂[Re(CO)₃Br₃] und präparativer HPLC konnte Re(CO)₃-(N^αHis-ac)-NPY in 55 % Ausbeute erhalten werden. Kompetitive Bindungsassays mit [³H-Propionyl]-NPY und steigenden Konzentrationen an Peptid wurden an Zellen ausgeführt, welche die Rezeptoren Y₁- (SK-N-MC (humanes Neuroblastom) und MCF-7 (hu-

[*] Dr. I. U. Khan,^[†] D. Zwanziger,^[†] Dr. I. Böhme, Prof. Dr. A. G. Beck-Sickinger

Institut für Biochemie, Universität Leipzig
Brüderstraße 34, 04103 Leipzig (Deutschland)
Fax: (+49) 341-97-36909

E-Mail: beck-sickinger@uni-leipzig.de
Homepage: www.biochemie.uni-leipzig.de/agbs

Dr. I. U. Khan,^[†] M. Javed, H. Naseer, S. W. Hyder
Institute of Nuclear Medicine and Oncology (INMOL)
New Campus Road, 54600 Lahore (Pakistan)

[†] Gleichgestellte Autoren.

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (FOR630/BE 1264-9 und Graduiertenschule BuildMoNa), EFRE (Grant 3370701481201) und dem DAAD (Finanzierung von I.U.K.) gefördert. Wir danken allen technischen Assistenten für ihre Arbeit.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200905008> zu finden.

Tabelle 1: In-vitro-Bindungsdaten der NPY-Analoga.

		SK-N-MC	MCF-7	IC ₅₀ [nM] SMS-KAN	HEC-1b-hY ₅
1c	Re(CO) ₃ -(N ^α His-ac)-NPY	3.9 ± 0.3	17.0 ± 6.5	3.2 ± 1.3	29.8 ± 1.9
1d	Lys ⁴ (Re(CO) ₃ -(N ^α His-ac))-NPY	10.5 ± 3.9	8.5 ± 6.5	6.1 ± 2.6	27.3 ± 5.1
2c	Re(CO) ₃ -(N ^α His-ac)-[Phe ⁷ ,Pro ³⁴]NPY	11.8 ± 2.6	26.9 ± 5.2	106.3 ± 22.2	> 1000
2d	Lys ⁴ (Re(CO) ₃ -(N ^α His-ac))-[Phe ⁷ ,Pro ³⁴]NPY	1.3 ± 0.1	5.2 ± 1.0	97.5 ± 11.9	208.4 ± 8.0

manes Brustadenokarzinom)), Y₂- (SMS-KAN (humanes Neuroblastom)) und Y₅- (HEC-1b-hY₅ (humanes Endometriumkarzinom))^[10] exprimieren. Die Peptide **1c** und **1d** zeigten dabei am Y₁- und Y₂-Rezeptor ähnliche IC₅₀-Werte sowie eine geringfügig reduzierte Affinität für den Y₅-Rezeptor. Dagegen konnte eine selektive, nanomolare Y₁-Rezeptor-Bindung für die Peptide **2c** und **2d** beobachtet werden (Tabelle 1). Dabei hat die Re(CO)₃-(N^αHis-ac)-Modifikation keinen signifikanten Einfluss auf die Bindungsaffinität der Peptide.

Eine Y-Rezeptor-Internalisierung findet nach agonistischer Stimulation statt^[11] und kann die Markierungseffizienzen deutlich erhöhen. Signaltransduktionsassays wurden daher nach der Cotransfektion des humanen Y₁-Rezeptors mit einem chimären Gα_q-Protein in COS7-Zellen (Grüne Meerkatze, Nieren)^[12,13] durchgeführt. Die EC₅₀-Werte von **1c**, **1d**, **2c** und **2d** bestätigten die Ergebnisse des Bindungsassays und zeigten eine agonistische Aktivität der Peptide (Abbildung 1b). Die Internalisierung von **1c**, **1d**, **2c** und **2d** wurde mikroskopisch eingehend untersucht. Nach der Stimulation mit 1 μM Peptid in hY₁-EYFP-HEK293-Zellen konnte eine vollständige Y₁-Rezeptor-Internalisierung beobachtet werden. Die Verwendung coexprimierender hY₁-EYFP- und hY₂-ECFP-HEK293-Zellen ermöglichte die Untersuchung der Selektivität. Abbildung 1a zeigt dabei, dass die Peptide **1c** und **1d** zu einer Internalisierung beider Rezeptor-Subtypen führen, wohingegen die Peptide **2c** und **2d** eine selektive Y₁-Rezeptor-Internalisierung aufweisen.

