

Modifikation und Radiomarkierung von Mikroprotein (2.5D) ^{68}Ga

B. Sandhöfer¹, M. Danschdar², H-U. Schmoldt², U. Sahin², T.L. Ross¹, F. Rösch¹,

¹Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Germany

²BioNTech AG, Mainz, Germany

Mikropoteine besitzen eine Cystein-Knoten-Struktur bestehend aus drei spezifischen Disulfid-Brücken und können durch evolutives Screening mit einer Affinität gegenüber spezifischen Targets ausgestattet werden. Da diese Strukturen, die auch MicrobodiesTM genannt werden, relativ robust gegenüber Temperatur, pH und organische Lösungsmittel sind, eignen sie sich hervorragend zum Einsatz als Tracer oder Therapeutikum in der Nuklearmedizin.

Zunächst ist in diesem Projekt geplant, die technische Durchführbarkeit der Konjugation mit bifunktionellen Chelatoren und die Radiomarkierung zu zeigen. Dabei sollen Chelatoren wie DOTA, NOTA und DFO zum Einsatz kommen, um eine Radiomarkierung mit den Radiometallen Gallium-68, Lutetium-177, Scandium-44 und Niob-90 zu ermöglichen. Als Modellprotein wird dabei der Integrin-binder 2.5D [1] verwendet, der durch E. Coli produziert und später isoliert wird. Da 2.5D ausschließlich eine N-terminale Amino-Gruppe trägt, ist eine einfache N-terminale Konjugationschemie möglich.

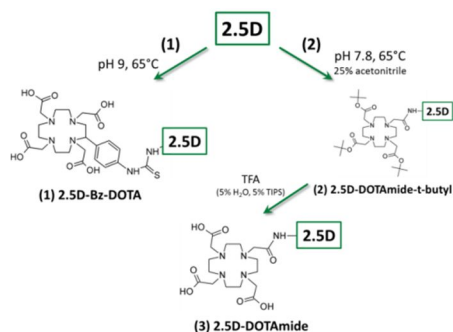
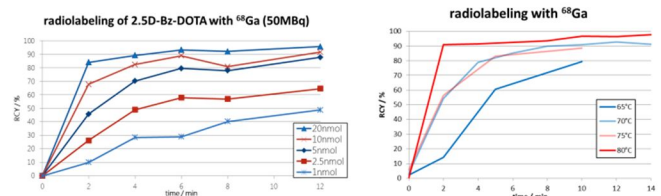


Abbildung 1 zeigt die Kopplung des bifunktionellen Chelators an den N-Terminus unter Ausnutzung zweier unterschiedlicher reaktiven Gruppen. Weg (1) weist nahezu quantitative Ausbeuten auf, ermöglicht jedoch keine Abtrennung des ursprünglichen vom modifizierten Mikroprotein, während Weg (2) wegen einer geschützten Zwischenstufe eine ungeträgerte Produktisolierung zulässt.

Beide Varianten weisen somit Vor- und Nachteile in Bezug auf Konjugationschemie, Trägerungscharakter und Ausbeuteminderung durch preparative Abtrennung auf. Lediglich eine zusätzliche freie Säuregruppe im Falle des 2.5D-Bz-DOTA kann Einfluss auf spätere Markierungseigenschaften besitzen.

Im Anschluss wurden erste Markierungsstudien mit beiden erfolgreich synthetisierten Derivaten durchgeführt. Dabei kamen die Radiometalle ^{68}Ga als PET-Nuklid und ^{177}Lu als potentielles Therapie-Nuklid zum Einsatz. Es konnte gezeigt werden, dass im Falle des ^{68}Ga ab einer Temperatur von 70°C in einer Zeit von 10 min sehr gute Markierungsausbeuten erreicht werden können. Dazu

notwendige Vorläufermengen belaufen sich auf größer 5 nmol (Abbildung 2).



Markierungen wurden in 0,1M Acetatpuffer pH 3.5 mit Aktivitäten von ca. 50MBq (*cation exchange post processing*) durchgeführt. Die Bestimmung der Markierungsausbeute stützt sich auf Radio-TLC (1: 0,25M Citrat-Lösung; 2: 0,25M Citrat-Lösung, 30% Acetonitril) und Radio-HPLC. Als HPLC-Säule wurde in diesem Fall eine Chromolith® C18 (Merck) verwendet, welche ein Analyseergebnis innerhalb von 3 min zulässt, was bei höherer Signal-Sensitivität einen zeitlichen Vorteil gegenüber der Radio-TLC bedeutet.

Markierungen mit ^{177}Lu wurden analog durchgeführt. 10 nmol Peptid wurden in 0,1M Acetat-Lösung (pH 7,8) vorgelegt und bei 75°C mit 30MBq einer ^{177}Lu -Chlorid-Lösung versetzt.

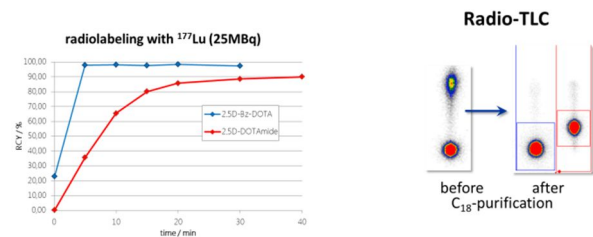


Abbildung 3 zeigt, dass abhängig von der Anzahl der freien, zur Komplexierung befähigten, Acetat-Gruppen, quantitative Markierungen mit ^{177}Lu innerhalb kürzester Zeit möglich sind. Zur Aufreinigung können C₁₈-Kartuschen (Altech®, 300mg, large pore) verwendet werden, welche ein Recovery von $\geq 90\%$ ermöglichen. In Zukunft sind Stabilitäts- und Affinitätsstudien, sowie Markierungen mit weiteren Radiometallen geplant.

Acknowledgments: Wir möchten der BioNTech Mainz für die Mithilfe und Bereitstellung von Ausgangssubstanzen bei dieser Kooperation danken.

References

[1] R.H. Kimura, Z. Cheng, S.S. Gambhir, J.R. Cochran. Cancer Res. 2009, Mar 15;69(6):2435-42.