

**Aus der Klinik für Nuklearmedizin im Universitätsklinikum
Schleswig-Holstein, Campus Kiel an der Christian-Albrechts-
Universität zu Kiel
(Komm. Direktor Dr. U. Lützen)**

**BIODISTRIBUTION UND PHARMAKOKINETIK VON ^{99m}Tc-
MARKIERTEM ELAFIN IM RATTEN MODELL**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Angelina Larissa Tjiong

aus Köln

Kiel 2014

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. M. Zuhayra
2. Berichterstatter: Prof. Dr. O. Jansen

Tag der mündlichen Prüfung: 08.03.2016
Zum Druck genehmigt. Kiel, den 08.03.2016
gez. Prof. Dr. J. Roider
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	5
1.1	Proteasen	5
1.2	Protease-Inhibitoren	7
1.3	Beschreibung von Elafin	9
1.3.1	Struktur von Elafin	9
1.3.2	Vorkommen von Elafin	10
1.3.3	Klinische Bedeutung von Elafin	11
1.4	Elafin-ähnliche Proteine: SLPI	12
1.5	Ziel der Untersuchung	15
1.6	Fragestellung der Arbeit	15
2.	MATERIAL	16
2.1	Versuchstiere	16
2.2	Herkunft von humanem Elafin	16
2.3	Herstellung von ^{99m}Tc	17
2.4	Synthese von Hydrazinonicotinamide gekoppeltem Elafin (HYNIC-Elafin)	17
2.5	Synthese von ^{99m}Tc - Elafin	17
2.6	Radioaktivität von ^{99m}Tc-Elafin und ^{99m}Tc-Per technetat	18
3.	METHODEN	19
3.1	Chirurgische Intervention	19
3.2	Radioaktivitätsmessungen	19
3.3	HPLC und HPLC-MS Analyse	19
3.4	Szintigraphische Bilder	20
3.5	Magnet Resonanz Tomographie (MRT)	21
3.6	Metabolische Stabilität im Rattenplasma	21
3.7	Pharmakokinetische Analyse	22
3.8	Statistische Datenanalyse	22
3.9	Design der Studie	23
3.10	Dynamische und Hi-SPECT Aufnahmen	25
3.11	Organentnahme und Radioaktivität	26
3.12	Semi-quantitative Analyse der Bilddaten	26
4.	ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNGEN	28
4.1	Synthese von HYNIC-gekoppeltem Elafin	28
4.2	Markierung und radiochemische Analyse	29
4.3	Metabolische Stabilität im Plasma	29
4.4	Analyse der Biodistribution	30
4.5	Pharmakokinetische Analyse	33
4.6	Hi-SPECT - Szintigraphie	33
4.7	Dynamische Nierenzintigraphie	36
4.8	Organverteilung in den entnommenen Organen	37
5.	DISKUSSION DER ERGEBNISSE	39
6.	ZUSAMMENFASSUNG	44
7.	LITERATURVERZEICHNIS	45
8.	ABKÜRZUNGEN	51

9.	DANKSAGUNG.....	53
10.	LEBENS LAUF	54
11.	ANHANG	55

1. EINLEITUNG

1.1 Proteasen

Proteasen, auch Proteinasen oder Peptidasen genannt, gehören zu einer großen Gruppe von proteolytischen Enzymen, den sogenannten Hydrolasen. Sie katalysieren die hydrolytische Spaltung von Peptidbindungen. Proteasen sind ubiquitär, d.h., sie kommen in allen Geweben und Zellen vor und sind für deren Existenz essentiell. Sie sind in zahlreichen metabolischen Prozessen angefangen von der einfachen Verdauung der Nahrungsproteine bis hin zu hochkomplexen Aufgaben z.B. im Blutgerinnungssystem involviert. Ein Überschuss oder deren unkontrollierte Freisetzung jedoch führen zu Erkrankungen, zum Beispiel zu Erkrankungen des zentralen Nerven- und des kardiovaskulären Systems, entzündlichen und neurodegenerativen Erkrankungen sowie viralen und parasitären Infektionen (Abbenante und Fairlie, 2005). Spezifische Mutationen in Protease-Genen sind bekanntlich verantwortlich für mehr als fünfzig Erkrankungen (Puente et al. 2003). Es scheint sehr wahrscheinlich, dass mehrere Faktoren u.a. die Mutation oder Regulation der Protease-Vorstufen, Co-Faktoren, Rezeptoren, Transportsysteme und der endogene Protease Inhibitor einen indirekten Einfluss auf die Protease Aktivität haben (Abbenante und Fairlie, 2005).

Je nach Vorkommen wird zwischen intra- und extrazellulären Proteasen unterschieden. *Intrazelluläre* Proteasen übernehmen in zahlreichen Zellkompartimenten verschiedenste Aufgaben: u.a. die Überführung der hergestellten Proteine in den aktiven Zustand nach Spaltung von Peptidfragmenten und den Abbau von defekten oder nicht mehr gebrauchten Proteinen in den Lysosomen. Sie sind an der Bildung von Antigenen beteiligt. Signalpeptidasen spalten Signalpeptide von den Proteinen ab.

Extrazelluläre Proteasen findet man bei tierischen Organismen im Verdauungstrakt, wo sie die Nahrungsmittelproteine spalten. Sie kommen auch in anderen extrazellulären Flüssigkeiten vor, wo sie hochspezifische Aufgaben übernehmen z.B. als Proteasen des Blutgerinnungs- und fibrinolytischen Systems.

Je nach Angriffsort der Proteasen in der Peptidbindung der Polypeptidkette wird zwischen *Exopeptidasen* und *Endopeptidasen* unterschieden. Exopeptidasen hydrolysieren die außen liegende Bindungen der Polypeptidkette entweder am N-Terminus (Aminopeptidasen) oder

am C-Terminus (Carboxypeptidasen). Es gibt auch Exopeptidasen, die Di- bzw. Tripeptide spalten (Di- und Tripeptidasen). Endopeptidasen spalten meist spezifisch an einer bestimmten Stelle innerhalb der Polypeptidkette. Spaltprodukte sind Peptide verschiedener Länge (Pschyrembel, 2002). Entsprechend dem katalytisch relevanten Faktor im aktiven Zentrum, der für die Funktionalität von entscheidender Bedeutung ist, werden die Proteasen unterteilt in Serinproteasen (z.B. Trypsin, Chymotrypsin, Thrombin, Plasmin), Aspartatproteasen (z.B. Pepsin, Labferment, Kathepsin D), Cysteinproteasen (z.B. Kathepsin B), Metalloproteasen (z.B. Kollagenasen) und Threonylproteasen (z.B. Proteasom) (Pschyrembel, 2002).

Proteasen spielen eine wichtige Rolle in der Lunge. Sie sind unverzichtbar bei homöostatischen sowie bei regulatorischen Prozessen wie Regeneration und Reparatur. Sie regeln das Gleichgewicht zwischen Aufbau und Abbau von Gewebe. Bei Fehlen von Proteasen oder einer Überaktivität durch beispielweise fehlende Hemmung kann es zu schwerwiegenden Erkrankungen der Lungen kommen wie beispielsweise Fibrose und Emphysem. Das Vorhandensein von endogenen Kontrollmechanismen, die die Aktivität der Protease regulieren, ist essentiell für den Ablauf und die Eindämmung von entzündlichen Prozessen in der Lunge (Greene et al. 2009). Chronische Erkrankungen der Lunge gehen mit erhöhten Werten von Proteasen einher. Dies hat nicht primär eine negative Wirkung auf das Lungengewebe, kann aber auch bei dem resultierenden Ungleichgewicht zu einer Schädigung der Lunge führen (Greene et al. 2009).

Die vorherrschenden Proteasen in der menschlichen Lunge sind die Serin-, Cystein-, Aspartat- und die Metalloproteasen. Diese können sowohl intrazellulär als auch extrazellulär wirken und somit Prozesse wie beispielweise Remodelling von Gewebe, Muzinsekretion, neutrophile Chemotaxis und Tötung von Bakterien beeinflussen (Greene et al. 2009).

Eine besondere Rolle innerhalb der Proteasen spielt die Neutrophile Elastase (NE). Die NE ist ein 218 Aminosäuren langes prä-pro Enzym. Es reguliert die Expression von Cathepsin B und MMP (Matrix Metallo-Protease)-2 in Alveolarmakrophagen (Geraghty et al. 2007) und aktiviert darüber hinaus pro MMP2, MMP7 und MMP9 (Imai et al. 1995, Ferry et al. 1997, Shamamian et al. 2001). Die NE wird in der azurophilen Granula von neutrophilen Granulozyten gespeichert (Borregaard und Cowland, 1997, Lominadze et al. 2005). Neben seiner Rolle als Protease hat die NE noch proinflammatorische Eigenschaften (Greene et al. 2009), degradiert Virulenzfaktoren und wirkt antibakteriell (Lehrer und Ganz, 1990, Belaouaj et al. 2000, Weinrauch et al. 2002). Bei Fehlen von NE in Knockoutmäusen kommt

es zu einer vermehrten Anfälligkeit gegenüber Pilz- oder bakteriellen Infektionen (Belaouaj et al. 1998, Aratani et al. 1999, Tkalcevic et al. 2000, Gaut et al. 2001, Belaouaj, 2002). Sie spielt eine wesentliche Rolle bei einer Vielzahl von entzündlichen Erkrankungen wie beispielweise der idiopathischen pulmonalen Fibrose, der rheumatoiden Arthritis, ARDS (Acute Respiratory Distress Syndrome) oder der zystischen Fibrose (Döring 1994).

1.2 Protease-Inhibitoren

Protease Inhibitoren hemmen die Peptidasen, proteinspaltende Enzyme, und verhindern somit den Abbau von Proteinen. Die natürlichen oder körpereigenen Proteaseinhibitoren sind für die Regulation der Peptidasen zuständig. In der Regel sind sie selbst Peptide oder Proteine und können die regulierenden Funktionen der Proteasen bei der Konzeption, Geburt, Entwicklung und Alterung sowie bei Erkrankungen blockieren. Genetische sowie Umwelteinflüsse können eine Über- oder Unterproduktion von Proteasen oder deren natürlichen Inhibitoren zur Folge haben, was zu einem abnormalen Stoffwechsel und damit zur Erkrankung führen kann.

Proteaseinhibitoren in der Lunge schützen die Lunge gegen Serinproteasen beispielweise gegen NE. Eines der wichtigsten Proteaseinhibitoren im Serum ist das Akut-Phasen-Protein α_1 -Antitrypsin (Synonym: α_1 -Proteinasen-Inhibitor), ein 52 kDa-Glykoprotein mit einer einfachen Kette von 394-Aminosäuren, das überwiegend in der Leber gebildet und in die Blutbahn ausgeschüttet wird (Brantly et al. 1988). Normalerweise liegt die Serumkonzentration bei 150-300 mg/dl bei einer täglichen Syntheserate von 34mg/kg (Biedermann und Köhnlein, 2006). Sie ist in allen Körpergeweben nachweisbar, scheint aber in erster Linie in der Lunge physiologisch bedeutsam zu sein (Biedermann und Köhnlein, 2006). α_1 -Antitrypsin spielt eine wichtige Rolle bei der Hemmung zahlreicher Enzyme, die bei Entzündungsprozessen freigesetzt werden. Es hemmt u.a. die Proteasen Trypsin, NE, Chymotrypsin, Plasmin und Thrombin. Bei einem Defizit von α_1 -Antitrypsin kommt es zu einer ungezügelter Aktivität dieser Enzyme. Von größerer klinischer Bedeutung ist die mangelnde Hemmung der NE in der Lunge. Ein α_1 -Antitrypsin-Mangel führt zu dem sog. Laurell-Eriksson-Syndrom, einer autosomal-rezessiven Stoffwechselerkrankung, bei der es in der Lunge durch mangelhafte Hemmung der NE zu einer Zerstörung des Lungengerüsts durch Elastin kommt, was weiterhin eine chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) mit progredienten Lungenemphysem zur Folge hat (Biedermann et al. 2006, Malerba et al.