Die metabolische Stabilität von **1c**, **1d**, **2c** und **2d** wurde durch die Bestimmung der Halbwertszeiten in humanem Blutplasma ermittelt. Dafür wurden die Peptide sowohl am N-Terminus als auch an der N^ε-Seitenkette des Lys⁴ mit Carboxyfluorescein (CF) markiert.^[14] Es konnten Halbwertszeiten zwischen 9.9 und 32 h ermittelt werden, die für die Peptide **2c** und **2d** etwas kürzer sind als t_{1/2} = (24.7 ± 1.4) h für NPY (Abbildung 1c).^[15,16]

Die radiochemische Markierung der Y₁-Rezeptor-selektiven Peptide **2a** und **2b** wurde unter Verwendung eines klinisch zugelassenen Protokolls mit ^{99m}Tc^V durchgeführt.^[17–19] Der erhaltene Komplex wird im Folgenden als ^{99m}Tc(core)³⁺ bezeichnet. Die Wechselwirkung zwischen Plasmaproteinen und Peptiden hat einen Einfluss auf das pharmakokinetische Verhalten (Bioverteilung, Metabolismus, Exkretion und Dosisaktivität).^[20] Daher bestimmten wir im humanen Blut die Bindung der ^{99m}Tc(core)³⁺-markierten Peptide **2a** und **2b** an Plasmaproteine. Die Ergebnisse belegen zudem die Radio-stabilität des Komplexes. Zu Beginn zeigte **2a** eine geringere Proteinbindung, die nach 3 h Inkubation jedoch die Bindung von **2b** überschritt (Abbildung 2c).

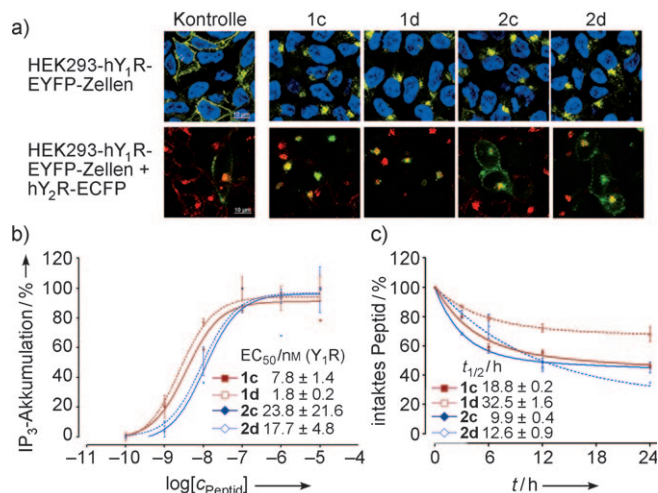


Abbildung 1. Rhenium-markierte NPY-Analoga internalisieren in Y₁-Rezeptor-exprimierende Zellen und zeigen einen langsamen proteolytischen Abbau im humanen Blutplasma. a) HEK293-Zellen, stabil transfiziert mit hY₁R-EYFP-Rezeptoren (oben: Rezeptoren in Gelb), und transient cotransfiziert mit hY₂-ECFP-Rezeptoren (unten: Y₁-Rezeptoren in Rot, Y₂-Rezeptoren in Grün) wurden 60 min mit 1 μM der Peptide **1c**, **1d**, **2c** oder **2d** inkubiert. Die Ergebnisse bestätigen die selektive Internalisierung der Peptide **2c** und **2d**. b) EC₅₀-Kurven und -Werte aus einem ³H-Myo-Inosit-IP₃-Signaltransduktionsassay unter Verwendung transient coexprimierender hY₁- und Gα_q-COS7-Zellen. c) Bestimmung der Halbwertszeit der Peptide **1c**, **1d**, **2c** und **2d** in humanem Blutplasma als Maß für die metabolische Stabilität.

Die Bioverteilung der ^{99m}Tc(core)³⁺-markierten Peptide **2a** und **2b** wurde in verschiedenen Organen gesunder Kaninchen ermittelt. **2a** zeigte dabei eine geringere Aufnahme als **2b**, die Retentionszeit war aber deutlich höher (Abbildung 2a,b). Das Peptid **2a** weist demzufolge eine optimale renale Exkretion für die Aufnahme in den Tumor auf und vermeidet die unspezifische Freisetzung aus den Organen.

Weder NPY noch NPY-Analoga wurden bisher in klinischen Studien zur Brustkrebsdiagnostik eingesetzt. Aufgrund der präklinischen Ergebnisse wurde das Peptid **2a** für die Ganzkörper-Szintimammographie an vier Brustkrebspatientinnen in unterschiedlichen Krankheitsstadien eingesetzt (Abbildung 3). Die ^{99m}Tc-MDP-Knochenszintigraphie diente als Kontrolle; bei diesem Verfahren reichert sich radiochemisch markiertes Methylendiphosphat (MDP) in den Osteoblasten an, sodass mögliche Knochenmetastasen detektiert werden können.^[21,22] Des Weiteren erfolgte als Negativkontrolle die intravenöse Injektion des Peptids **2a** in eine gesunde Probandin, die bei der szintigraphischen Untersuchung

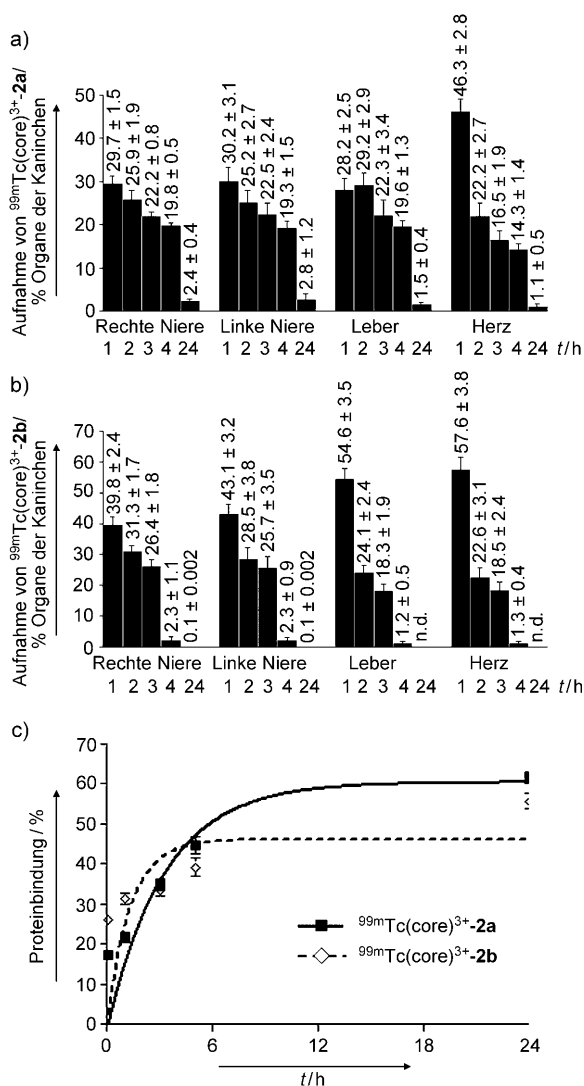


Abbildung 2. Effektive renale Exkretion und schnelle Freisetzung aus den Organen im Kaninchen sowie eine entsprechende Proteinbindung der $^{99m}\text{Tc}(\text{core})^{3+}$ -markierten Peptide **2a** und **2b**. a,b) In-vivo-Aufnahme (in Prozent) nach intravenöser Injektion von 3–5 mCi der Peptide im Kaninchen zu verschiedenen Zeiten (n.d.: nicht detektierbar). c) Proteinbindung in Prozent nach der Inkubation von 2 mCi der Peptide in humanem Blut nach verschiedenen Zeiten.

keine Aufnahme des Peptids im Brustgewebe zeigte (Abbildung 3a).