2006, Fregonese et al. 2008, Teckman, 2013). In der Leber kommt es durch eine Aggregation und Akkumulation von α_1 -Antitrypsin im endoplasmatischen Retikulum der Hepatozyten zu einer fibrotischen Umwandlung der Hepatozyten mit Übergang zur Leberzirrhose als Endstadium (Stoller et al. 2005, Teckman, 2013). Andere Protease Inhibitoren, die die Lungen gegen die Serinprotease NE schützen, sind der Secretory- Leukocyte-Proteinase-Inhibitor (SLPI) (Kramps et al, 1991) und die Elafin / Skin-derived-Antileuko-proteinase (SKALP) (Pfundt et al. 1996). Im Gegensatz zu dem α_1 -Proteaseinhibitor werden sie lokal in der Lunge produziert. Elastase und deren Inhibitoren scheinen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Angiogenese zu spielen (Wong und Langille, 1996).

Niedermolekulare Protease Inhibitoren werden in der Arzneitherapie gegen diverse Erkrankungen angewandt u.a. bei Krebs, z.B. der Metalloprotease-Inhibitor (Johnson et al. 1998, Kähäri et al. 1999, Drummond et al. 1999), der Tyrosinkinase-Inhibitor (Levitzki et al. 2006), der Multikinase-Inhibitor (Grothey et al. 2013), bei viralen Erkrankungen z.B. der HIV-1 Protease-Inhibitor (Rutenberger et al. 1993, Wlodawer et al. 1998), der Inhibitor gegen NS3 Protease vom Hepatitis C Virus (Tsantrizos, 2004, Abian et al. 2013) sowie gegen Herpesviren (Flynn et al 1997, Waxman et al. 2000). Als Antihypertensiva zur Behandlung des Bluthochdruckes finden die Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE-Hemmer) Anwendung. Thrombin-Inhibitoren (z.B. Dabigatran) werden zur Vorbeugung eines apoplektischen Insultes z.B. bei Vorhofflimmern eingesetzt.

Miyoshi et al. 2013 untersuchten die Nützlichkeit eines selektiven NE-Inhibitors (Sivelestat) bei Patienten mit akuter Lungenschädigung im Rahmen von SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome). Abbenante et al. 2005 beschrieben, wie effektiv niedermolekulare Inhibitoren der Aspartat-, Serin-, Cystein-, Metallo- und Threonin-Proteasen die Enzyme hemmen, und die als Potential für die Entwicklung neuer Medikamente dienen können.

Von den vielen bisher entwickelten Proteaseinhibitoren halten nur wenige den klinischen Tests stand und können wegen ihrer Effektivität und relativen Sicherheit als Medikamente zur Behandlung von Krankheiten mit Erfolg eingesetzt werden. Darunter fallen insbesondere die ACE-, Thrombin- und die HIV-1-Proteaseinhibitoren.

1.3 Beschreibung von Elafin

Das Protein Elafin, auch bekannt als Peptidase-Inhibitor 3 oder SKALP (Skin derived Antileukoprotease), ist ein 6 kDa großes natürliches, lösliches, endogenes Protein. Es ist ein „canonical“ Proteaseinhibitor wie auch die neutrophilen Serinproteasen NE und Proteinase 3, die bereits im Jahre 1990 entdeckt wurden. Elafin besitzt die Fähigkeit, durch Transglutamination mit dem extrazellulären Matrixprotein eine kovalente Bindung einzugehen (Baranger et al. 2011). Es wird aufgrund seiner antiproteolytischen Funktion der ALP (Antileukoproteinasen)-Superfamilie zugeordnet (Wiedow et al. 1990).

Unter der Vielzahl an Proteasen gehört es wie o.g. zu den sogenannten „Canonical Inhibitors“, die ihren Namen der kanonenartigen Konformation ihrer inhibitorischen Bindungsschleife in der P3-P3'-Region verdanken (Bode und Huber, 1992). Innerhalb dieser Familie unterscheidet man noch zwischen weiteren Unterfamilien, wobei Elafin genau wie SLPI (Secretory Leukocyte Peptidase Inhibitor), NSP (Neutrophil Serin Protease) und der Elafin-Vorläufer Trappin-2 zu der Chelonianin Familie gezählt werden (Moreau et al. 2008). Zahlreiche Serin-, Cystein-, Metallo- und Säure-Proteasen besitzen die Fähigkeit Trappin-2, auch als Pre-Elafin bekannt, proteolytisch zu spalten und Elafin von dessen Vorläufer freizusetzen. Die proteolytische Freisetzung von Elafin aus Pre-Elafin wird durch Anwesenheit eines Tryptase-Inhibitors gehemmt (Guyot N. et al. 2005).

Wegen des Vorhandenseins eines Transglutaminase Substrats sowie einer WAP (Whey Acidic Protein)-Domäne zählt man es des Weiteren auch zu der sogenannten Trappin-Familie. Trappin ist ein Akronym für **TR**ans-glutaminase substrate and **wAP** domain containing **ProteIN**. Diese Proteine werden durch ihre kovalente Quer-Verbindung im Gewebe gefangen „trapped“ bzw. verankert (Schalkwijk et al. 1999).

1.3.1 Struktur von Elafin

Alle Proteine der Trappin-Familie bestehen aus zwei funktionellen Domänen. Die N-Terminale, Transglutaminase-Substrat-Domäne oder auch Cementoin-Domain genannt,

enthält die Konsensus-Sequenz GQDPVK in Form von multiplen Hexapeptid-Wiederholungen. Das WAP Motiv, bestehend aus vier Disulfidkernen, agiert als inhibitorischer Bereich mit antiproteolytischen Eigenschaften (Shaw et al. 2011).

Elafin, dessen Gen 2,3 kb lang ist und aus drei Exons und zwei Introns besteht (Verrier et al. 2012), entsteht aus Prä-Elafin, einer Vorläuferform auch bekannt als Trappin-2. Trappin-2 enthält im Gegensatz zu Elafin (57 Aminosäuren) 117 Aminosäuren und ist damit mehr als doppelt so lang. Trappin-2 hat eine Größe von 10 kDa. Beide Proteine, Elafin und Prä-Elafin, sind Inhibitoren der Neutrophilen-Serin-Proteasen (Ying und Simon 1993, Zani et al. 2004).

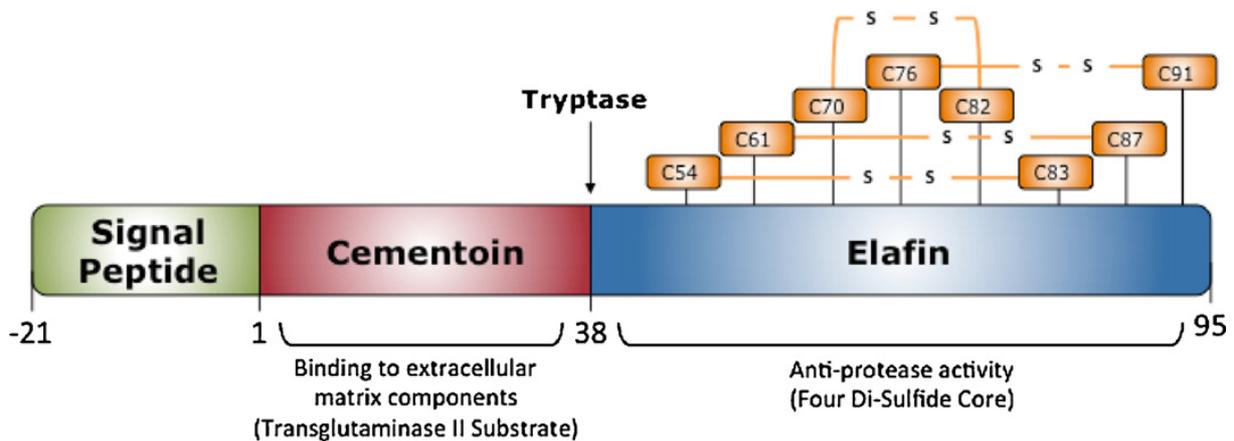


Abb. 1: Darstellung von Trappin-2. Bindung mit extrazellulären Matrixkomponenten durch Cementoin-Domän (in rot dargestellt) und gleichzeitige Inhibition der spezifischen Protease durch WAP/Elafin- Domän (in blau) nach Spaltung des Moleküls durch eine spezifische Tryptase. Der inhibitorische Bereich wird von vier Disulfidbindungen bestehend aus acht Cysteinresten gebildet.

(aus Verrier et al.2012) [Elsevier –Lizenz Nummer: 3270200847652]

1.3.2 Vorkommen von Elafin

Die erstmalige Isolation von Elafin gelang aus psoriatischer Epidermis (Wiedow et al. 1990, Schalkwijk et al. 1990). Mittlerweile konnte Elafin auch in einer Vielzahl anderer Organe gefunden werden. So ist ein Vorhandensein von Elafin in der Mundschleimhaut, dem Ösophagus, der Vagina (Pfundt et al. 1996), dem Uterus, den Eileitern (Ghosch et al. 2010),

den Lungen (Sallenave and Ryle, 1991, Baranger et al. 2011) und auch in Gelenken (Williams et al. 2006) belegt. Darüber hinaus konnte es aus Tumoren u.a. dem Ovarialkarzinom (Clauss et al. 2010) und dem Plattenepithelcarcinom der Lunge (Yoshida et al. 2002) isoliert werden. Ferner wurde Elafin im Sputum bei zystischer Fibrose gefunden (Guyot et al. 2008). In der durch Sonnenexposition geschädigten Haut konnte eine Anreicherung von Elafin beobachtet werden (Muto et al. 2007). Eine erhöhte Konzentration von Elafin wurde in der Farmerlunge gefunden (Tremblay et al. 1996).

1.3.3 Klinische Bedeutung von Elafin

Neben den Protease-inhibierenden Eigenschaften von Elafin gegen die Serin Proteasen, NE und die Proteinase-3, konnten in den letzten Jahren weitere diagnostische sowie therapeutische Eigenschaften gefunden werden. Außerdem werden dem Elafin als Bestandteil des angeborenen Immunsystems immunregulatorische Funktionen zugeschrieben (Sallenave, 2010).

Der bislang wichtigste therapeutische Effekt von Elafin ist seine anti-bakterielle Komponente, die der des Defensins sehr ähnlich ist. So wirkt Elafin in vitro gegen Bakterien, Pilze sowie Viren (Guyot et al. 2010, Verrier et al. 2012, Jasinghe et al. 2013). Eine antibakterielle Wirkung konnte gegen *Pseudomonas Aeruginosa* als gramnegatives Bakterium und gegen *Staphylokokkus Aureus* als grampositives Bakterium belegt werden (Simpson et al. 1999). Dabei ist anzumerken, dass die antibakterielle Wirkung hier bereits bei geringer Konzentration von Elafin im Bereich von 2.5-25 μmol eintritt.

Bezüglich Viren zeigt Elafin Wirksamkeit gegen HSV-2 und potentielle Wirkungen gegen HIV (Jasinghe et al. 2013). Die Anti-HIV-1 Aktivität von Elafin ist potenter als dessen Vorläufer Trappin-2 (Drannik et al. 2012). Im Genitaltrakt besteht eine Korrelation zwischen dem Elafin/Trappin-2 Spiegel mit dem Schutz vor HIV (Igbal et al. 2009). Elafin könnte auch in der akuten entzündlichen Phase einer Wundheilung eine Rolle spielen (Bergen et al. 1996). Es wird vermutet, dass eine reduzierte Menge an Elafin zu einer Unausgewogenheit zwischen Elastase und deren Inhibitor beiträgt, die zur Bildung von epidermalen Pusteln führt (Kuijpers et al. 1997).

Einige Studien konnten zeigen, dass Elafin induzierbar ist. Seine Expression kann durch TNF- α (Tumour Necrosis Faktor) oder IL- β (Interleukin) in den Zelllinien NCL-H322 und A549 von Epithelzellen der Luftwege hochreguliert werden (Sallenave et al. 1994). Außerdem wird Elafin als Antwort auf pro-inflammatorische Stimuli wie Lipopolysaccharid (LPS) und NE hochreguliert (Reid et al. 1999, Simpson et al. 2001). Bereits vorhandene Studien an Tiermodellen zeigten, dass Elafin bei der Behandlung von entzündlichen, vaskulären und systemischen Krankheiten zum Einsatz kommen kann (Shaw et al. 2011). Im Tierversuch konnte die Entwicklung einer Intima-Hyperplasie nach Ballon-Angioplastie, bei der eine Erhöhung der Elastase-Aktivität eine Rolle spielte, durch die Gabe von Elafin reduziert werden (Barolet et al. 2001). Ferner sind sowohl Elafin als auch SLPI in der Lage, eine Kolitis im Tiermodell abzuschwächen bzw. zu verhindern (Ho et al. 2013, Motta et al. 2011). Elafin könnte auch als Indikator zur Entwicklungsprognose von malignen Tumoren der Mamma Nutzen zeigen (Hunt et al. 2013). Auch bei der Colitis Ulcerosa könnte Elafin als Biomarker dienen, da eine intensive Ausschüttung von Elafin in der entzündlichen Mukosa beobachtet wurde. In der entzündungsfreien Mukosa dagegen sowie bei Gesunden konnte kein Elafin nachgewiesen werden (Flach et al. 2006).

Sowohl in klinischen als auch in experimentellen Studien wurde bei bestimmten Erkrankungen eine erhöhte Aktivität der Elastase gefunden wie z.B. bei Patienten mit Myokardinfarkt und instabiler Angina (Dinermann et al. 1990), peripheren arteriellen Gefäßerkrankungen (Fowkes et al. 1993) und abdominalem Aorten-Aneurysma (Cohen et al. 1987). Über das therapeutische Potential von Elafin in arteriosklerotischen Plaques, die NE enthalten, wo sie zur Schwächung der Gefäßwand beiträgt mit der Bildung eines Aneurysmas und Plaqueruptur als Folge, wurde diskutiert (Henriksen und Sallenave, 2008).

1.4 Elafin-ähnliche Proteine: SLPI

Secretory-Leukocyte-Proteinase-Inhibitor (SLPI), auch bekannt als Anti-Leukoprotease, ist ein 11.7 kDa großer nicht-glykosylierter Serinproteinase-Inhibitor, der von einer Vielzahl von Zellen produziert wird wie in den neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und epithelialen Zellen des Atmungs- und Verdauungstraktes (Greene et al. 2009). Die physiologische Konzentration von SLPI in der epithelialen Lungenflüssigkeit ELF (Epithelial Lung Fluid)

kann bis zu 670 nmol/ELF betragen (McNeely et al. 1995, Taggart et al. 2001). Im Gegensatz zum α_1 -Proteinaseinhibitor werden SLPI und Elafin/SKALP lokal in der Lunge produziert.

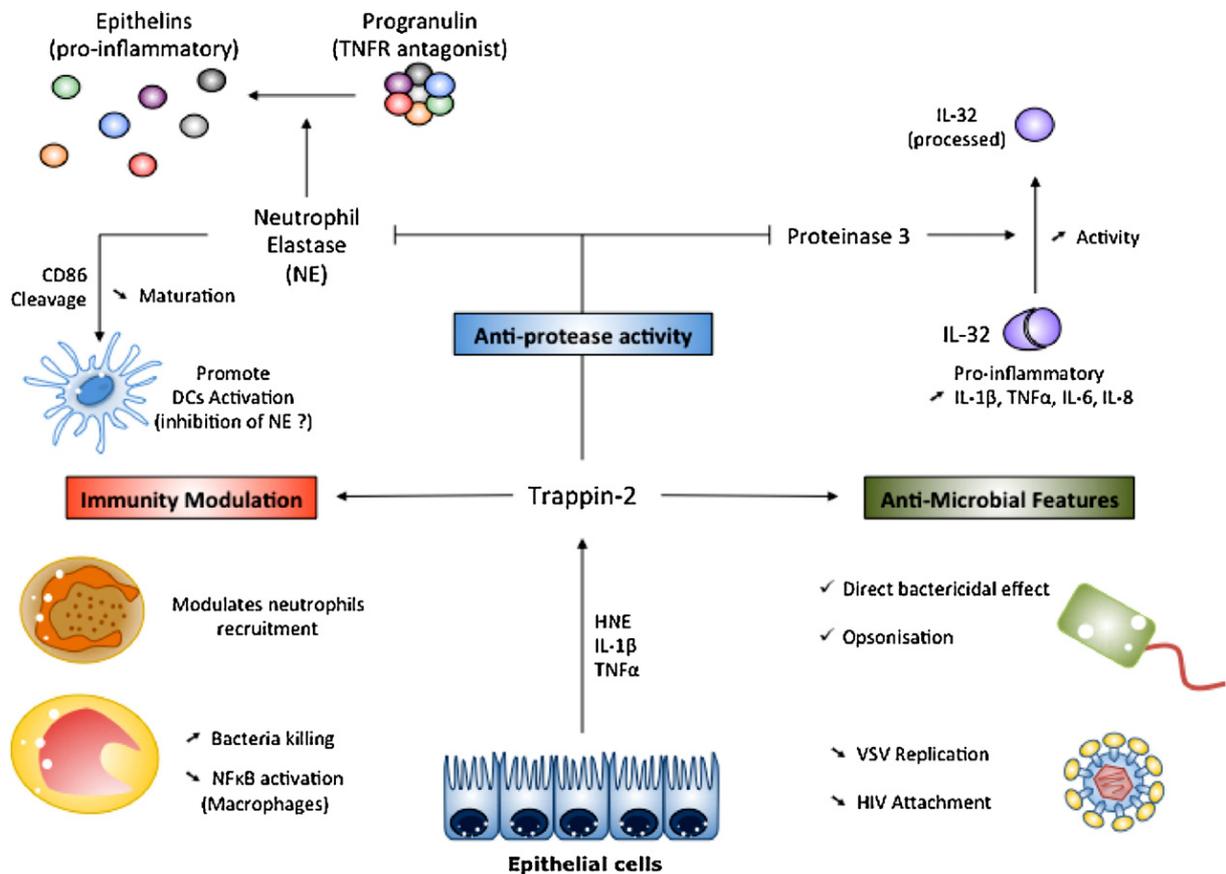


Abb. 2: Pleiotrope Eigenschaften von Trappin-2/Elafin. Entzündungs-Mediatoren wie NE, IL-1 β , und TNF α induzieren Trappin-2 -Ausschüttung aus epithelialen Zellen. Trappin-2/Elafin besitzt neben der Anti-Protease-Aktivität u.a. noch eine antibakterielle, antivirale und immunmodulierende Wirkung.

(aus Verrier et al. 2012) Elsevier-Lizenz Nummer: 3270200847652]

Die Hauptaufgabe dieser Inhibitoren liegt in der Hemmung der NE, ähnlich dem Elafin, aber inhibieren darüber hinaus noch eine Vielzahl anderer Proteasen wie: Cathepsin G, Trypsin, NE, Chymotrypsin, Chymase und Tryptase (Doumas et al. 2005). Elafin besitzt im Gegensatz zu SLPI ein schmaleres Wirkungsspektrum und bisher ist nur eine inhibierende Wirkung auf NE und Proteinase-3 bekannt (Sallenave, 2010).

Das SLPI Molekül besteht aus zwei hoch homologen Cystein-reichen Domänen, wobei der C-Terminalen Domäne die Elastase inhibierende Wirkung zugesprochen wird. Jede Domäne

verfügt über eine 40%-ige Ähnlichkeit mit Elafin, ihr fehlen jedoch im Gegensatz zu Trappin-2 und Elafin Transglutaminase-Sequenzen. Der aktive Teil ist bei den beiden Inhibitoren fast identisch (Baranger et al. 2011). Neben der Antiprotease-Funktion hat auch SLPI diverse Fähigkeiten, so wird sowohl eine antibakterielle als auch eine Wirkung gegen Pilze beschrieben (Tremblay et al. 1996). Die antibakterielle Wirkung des SLPI wird über die N-terminale Domäne des Proteins erzielt (Hiemstra et al. 1996). Durch die Zerstörung der Zellmembran wirkt SLPI sowohl gegen gramnegative als auch grampositive Bakterien. Grampositive Bakterien, gegen die bereits eine Wirksamkeit beschrieben wurde, sind sowohl Staphylokokkus Aureus als auch Staphylokokkus Epidermidis. Bei den gramnegativen Bakterien konnte eine Wirksamkeit gegen Pseudomonas Aeruginosa beschrieben werden (Wiedow et al. 1998, Williams et al. 2006).

Genau wie bei Elafin besteht auch eine Wirkung gegen HIV1, bei der SLPI die Replikation des Virus in Monozyten hemmen kann (McNeely et al. 1995).

Des Weiteren existiert eine antiinflammatorische Wirkung bezüglich Monozyten/Makrophagen (Zhang et al. 1997) als auch eine immunmodulatorische Komponente, so kann SLPI eine Vielzahl von entzündlichen Prozessen beeinflussen, in dem es die Produktion von Prostaglandin Synthase-2, Prostaglandin E2 und MMP1 und MMP9 von Monozyten verhindert (Zhang et al. 1997). Die Expression von SLPI kann wie bei Elafin durch TNF- α und IL- β induziert werden (Sallenave et al. 1994). In Amnionflüssigkeit könnte SLPI zur Immunabwehr während der Schwangerschaft beitragen (Zhang et al. 2001).