Das Szintigramm von Patientin 1 zeigt eine deutliche Aufnahme in einen Tumor in der rechten Brust (Abbildung 3b,c), wohingegen bei der Knochenszintigraphie eine normale und symmetrische Verteilung von ^{99m}Tc -MDP beobachtet wurde (Abbildung 3d). Analoge Ergebnisse lieferte die Untersuchung von Patientin 2, wobei Knochenmetastasen aufgrund der radioaktiven Verteilung ausgeschlossen werden konnten (Abbildung 3e–g). Eine deutliche Aufnahme in einen Tumor in der linken Brust ließ sich bei Patientin 3 beobachten (Abbildung 3h,i). Das Szintigramm von Patientin 4 zeigte hingegen die Markierung nicht nur eines Tumors in der rechten Brust, sondern auch der vom Tumor abstammenden Metastasen (Abbildung 3k). Dies bestätigte das Knochen-

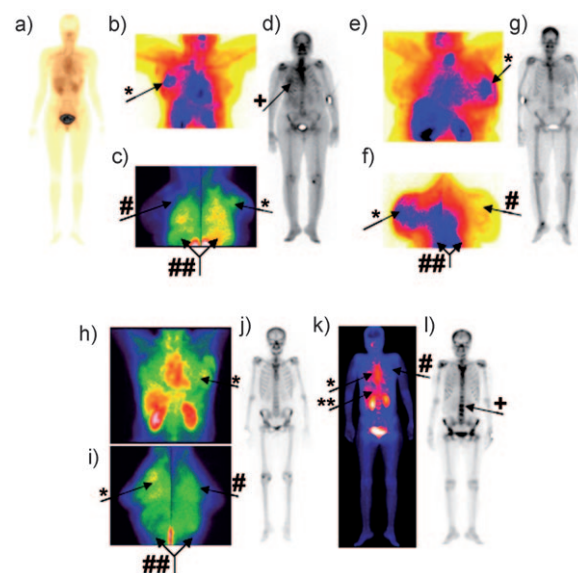


Abbildung 3. Studie zur Aufnahme des $^{99m}\text{Tc}(\text{core})^{3+}$ -markierten Peptids **2a** in Brustkrebspatientinnen mithilfe von Ganzkörper-Szintimamographie: a) keine spezifische Aufnahme des Peptids in der gesunden Probandin; b–d) Patientin 1; e–g) Patientin 2; h–j) Patientin 3; k–l) Patient 4. b,e,h,k) Detektion der Radioaktivität im Tumor 60 min nach intravenöser Injektion. c,f,i) Laterale Ansicht der rechten und linken Brust mit einer spezifischen Akkumulation im tumorösen Brustgewebe. (* Aufnahme, # keine Aufnahme, ## Hintergrund, ** Aufnahme durch Metastasen). d,g,j,l) Knochenszintigramme zeigen 2.5 h nach der intravenösen Injektion eine geringe Aufnahme von ^{99m}Tc -MDP in das zum Tumor gerichtete Knochengewebe (+ Aufnahme).

szintigramm durch eine erhöhte Akkumulation in der zum Tumor ausgerichteten Knochenstruktur, was überdies mit dem Krankheitsbild der Patientin übereinstimmte (Abbildung 3l). Somit konnten wir in unseren Studien eine deutliche Aufnahme des für den $^{99m}\text{Tc}(\text{core})^{3+}$ -markierten Y_1 -Rezeptor selektiven Peptids **2a** in Brustkrebspatientinnen zeigen, während im normalen Gewebe und in den Organen nur eine Hintergrundstrahlung verzeichnet wurde. Außerdem war es möglich, vom Tumor abstammende Metastasen in anderen Organen zu detektieren. Das Fehlen von Radioaktivität im Gehirn spricht dafür, dass das Peptid die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden kann. Dieser Faktor minimiert mögliche Nebenwirkungen bei einer Behandlung.

Die hier vorgestellten Ergebnisse umfassen die Entwicklung und Charakterisierung Y_1 -Rezeptor-selektiver Peptide. Präklinische und erste klinische Studien verdeutlichen das Potenzial der Brustkrebsdiagnostik anhand des Y_1 -Rezeptors zur spezifischen Darstellung des Tumorgewebes. Künftig könnte diese selektive Anreicherung im Tumor genutzt werden, um Nebenwirkungen in der Chemotherapie über den gezielten Transport zytotoxischer Derivate zu minimieren. Des Weiteren ist die Anwendung aufgrund der Y -Rezeptor-Expression in anderen Tumoren (Neuroblastom, Glioblastom, Ovarialadenokarzinom, gastrointestinaler Stromatumor, Nephroblastom, Nierenzellkarzinom und Phäochromozytom^[5,23,24]) nicht ausschließlich auf Brustkrebs beschränkt.

Experimentelles

Nähere Details sind in den Hintergrundinformationen zu finden.

Die Tierstudien wie auch die klinischen Studien wurden am Institute of Nuclear Medicine and Oncology (Lahore, Pakistan) entsprechend den Richtlinien und Verordnungen des Landes (NMOL 53/07) durchgeführt. Die klinischen Studien erfolgten nach Aufklärung mit schriftlichem Einverständnis der Patientinnen und der Probandin.

Eingegangen am 7. September 2009

Online veröffentlicht am 4. Januar 2010

Stichwörter: Neuropeptid Y · Peptide · Rezeptoren · Tumordiagnose

- [1] K. Tatemoto, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, 79, 5485–5489.
- [2] T. Pedrazzini, F. Pralong, E. Grouzmann, *Cell. Mol. Life Sci.* **2003**, 60, 350–377.
- [3] M. C. Michel, A. Beck-Sickinger, H. Cox, H. N. Doods, H. Herzog, D. Larhammar, R. Quirion, T. Schwartz, T. Westfall, *Pharmacol. Rev.* **1998**, 50, 143–150.
- [4] P. M. Rose, P. Fernandes, J. S. Lynch, S. T. Frazier, S. M. Fisher, K. Kodukula, B. Kienzle, R. Seethala, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 22661–22664.
- [5] J. C. Reubi, M. Gugger, B. Waser, J. C. Schaer, *Cancer Res.* **2001**, 61, 4636–4641.
- [6] R. M. Soll, M. C. Dinger, I. Lundell, D. Larhammer, A. G. Beck-Sickinger, *Eur. J. Biochem.* **2001**, 268, 2828–2837.
- [7] P. A. Schubiger, L. Allemann-Tannahill, A. Egli, R. Schibli, R. Alberto, N. Carrel-Remy, M. Willmann, P. Blauenstein, D. Tourwe, *Q. J. Nucl. Med.* **1999**, 43, 155–158.
- [8] D. R. van Staveren, S. Mundwiler, U. Hoffmanns, J. K. Pak, B. Spingler, N. Metzler-Nolte, R. Alberto, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2, 2593–2603.
- [9] D. R. van Staveren, N. Metzler-Nolte, *Chem. Commun.* **2002**, 1406–1407.
- [10] C. Moser, G. Bernhardt, J. Michel, H. Schwarz, A. Buschauer, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **2000**, 78, 134–142.
- [11] I. Bohme, J. Stichel, C. Walther, K. Mörl, A. Beck-Sickinger, *Cell. Signalling* **2008**, 20, 1740–1749.
- [12] I. Bohme, K. Morl, D. Bamming, C. Meyer, A. G. Beck-Sickinger, *Peptides* **2007**, 28, 226–234.
- [13] N. Merten, D. Lindner, N. Rabe, H. Römpler, K. Mörl, T. Schöneberg, A. Beck-Sickinger, *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 7543–7551.
- [14] P. J. Weber, J. E. Bader, G. Folkers, A. G. Beck-Sickinger, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 597–600.
- [15] I. U. Khan, R. Reppich, A. G. Beck-Sickinger, *Biopolymers* **2007**, 88, 182–189.
- [16] D. Zwanziger, I. U. Khan, I. Neundorff, S. Sieger, L. Lehmann, M. Friebe, L. Dinkelborg, A. G. Beck-Sickinger, *Bioconjugate Chem.* **2008**, 19, 1430–1438.
- [17] G. Ferro-Flores, C. Arteaga de Murphy, J. Rodriguez-Cortés, M. Pedraza-López, M. T. Ramírez-Iglesias, *Nucl. Med. Commun.* **2006**, 27, 371–376.
- [18] R. Schibli, R. La Bella, R. Alberto, E. Garcia-Garayoa, K. Ortner, U. Abram, P. A. Schubiger, *Bioconjugate Chem.* **2000**, 11, 345–351.
- [19] E. G. Eising, C. Reiners, *Nucl. Med. Commun.* **1998**, 19, 241–250.
- [20] P. E. Rolan, *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1994**, 37, 125–128.
- [21] G. Subramanian, J. G. McAfee, *Radiology* **1971**, 99, 192–196.
- [22] R. Bares, *Q. J. Nucl. Med.* **1998**, 42, 43–48.
- [23] M. Korner, B. Waser, J. C. Reubi, *Lab. Invest.* **2004**, 84, 71–80.
- [24] M. Korner, B. Waser, J. C. Reubi, *Int. J. Cancer* **2005**, 115, 734–741.