Wie bei Elafin beschrieben scheint NE die SLPI-mRNA (Messenger RNA)-Spiegel zu erhöhen (Wetering von et al. 2000). Auch Glukokortikoide heben den Spiegel von SLPI-mRNA (Wetering von et al. 2000). Des Weiteren wird die Konzentration von SLPI durch Defensine in primären epithelialen Zellen der Bronchien (PBECs= Primary Bronchial Epithelial Cells) erhöht. Defensine sind antimikrobielle Peptide, die in hoher Konzentration im eitrigen Sekret bei chronischer Lungenentzündung gefunden werden. Die Menge an SLPI mRNA blieb jedoch konstant (Wetering von et al. 2000). Auch die Konzentration von Elafin wurde durch Defensine nicht erhöht.

1.5 Ziel der Untersuchung

Im Gegensatz zu dem Elafin-ähnlichen Protein SLPI, das zu der gleichen Antiproteasen-Familie zählt, ist bisher wenig über die Biodistribution von Elafin bekannt. Besonders im Hinblick auf die vielfältigen Eigenschaften dieses Proteins, worunter antiproteolytische, antibakterielle, antivirale und auch immunmodulatorische Eigenschaften zählen, ist es wichtig mehr über das Verhalten von Elafin im Organismus herauszufinden.

Ziel dieser Studie war es Aussagen über die Biodistribution und Pharmakokinetik von Elafin zu gewinnen, um daraus therapeutische Konsequenzen abzuleiten.

1.6 Fragestellung der Arbeit

Die im Rahmen eines Vorprojekts erhobenen Rohdaten sollten innerhalb dieser Arbeit wissenschaftlich ausgewertet, analysiert und diskutiert werden. Darüber hinaus sollten ergänzende Experimente zur Stabilität des im Vorprojekt bereits markierten Elafin durchgeführt werden. Die bereits vorhandenen sowie die neu erhobenen Daten sollen einer Analyse der Pharmakokinetik unterzogen werden, um weitere Erkenntnisse über das pharmakokinetische Verhalten sowie die Biodistribution von ^{99m}Tc markiertem Elafin im Rattenmodell zu gewinnen.

2. MATERIAL

2.1 Versuchstiere

Alle Tierversuche wurden vom Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein genehmigt (-V31-Tierschutz nach §8 Abs. 1 Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 -BGBl I S 1206, 1313-, geändert durch Art. 2 des Gesetzes vom 13. Dezember 2007 – BGBl I S 2936-) (siehe Anhang).

Männliche Ratten der Rasse Wistar mit einem Gewicht von $300 \pm 50\text{g}$ wurden von der Firma Charles River Deutschland GmbH zur Verfügung gestellt. Diese Ratten stammen von der sogenannten Wanderratte (*Rattus norvegicus*) ab. Das Wistar Institute for Anatomy and Biology an der Universität von Pennsylvania hatte Anfang des 2. Jahrtausend begonnen, die Ratten als standardisierte Laborversuchstiere zu züchten. Fast die Hälfte aller in der Forschung verwendeten Ratten sind Nachkommen der Wistar-Ratten. Die Versuchstiere durften sich mindestens sieben Tage an den Käfig gewöhnen und konnten durch ihre Käfigbeschriftung identifiziert werden. Die Tiere wurden einem 12 Stunden Licht/Dunkel-Zyklus ausgesetzt.

Trinkwasser aus Flaschen stand den Ratten ad libitum zur Verfügung. Die Fütterung der Ratten erfolgte mit ssniff^R R/M-H. Im Anschluss an die Katheterimplantation (siehe 3.1) wurden die Ratten einzeln in Käfigen gehalten. Nach der Intervention und der Tötung der Ratten blieben die Ratten für weitere vier Tage in der Klinik für Nuklearmedizin an dem Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, um die Radioaktivität dort abklingen zu lassen.

2.2 Herkunft von humanem Elafin

Rekombinantes humanes Elafin mit einem Molekulargewicht von 6 kDa wurde von der Firma Proteo Biotech AG, Deutschland zur Verfügung gestellt und in der Klinik für Nuklearmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, bei -40°C gelagert. Alle anderen benutzten Chemikalien wurden in der höchsten verfügbaren Reinheit kommerziell erworben.

2.3 Herstellung von ^{99m}Tc

Für die Markierung wurde ^{99m}Tc aus $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ in physiologischer Kochsalzlösung durch einen kommerziellen $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ -Generator (Mallinckrodt Medical, Petten, Niederlande) generiert. In dem Technetium-Generator wurde das metastabile Isotop ^{99m}Tc mit einer Halbwertszeit von sechs Stunden, durch radioaktive Umwandlung von $^{99}\text{Molybdän}$ gewonnen und in einer direkten Mischung mit Kochsalz freigegeben. Die Radionuklid Reinheit betrug $> 99,99\%$. Die ^{99m}Tc -Pertechnetatlösung wurde bei Raumtemperatur gelagert.

2.4 Synthese von Hydrazinonicotinamide gekoppeltem Elafin (HYNIC-Elafin)

16,67 nmol Elafin wurde in 100 μl Puffer gelöst (1ml PBS + 70 μl 1mol NaHCO_3 pH=8,5). N-Hydroxysuccinimid-HCl (HS-HCl)Lösung (76,8 nmol HS-HCl in 20 μl Dimethylformamid) wurde tropfenweise der Elafinlösung hinzugegeben. Die Mischung wurde mit Aluminiumfolie als Lichtschutz abgedeckt und 140 Minuten lang bei Raumtemperatur umgerührt. Nach 140 Minuten wurde die komplette Lösung dem HPLC – System A zugeführt. Die Peaks von 15,5 bis 17,0 Minuten wurden gesammelt und über Nacht von der Lösung befreit. Das HYNIC-Elafin wurde durch ESI-MS Analyse untersucht.

2.5 Synthese von ^{99m}Tc - Elafin

Die Kopplung/Markierung des an HYNIC-gekoppelten Elafins an ^{99m}Tc erfolgte folgendermaßen: HYNIC-Elafin wurde in 100 μl der 200mmol Tricine Lösung, bestehend aus 35,8 mg Tricine in 1ml H_2O , gelöst. Es wurde 1,0 bis 1,5 GBq frisch eluiertes $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ in 400 μl physiologischer Kochsalzlösung zu der HYNIC-Elafinlösung hinzugefügt. Danach wurde 5 μl SnCl_2 Lösung (hergestellt aus 50mg SnCl_2 , 0,975 ml H_2O und 25 μl 4mol HCl) hinzugegeben. Nach 10 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die ganze Lösung in das HPLC – System B injiziert. Die gesammelte Fraktion wurde anschließend in eine 1ml Kunststoffspritze gefüllt.

2.6 Radioaktivität von ^{99m}Tc -Elafin und ^{99m}Tc -Pertechnetat

Die Radioaktivität des injizierten ^{99m}Tc -Elafin wurde mit Hilfe eines Aktivimeters (Isomed 1010, MED, Deutschland) bestimmt.

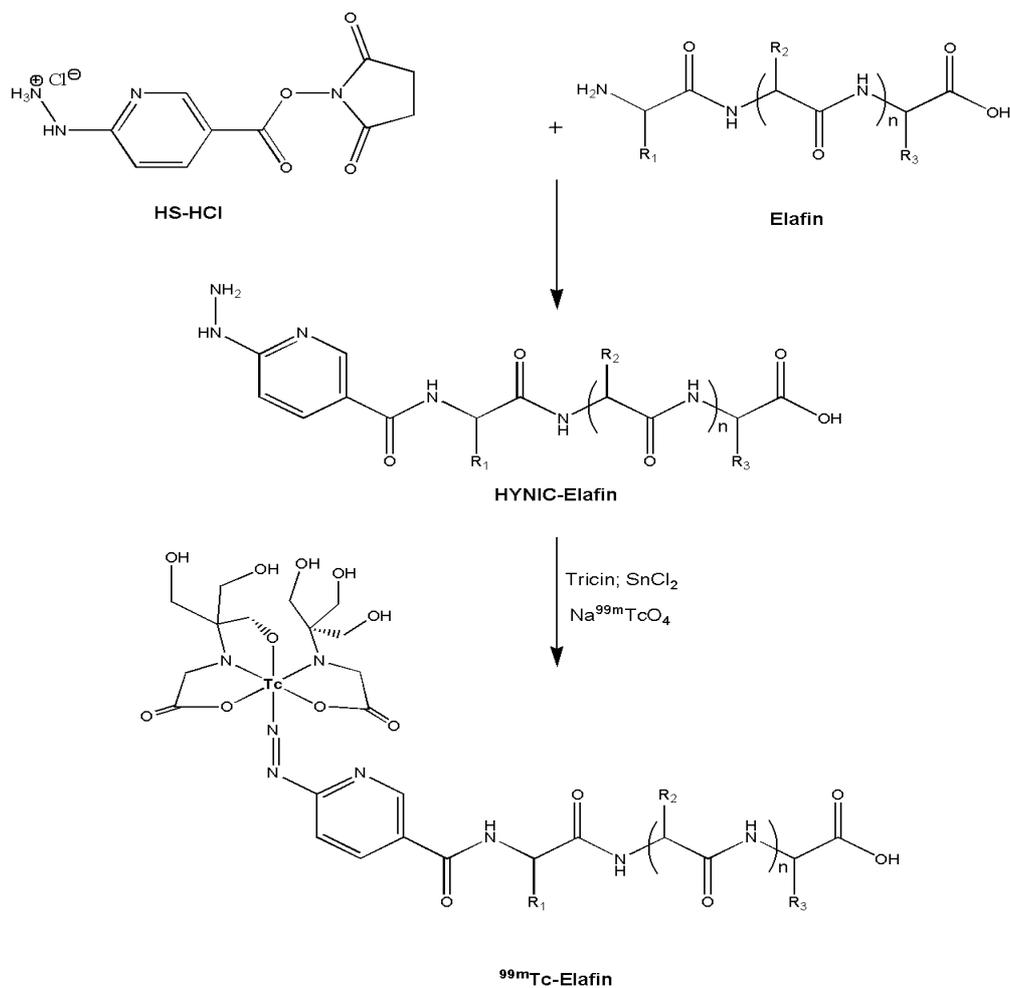


Abb. 3: ^{99m}Tc -Markierung von Elafin.

3. METHODEN

Die im Vorprojekt durchgeführten tierexperimentellen Arbeiten sind im folgenden Methodenteil der Vollständigkeit halber beschrieben.

3.1 Chirurgische Intervention

Für die Bolusinjektion des ^{99m}Tc -Elafin (oder des $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ [Natriumpertechnetat] in der Kontrollgruppe) wurden dünne Polypropylenkatheter in die Femoralvene der Ratten implantiert. Diese untertunnelten die Rückenhaut und wurden im Bereich des Nackens herausgeführt und dort zwei Tage vor der SPECT Studie fixiert. Anästhesie und Analgesie wurden mit Choralhydrat (400mg/kg/KG) und Tramadol (30mg/kg/KG) durchgeführt. Danach wurden die Ratten bis zum Ende der Studie in den jeweiligen Käfigen untergebracht.

3.2 Radioaktivitätsmessungen

Die Radioaktivitätsmessungen der entnommenen Organe und Blutproben erfolgte mit einem Berthold Multi Logger LB 5310 (Berthold, Bad Wildbad, Deutschland). Die täglich stattfindende Qualitätskontrolle wurde mit Hilfe einer ^{137}Cs -Quelle (A=37 kBq, 01.10.1998, Amersham Buchler GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland) durchgeführt. Darüber hinaus erfolgte eine Kalibrierungsreihe mit $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$.

3.3 HPLC und HPLC-MS Analyse

Die Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) und die Electro spray ionisation mass spectra (LC-MS) wurden auf zwei unterschiedliche Arten durchgeführt.

System A bestand aus einem Agilent HPLC System 110 (Santa Clara, CA, USA) und einem Quattro Premier XE Massenspektrometer (Waters, Milford, MA, USA). Das Agilent HPLC System 110 enthielt eine quaternäre HPLC Pumpe, einen Diodenarray-Detektor, einen auto-

sampler und einen NaI-Szintillationskristall-Detektor (Ginastar, Raytest, Deutschland). Die Analyse wurde an einer Nucleosil C18 Säule (250 x 4,6 mm ID, Macharay-Nagel, Düren, Deutschland) unter Verwendung von Wasser mit 0,1% Ameisensäure (Lösung A) und Acetonitril (0,1% Ameisensäure (Lösung B); Flussrate der Lösung: 1ml/min., Gradient: 0% bis 65% in 25 Minuten durchgeführt. Die Lösungen wurden automatisch mit einem Maximalvolumen von 100µl injiziert.

System B bestand aus einem Beckmann programmable Solvent Module 126 (software 32 Karat), einem Beckmann 166 UV detector (260nm) und einem NaI-Szintillationskristall-Detektor (Berthold, Deutschland). In diesem System wurde die chromatographische Reinigung von ^{99m}Tc-Elafin unter Verwendung eines Superdex[®] 75 HR 10/300 GL Gel mit Filtrationssäule (GE Healthcare Life Sciences, Deutschland) durchgeführt. Die mobile Phase wurde von Phosphat gepuffertem NaCl (PBS) gebildet. Dabei betrug die Flussrate 0,7ml/min. Die Lösungen wurden mit einem Maximalvolumen von 500 µl (Rheodyne[®] 500µl loop) manuell injiziert.

Die radiochemische Ausbeute wird als Zusammenhang zwischen der gemessenen Radioaktivität des bereinigten Tracers und der Radioaktivität der nicht bereinigten Lösung, die unmittelbar vor der chromatographischen Reinigung gemessen wurde, angegeben. Die radiochemische Ausbeute wurde dabei nicht nach dem Zerfallsgesetz korrigiert.

Um die radiochemische Reinheit zu bestimmen, wurde die gereinigte Tracer Lösung mit Hilfe der oben beschriebenen HPLC Methode analysiert. Die Peakbereiche der radioaktiven Bestandteile im Radio-HPLC Chromatogramm wurden miteinander in Zusammenhang gebracht. Um die spezifische Radioaktivität zu bestimmen, wurde die Radioaktivität der synthetisierten Radiotracer direkt nach der chromatographischen Reinigung bestimmt und mit der Menge des verwendeten Vorläufers in Beziehung gesetzt.

3.4 Szintigraphische Bilder

Die dynamischen planaren Aufnahmen wurden unter Verwendung einer E.CAM-180 γ-Kamera (Siemens, Erlangen, Deutschland) mit niedriger Energie arbeitenden hochauflösenden parallelen Pinhole- Kollimatoren (LEHR collimator) aufgenommen.

Die Auswertung der rekonstruierten Bilder wurde unter Anwendung der PMOD software Version 3.3 (PMOD Technologies Ltd., Zürich, Schweiz) vorgenommen. Die SPECT Aufnahmen erfolgte mit der Multiplexing – Multi – Pinhole - Technologie (SciVis HiSPECT™) in Kombination mit der o.g. Siemens E.CAM-180 Zweikopf-Gammakamera. Das HiSPECT™ System besteht aus zwei pyramidal Detektor- kappen, hergestellt aus stabilem Spezialblei (Pb und SB) und zwei multi Pinhole Kollimatoren hergestellt aus einer Wolfram-Legierung (97%W + 1,5%Fe) mit einer Dicke von zehn Millimetern. Jeder Kollimator hat zehn Pinholes mit einem Durchmesser von 3,0mm. Die spezielle Auflösung des HiSPECT™ Systems beträgt 2,5mm.

3.5 Magnet Resonanz Tomographie (MRT)

Die MRT-Untersuchungen der Ratten wurden durchgeführt, um die Szintigraphie-Bilder den einzelnen Organen anatomisch zuordnen zu können. Mit Hilfe eines MRT-Gerätes (Achieva, 3 T, Philips, Niederlande) wurden die Ratten untersucht. Zu diesem Zweck wurden die betäubten Ratten in Rückenlage in eine Spule eines small loop RF-coil mit einem inneren Durchmesser von 4,7cm (Microscopy coil 47, Philips, Best, Niederlande) gelagert. Nach Positionierung des Tieres wurde je eine coronare T2 gewichtete Aufnahme (TR/TE=3171/120 msec, Matrix 128x128, Feldgröße (FOV) 64mm erstellt. Die Gesamtaufnahmezeit betrug acht Minuten und 24 Sekunden.

3.6 Metabolische Stabilität im Rattenplasma

Die metabolische Stabilität des markierten ^{99m}Tc-Elafins wurde in vitro in PBS und im Rattenplasma untersucht. Das Blut der normalen Wistar-Ratte wurde in mit Heparin versehenen Polypropylenröhrchen wurde bei 6000 x G (4°C) für 30 Minuten zentrifugiert und das gewonnene Plasma gesammelt. 100µl (15,7 MBq) des ^{99m}Tc-Elafins wurde mit 400µl Plasma bei 37°C inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die Proteine mit Äthanol (2:1 ÄtOH aliquot, v/v) (Fragogeorgi et al. 2009) ausgefällt. Die Proben wurden bei 15000 x G (4°C) für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde dann filtriert (0,22µm, Millipore GV) und mit der RP-HPLC, wie oben beschrieben, analysiert (System B). Die Ausbeute der Radioaktivität im Überstand betrug hierbei 65-85%.

3.7 Pharmakokinetische Analyse

Der Mittelwert der Radioaktivitätskonzentrationsdaten (% ID/g) über die Zeit von fünf normalen Ratten wurde verwendet, um ein pharmakokinetisches Modell zu erzeugen. Um ein Modell für Zeitkonzentrationsdaten zu erhalten und um die pharmakokinetischen Parameter besser abschätzen zu können, wurde eine intravenöse Bolusinjektion verabreicht.

Um eine Blutkinetikkurve zu erstellen, wurden Blutproben (etwa 200µl) über den Femoralvenenkatheter zu verschiedenen Zeitpunkten (15s, 30s, 1min, 2min, 5min, 10min, 30min, 1h, 2h, 4h, 8h, 24h.) nach der Injektion des Radionuklids entnommen. Von diesen Blutproben wurden 50µl in Eppendorfröhrchen, die mit 5µl Heparin versehen waren, gefüllt. Das Heparin sollte die Gerinnung verhindern. Danach wurde der Katheter durch Injektion von 300µl NaCl Lösung und Heparin (entnommen aus einem Depot mit 5000 I.E. in 1000ml 0,9% NaCl) blockiert.

Die Radioaktivität (counts/min.) der 50µl Proben wurden in einem Gammazähler (LB 5310 Multi-Logger, Berthold, Deutschland) gemessen, welcher zuvor mit der Standardlösung ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$, mit bekannter Radioaktivität) kalibriert wurde.

Die Analyse der kinetischen Parameter wurde mit Hilfe des add-in Programms PKSolver vorgenommen (Zhang et al. 2010). Die ein-, zwei- und drei-Kompartiment-Modell-Versuche wurden verwendet, um die Daten der Blutkonzentration mit der Zeit zu korrelieren. Die Auswahl der Modelle folgte dem F-Test und lag dem Akaike Information Criterion zugrunde. Eine Nicht Kompartiment Analyse wurde für die restlichen Organe erstellt, um die Area under the Curve (AUC), die Area under the Moment Curve (AUMC) sowie die Mean Residence Time ($\text{MRT}=\text{AUMC}$) zu bestimmen. Die Clearance (CL) wurde mit Hilfe der Ratio $\text{CL}=\text{ID}/\text{AUC}$ ($\text{ID}=100\%$ der injizierten Dosis) berechnet.

3.8 Statistische Datenanalyse

In dieser Arbeit wurden alle Daten statistisch mit der Software von IBM SPSS Statistics ausgewertet. Dabei wurden alle Werte als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben.

Arithmetischer Mittelwert:
$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i = \frac{1}{n} (x_1 + x_2 + \dots + x_n)$$

(x_i = einzelne Werte; n = Probenumfang)

Varianz:
$$s^2 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 = (x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + \dots + (x_n - \bar{x})^2/n$$

Standardabweichung:
$$s = \sqrt{s^2}$$

Die Standardabweichung ist ein Maß für die Streubreite der Werte eines Merkmals rund um dessen Mittelwert (arithmetisches Mittel). Ihre Berechnung erfolgt über die Quadratwurzel der Varianz.

Für den Vergleich der Mittelwerte der einzelnen Daten der ^{99m}Tc -Elafin-Gruppe und der Kontrollgruppe wurde die Multivarianzanalyse MANOVA (Multivariate Analysis of Variance) herangezogen, da hier mehrere Zielvariablen miteinander verglichen werden (Uptake der Organe zu unterschiedlichen Zeiten). Die MANOVA untersucht, ob sich die Mittelwerte von mehr als zwei Stichproben signifikant unterscheiden. Es handelt sich dabei um eine Erweiterung der ANOVA (Univariate Varianzanalyse). Die MANOVA wird verwendet, um bei unterschiedlichen abhängigen Variablen einen gesamt-statistischen Test anstelle von mehreren einzelnen Tests durchzuführen. Es wird hier anstatt einer Variablen ein Vektor von Variablen auf Signifikanz geprüft. Außerdem wird die MANOVA verwendet, um herauszufinden, wie unabhängige Variablen teilweise die abhängigen Variablen beeinflussen, und damit die Bedeutung der einzelnen Variablen in der Gruppe abzuschätzen (Carey, 1998). In dieser Arbeit wurde im Voraus ein Signifikanzniveau von 5% ($p < 0,05$) festgelegt.

3.9 Design der Studie

Nach einem detailliert vorgeschriebenen Plan-Schema wurden die Untersuchungen bzw. Messungen der Radioaktivitätsverteilung durchgeführt.

Abbildung 4 zeigt den Ablauf der Studie, begonnen mit der intravenösen Verabreichung des ^{99m}Tc -Elafins und den dynamischen planaren Aufnahmen bis 30min., gefolgt von Hi-SPECTTM Aufnahmen direkt nach 40min, 4h, 22h (n=5) p.i. des Radionuklids. Zwei zusätzliche dynamische Planarstudien wurden bis 240min. p.i. ohne zusätzliches Hi-SPECTTM (n=2) durchgeführt. Die Kontrollgruppe (n=5) erhielt $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ und wurde analog zu der ^{99m}Tc -Elafin-Gruppe untersucht. Die Mittelwerte der verabreichten Aktivität betragen

27,4 ± 3,1 (n=5) MBq für ^{99m}Tc -Elafin und 32,6 ± 7,0MBq (n=5) für $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$. Die Einzelheiten der Studie sind in der Abbildung 4 und den Tabellen 1 und 2 zusammengefasst. Die MRT-Untersuchungen wurden 23 Stunden nach der Injektion des Radionuklids durchgeführt. Nach 24 Stunden wurden die Ratten getötet und die Organe entnommen. Die Radioaktivität der Organe wurde dabei getrennt gemessen.

Während der Untersuchungen wurden die Ratten vor der i.v. Injektion der Radionuklide mit 400 mg/Kg Chloralhydrat narkotisiert. Die Verabreichung der Radiopharmaka sowie die Bildgebung erfolgten unter Berücksichtigung der geltenden Gesundheitsschutz-, Strahlenschutz- sowie Sicherheitsvorschriften für das Personal.

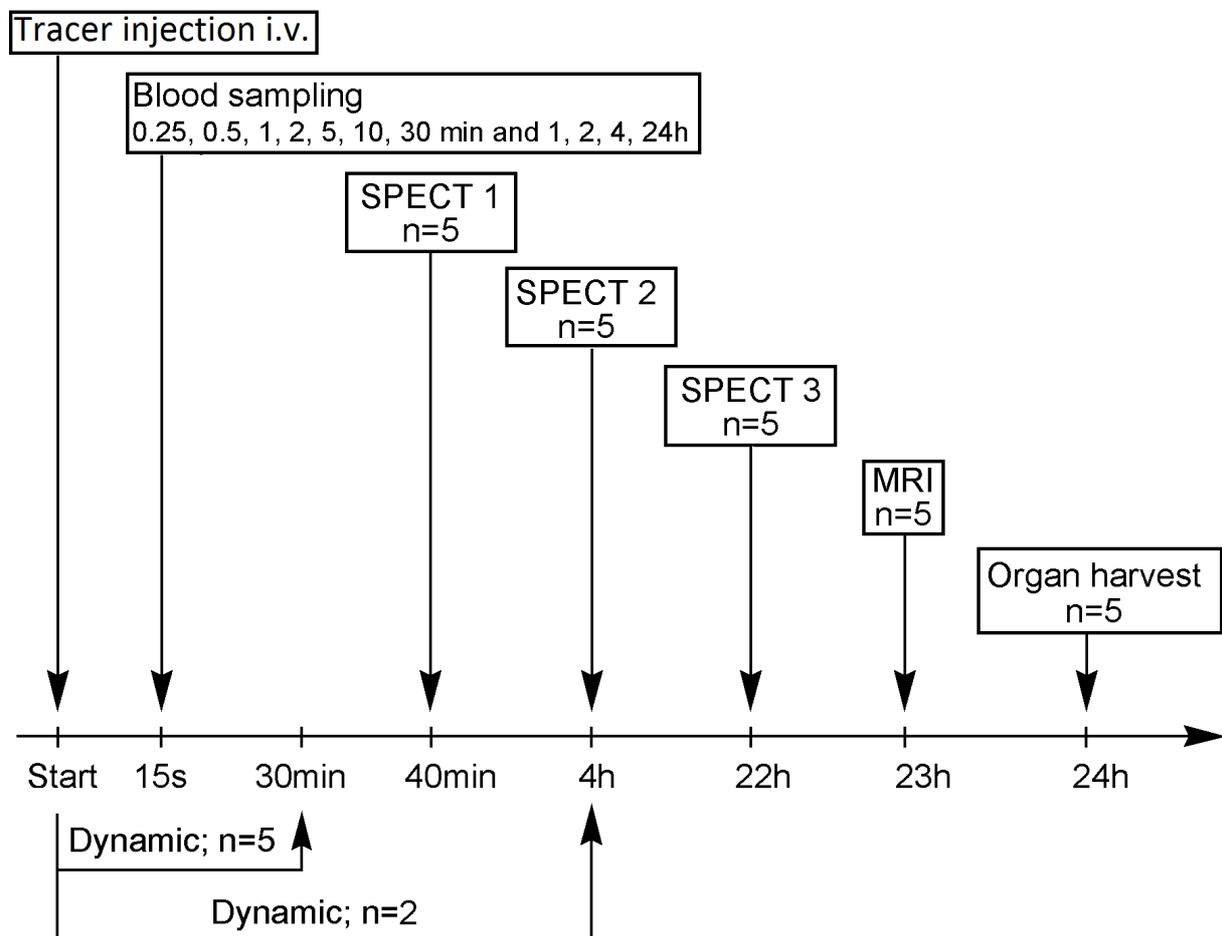


Abb. 4: Ablauf der Untersuchungen zur Bestimmung der Organverteilung von ^{99m}Tc -Elafin nach i.v. Injektion.

No	Weight (g)	Activity (MBq)	Dynamic	SPECT			MRT	Organ count	Blood count	route of administration
				40 min	4h	22h				
1	320	30.2	none	40 min	4h	22h	yes	yes	yes	i.v.
2	350	28.3	none	40 min	4h	22h	yes	yes	yes	i.v.
3	344	31.4	0-30 min	40 min	4h	22h	yes	yes	yes	i.v.
4	297	24.9	0-30 min	40 min	4h	22h	yes	yes	yes	i.v.
5	306	24.9	0-30 min	40 min	4h	22h	yes	yes	yes	i.v.
6	406	37.01	0-240 min	No	no	no	yes	yes	no	i.v.
7	540	5.2	0-240 min	No	no	No	yes	yes	no	i.v.

Tab. 1: Wistar-Ratten, denen ^{99m}Tc -Elafin injiziert wurde, deren Gewicht, applizierte Radioaktivität, Applikationsart und die durchgeführten Messungen.

No.	Weight (g)	Activity (MBq)	Route	Dynamic	SPECT			MRT	Organ count	Blood count	route of administration
					40 min	4h	22h				
1	325	28.1	i.v.	0-30 min	40 min	4h	22h	yes	yes	yes	i.v.
2	320	25.2	i.v.	0-30 min	40 min	4h	22h	yes	yes	yes	i.v.
3	297	29.4	i.v.	0-30 min	40 min	4h	22h	yes	yes	yes	i.v.
4	295	39.8	i.v.	0-30 min	40 min	4h	22h	yes	yes	yes	i.v.
5	342	40.4	i.v.	0-30 min	40 min	4h	22h	yes	yes	yes	i.v.

Tab. 2: Wistar-Ratten, denen $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ injiziert wurde, deren Gewicht, applizierte Radioaktivität, Applikationsart und die durchgeführten Messungen.

3.10 Dynamische und Hi-SPECT™ Aufnahmen

Die anfängliche Verteilungsphase von intravenös appliziertem ^{99m}Tc -Elafin wurde mittels dynamischer planarer Szintigraphie bis 30 min p.i. mit folgenden Sequenzen aufgenommen: 60x1s, 24x5s und 54x30s. In zwei zusätzlichen Ratten wurden dynamische Szintigraphien bis 240 min. p.i. mit den Sequenzen 60x1s, 24x5s, 54x30s und 120x60s durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Ratten unmittelbar vor der Injektion unter einer Gammakamera (E-CAM, Siemens, Deutschland) platziert. Ein Maximalvolumen von 500µl frisch markierter ^{99m}Tc -Elafin-Lösung (oder $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ zur Kontrolle) wurde als intravenöser Bolus durch einen Femoralvenenkatheter innerhalb von 5-10s injiziert. Zur Bestimmung der verabreichten Radioaktivität wurde die Tracerlösung in eine 1ml Kunststoffspritze aufgezogen und in einem Aktivimeter bestimmt. Nach der Verabreichung wurden die leere Spritze und die

Sondennadel wieder in dem Aktivimeter gemessen um die exakte verabreichte Radioaktivität zu messen, unter Berücksichtigung der Halbwertszeit des Nuklids.

Um die 3D Verteilung in den Organen sichtbar zu machen, wurden zusätzlich Hi-SPECT™ Scans nach 40min, 4h und 22h nach der i.v. Injektion (n=5) durchgeführt. Jede gemessene SPECT-Aufnahme beinhaltete 15 Projektionen um 360° Drehung pro Detektorkopf. Abhängig von der Radioaktivität betrug die Aufnahmezeit pro Winkel 60-400s mit automatischer Zerfallskorrektur. Die Bildverarbeitung geschah mit Hilfe von SciVis HiSPECT™ reconstruction software (SciVis scientific imaging GmbH, Göttingen, Deutschland). Der Rekonstruktionsalgorithmus war eine dedizierte iterative tomographische multi pinhole SPECT reconstruction (OSEM) mit neun Wiederholungen.

3.11 Organentnahme und Messung der Radioaktivität

Um die Biodistribution in verschiedenen Organen zu bestimmen, wurden die Organe 24h nach der Injektion zur Messung der jeweiligen Radioaktivität entnommen. Hierfür erhielten die Ratten zwecks Narkotisierung Chloralhydrat (400mg/kg/KG) und Tramadol (30mg/kg/KG) zur Analgesie. Danach wurde eine Thorakotomie durchgeführt und der rechte Vorhof geöffnet, um das Blut zu entleeren. Anschließend erfolgte eine transkordiale Organperfusion mit NaCl.

Nach dem Exitus Letalis der Ratten wurden Gehirn, Schilddrüse, Lunge, Herz, Leber, Nieren, Magen, Colon, Dünndarm, Blase, Muskel und Fett entnommen. Die Radioaktivität in den jeweiligen Organen [counts/min.] wurde mit einem γ -counter (Multilogger, Berthold, Deutschland) gemessen, der zuvor mit 1ml einer Standard $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ -Lösung bekannter Radioaktivität kalibriert wurde.

3.12 Semi-quantitative Analyse der Bilddaten

Für die Quantifizierung wurden alle qualitativ hochwertigen Bilddaten verwendet, um ein summiertes Gesamtbild mit einer guten Statistik zu gewinnen. Die Quantifizierung der Organradioaktivitätsverteilung erfolgte mittels Region-Of-Interest (ROI) Technik, die eine Analyse der 2D dynamischen planaren Bilder bzw. die Volume-Of-Interest (VOI) Technik für

die 3D Hi-SPECT™ Bilder erlaubte. Die Organradioaktivitäten wurden als Prozentsatz der injizierten Radioaktivität pro Gramm (% ID/g) dargestellt. Für die dynamischen, planaren Bilder wurde die Anzahl der Counts pro Sekunde innerhalb der ROIs, die die ganze Ratte und den Katheter enthielt, mit 100% der verabreichten Dosis gleichgesetzt.

Für die SPECT-Bilder wurde eine Kalibrierung unter Verwendung der entnommenen Organradioaktivität wie folgt vorgenommen:

Für jedes Organ wurde ein Kalibrierungsfaktor (F_0) unter Verwendung der spezifischen Countrate pro Gramm des Organs, das in dem Kalibrierungs γ -counter nach 24h p.i. ($A_{0,24h}$) gemessen wurde, errechnet. Zu diesem Zweck wurde $A_{0,24h}$ mit der Anzahl der durchschnittlichen Counts pro Sekunde und ml, gemessen innerhalb der entsprechenden VOI des SPECT Bildes nach 22h p.i. ($AVR_{0, 22h}$) gleichgesetzt. Zerfallskorrekturen wurden wegen der Zeitdifferenz von zwei Stunden zwischen der letzten SPECT und der Organentnahme durchgeführt. Dementsprechend wird der Kalibrierungsfaktor in Gleichung 1 angegeben:

$$F_0 = \frac{A_{(0, 24h)}}{AVR_{(0, 22h)}}$$

Die spezifische Radioaktivität in den Organen zu einer bestimmten Zeit, $A_{(0, t)}$, kann aus den SPECT Daten mit Hilfe von Gleichung 2 errechnet werden:

$$A_{(0, t)} = AVR_{(0, t)} \times F_0$$

$AVR_{(0, t)}$ sind die durchschnittlichen counts pro Sekunde und ml der Organe, gemessen innerhalb des entsprechenden VOI zu einer definierten Zeit.

4. ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNGEN

4.1 Synthese von HYNIC-gekoppeltem Elafin

Die Synthese von HYNIC-Elafin (Abb. 3) wurde unter Verwendung von Hydroxysuccinimid-HCl in Dimethylformamid (siehe 2.4) durchgeführt. Das Rohprodukt wurde gereinigt mit RP-HPLC wie oben beschrieben (HPLC System A) und die chemische Reinheit mit analytischer RP-HPLC und LC-MS bestimmt. Wie in Abbildung 5 und in Tabelle 3 zusammengefasst, zeigte die ESI-MS Analyse, dass die isolierte HYNIC-Elafin Fraktion sowohl Mono- und Di-HYNIC gekoppeltes Elafin als auch freies Elafin mit einem Verhältnis von 60,0%, 37,0% bzw. 13,2% enthielt. Die errechnete Menge von gekoppelten HYNIC Einheiten zu einem Elafin Molekül betrug 1,31 mit einer Reinheit von 87%. Die ESI-MS Ergebnisse sowie die theoretisch zu erwartenden geladenen Ionenwerte und das errechnete Molekulargewicht (MW) sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

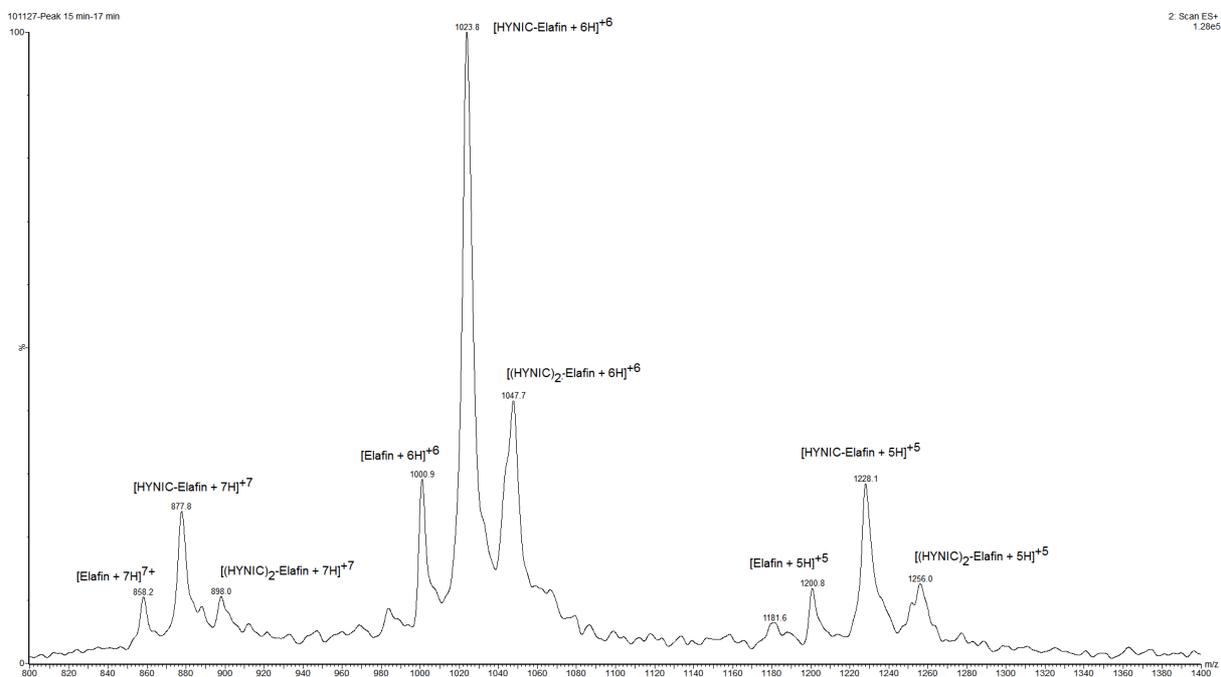


Abb. 5: ESI-MS Spektrum von HYNIC-Elafin Fraktion nach Isolierung durch HPLC.

Compound	Calculated MW	Charged ion (m/z)	Theoretical value	Experimental value
Elafin	6000	[M+5H] ⁵⁺	1201.8	1200.8
		[M+6H] ⁶⁺	1001.7	1000.9
		[M+7H] ⁷⁺	859.1	858.2
HYNIC-Elafin	6135.1	[M+5H] ⁵⁺	1229.0	1228.1
		[M+6H] ⁶⁺	1024.3	1023.8
		[M+7H] ⁷⁺	878.4	878.4
(HYNIC) ₂ -Elafin	6270.1	[M+5H] ⁵⁺	1256.0	1256.0
		[M+6H] ⁶⁺	1046.9	1047.7
		[M+7H] ⁷⁺	897.7	897.7

Tab. 3: ESI-MS Datenanalyse von der HYNIC-Elafin Fraktion nach Isolierung durch HPLC.

4.2 Markierung und radiochemische Analyse

Die Markierung des HYNIC-gekoppelten Elafin mit ^{99m}Tc wurde als sogenannte co-Konjugation unter Verwendung von Tricine als co-Ligand zur Stabilisierung der Tc(V)O Gruppe durchgeführt. Die RP-HPLC Analyse zeigte eine radiochemische Ausbeute von über 97%, bei der eine einzige radioaktive Art hergestellt wird, wie die RP-HPLC und Papierchromatographie (ITLC-SG) nachwies. Die spezifische Radioaktivität betrug mehr als 60GBq/μmol und die Stabilität des markierten Peptids in PBS beträgt bis 24h nach der Markierung mehr als 95%

4.3 Metabolische Stabilität im Plasma

Die Radiogelfiltrationschromatographie-Analyse nach Inkubation von ^{99m}Tc-Elafin im Rattenplasma wird in Abb. 6 dargestellt. Nach 24 Stunden Inkubationszeit blieben etwa 65% des ^{99m}Tc-Elafin intakt und zwei radioaktive Peaks wurden bei höheren Retentionszeiten (Rt) beobachtet, demonstriert als Metabolit A und B, die geringere Molekulargewichte haben müssen. Der Metabolit A, mit einer Menge von etwa 8% und einer Retentionszeit Rt_A = 18 min, lag in der Nähe des intakten Peptides (Rt = 16 min). Aufgrund dessen späterer Retentionszeit ist dieser radioaktive Metabolit sehr wahrscheinlich ein Fragment der Stammpeptidkette mit der Chelatgruppe, die bereits zum ^{99m}Tc konjugiert ist. Die Rt von Metabolit B (27%) ist identisch mit der Rt von Na^{99m}TcO₄ und ist vermutlich ein Spaltprodukt des Pertechnetats.

Weitere Analysen sind erforderlich, um das Ausmaß des Metabolismus der Peptidkette zu bestimmen. Abschließend hat sich Elafin als ausreichend widerstandsfähig gegen die metabolische Wirkung der Peptidasen erwiesen.

4.4 Analyse der Biodistribution

Vergleichende in vivo Studien unter Verwendung von SPECT in normalen Ratten von 0,1 min bis 22h p.i. für beide ^{99m}Tc -Elafin und $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ sind in Abbildung 7 abgebildet. Die Blut Clearance von ^{99m}Tc -Elafin ist schneller im Vergleich zu der von $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$. Initial boten beide Tracer vergleichbare maximale Blutwerte ($3,81 \pm 1,24$ für ^{99m}Tc -Elafin und $3,99 \pm 3,30$ % ID/g für $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$), aber bereits ab fünf min. p.i. sank die Blutkonzentration von ^{99m}Tc -Elafin rapide unter die Werte von $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ ($1,06 \pm 0,29$ und $1,83 \pm 0,21$ % ID/g) ab, was einer schnelleren Blut Clearance von ^{99m}Tc -Elafin entspricht.

Herz- und Lungen-Werte zeigten ein ähnliches kinetisches Muster mit hohen Initialwerten, die dann rapide wieder abfielen. Der Vergleich der Zeit-Radioaktivitätskurven, ausgedrückt in % ID/g von beiden Nukliden für Herz, Lungen und Leber, zeigte eine enge Beziehung zu der entsprechenden Blut-Zeit-Radioaktivitätskurve. Dies führt zu der Annahme, dass es eine Korrelation zwischen dem kinetischen Muster der Biodistribution dieser speziellen Organe und der Blutclearance gibt.

Im Magen war die Aufnahme von ^{99m}Tc -Elafin im Vergleich zu der von $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ ($0,35 \pm 0,06$ versus $10,03 \pm 0,07$ % ID/g nach 30 min p.i.) relativ niedrig. Die Aufnahme von ^{99m}Tc -Elafin in der Schilddrüse war eher gering ($0,21 \pm 0,06$ versus $2,16 \pm 0,06$ % ID/g nach 30 min p.i.). Die niedrige Aufnahme von ^{99m}Tc -Elafin im Magen und Schilddrüse wies auf eine minimale Leckage von freiem $^{99m}\text{TcO}_4$ von dem injizierten ^{99m}Tc -Elafin hin. Diese Beobachtung entspricht den Ergebnissen der Untersuchungen über die metabolische Stabilität im Plasma (siehe 4.2).

Die Nuklid Aufnahme im Gehirn, in den Eingeweiden, Muskeln und im Fettgewebe war unwesentlich gering und für beide Nuklide vergleichbar.

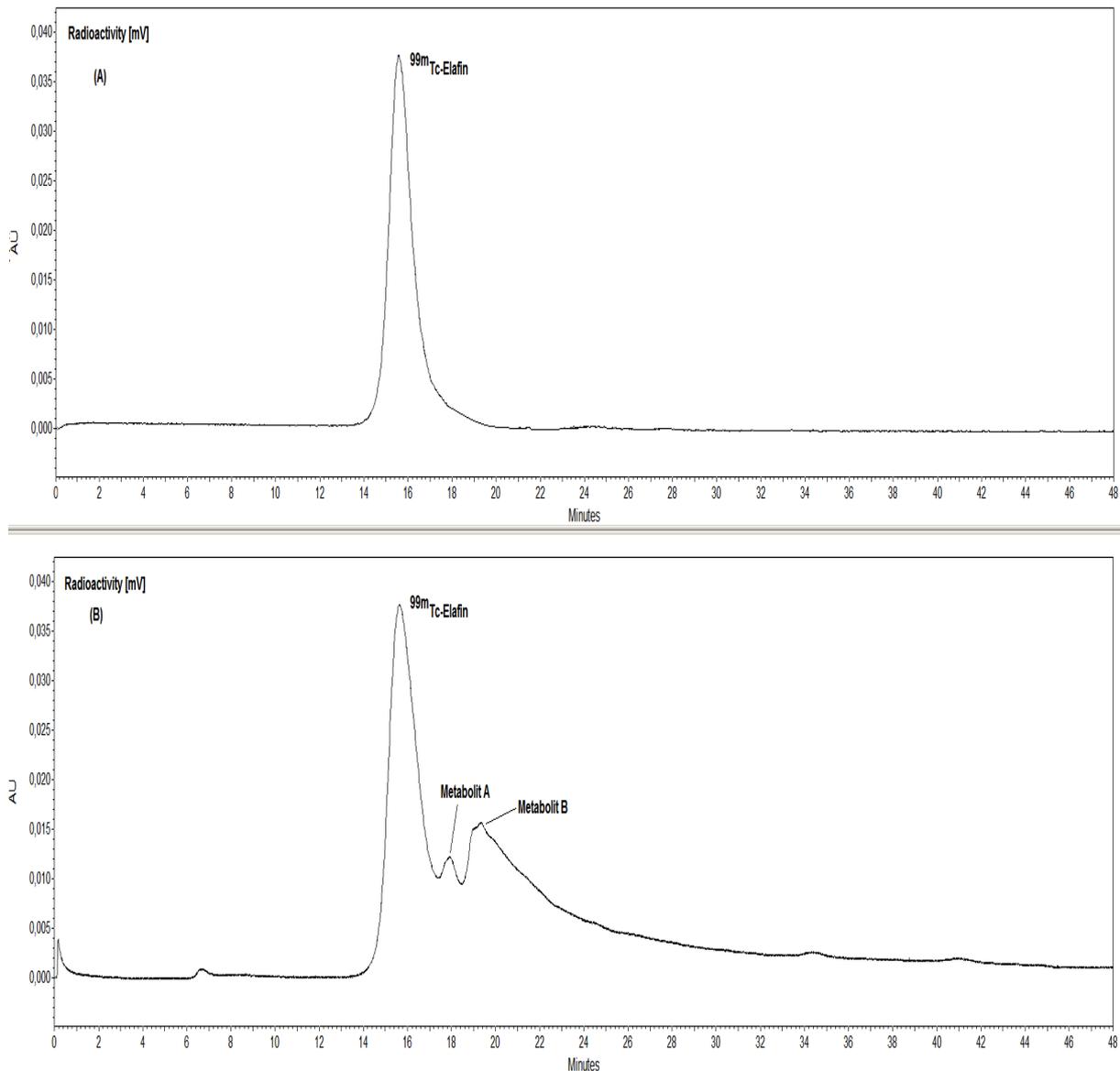


Abb. 6: Radiogelfiltrationschromatogramm von ^{99m}Tc -Elafin. (A): Vor Inkubation; (B) 24h nach Inkubation im Rattenplasma.

Die Aufnahme in der Leber war für $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ zu allen Zeitpunkten höher. Den Hauptausscheidungsweg für ^{99m}Tc -Elafin stellten die Nieren dar. Die kationischen Eigenschaften von Elafin könnten für die hohe Nierenretention wichtig sein. Die beobachteten Nierenwerte für ^{99m}Tc -Elafin waren allesamt höher als diejenigen von $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$. Die Aufnahme von ^{99m}Tc -Elafin betrug auch nach 23h p.i. immer noch $4,98 \pm 1,24\%$ ID/g.

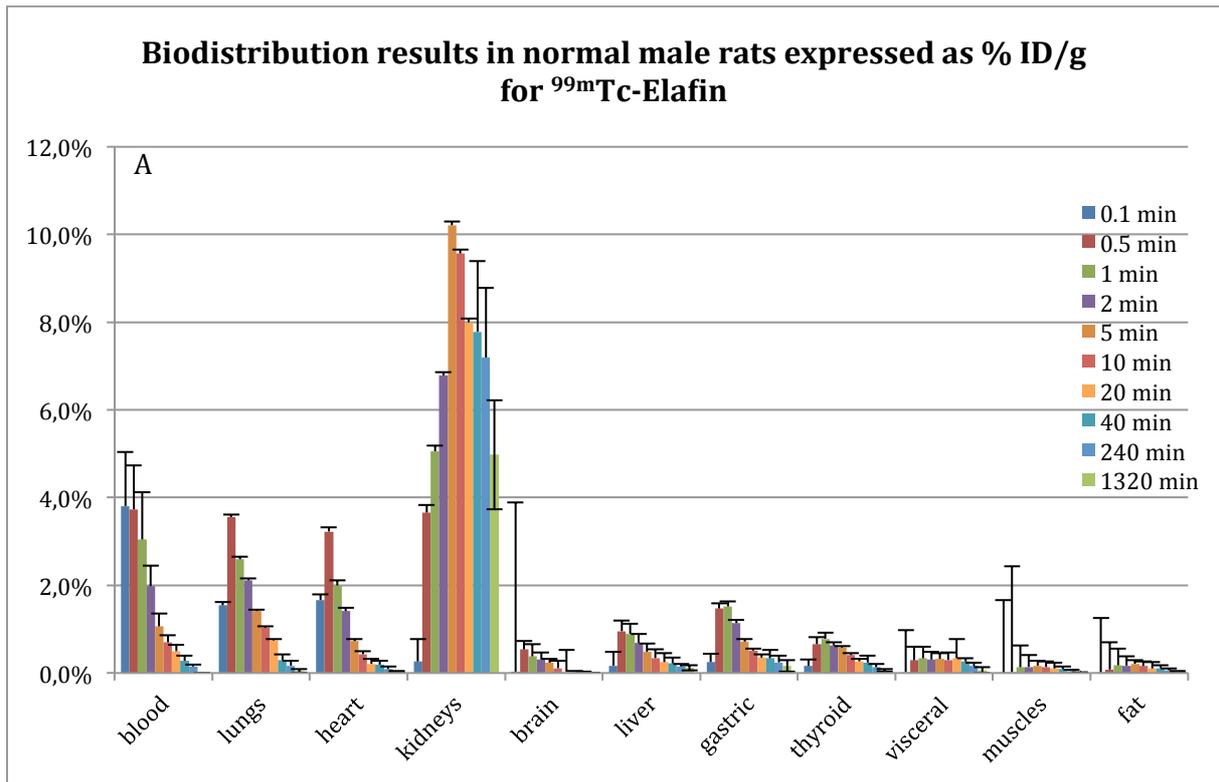


Abb. 7a: Biodistribution von ^{99m}Tc -Elafin in normalen männlichen Ratten ausgedrückt in % ID/g.

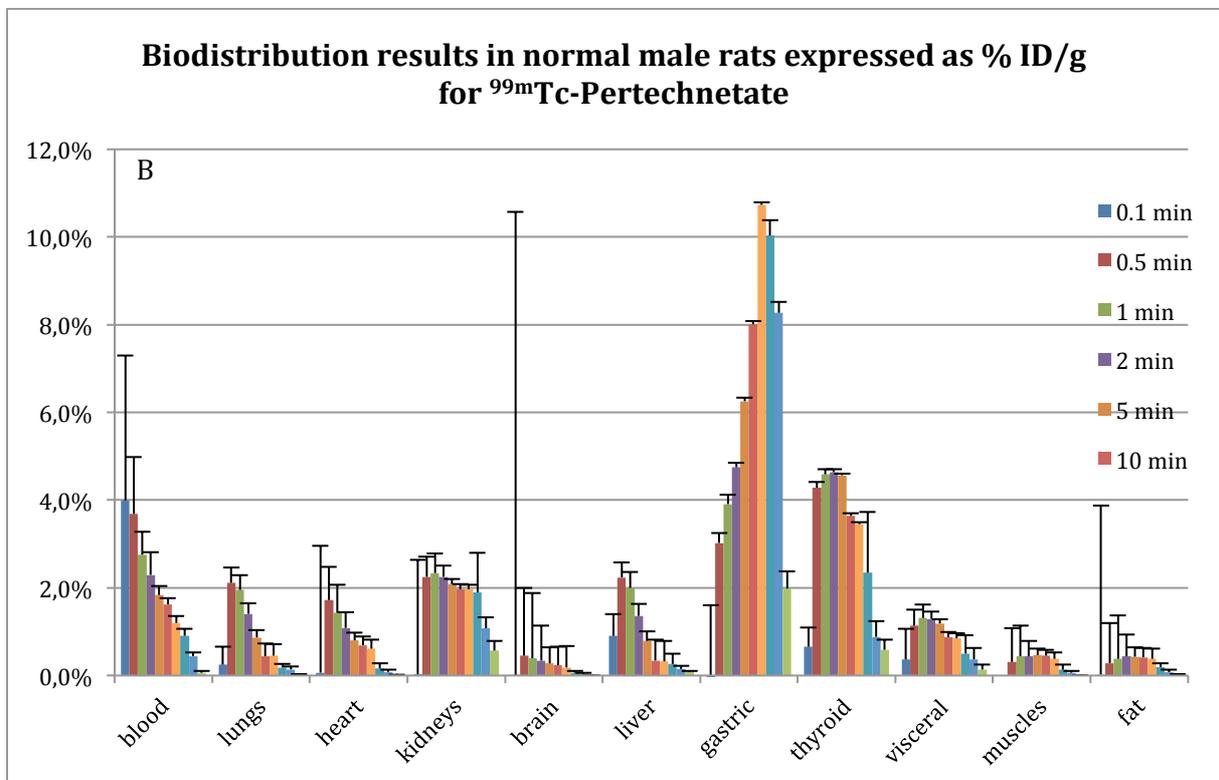


Abb. 7b: Biodistribution von ^{99m}Tc -Pertechnetat in normalen männlichen Ratten ausgedrückt in % ID/g.

4.5 Pharmakokinetische Analyse

Die Blutwerte (% ID/g) für ^{99m}Tc -Elafin und $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ wurden unter Anwendung von pharmakokinetischen Kompartimentmodellen (PK) (Abb. 8) gegen die Zeit aufgetragen. Sowohl der F-Test und die Akaike Information Criteria (AIC) als auch ein zwei Kompartimentmodell wurden hierbei verwendet. Von der % ID/g Zeitkurve wurden die Area Under the Curve (AUC)-Werte für jedes Organ bis 1320 Minuten mit Hilfe der Trapezregel berechnet und die Ergebnisse in Tabelle 4 zusammengefasst. Für die initialen Blutwerte ($t = 0$ min) wurden diejenigen aus den am besten passenden PK verwendet, während für die anderen Organe die initialen Werte % ID/g ($t = 0$ min) angenommen wurden.

Für ^{99m}Tc -Elafin zeigten die Nieren die höchsten AUC Werte. Diese waren etwa 32,6-mal höher als bei $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$. Die niedrigsten AUC-Werte fanden sich für das Gehirn, die Muskeln und das Fettgewebe, sowohl bei ^{99m}Tc -Elafin als auch bei $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$. Die Leber AUC war für ^{99m}Tc -Elafin circa 70% höher als die entsprechenden für $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$, was einer höheren und längeren währenden Akkumulation in der Leber von ^{99m}Tc -Elafin entspricht. Die deutlich höheren Werte für ^{99m}Tc -Elafin in den Nieren, die 73-mal höher waren als die in der Leber, wiesen auf eine vorwiegend renale Elimination hin. ^{99m}Tc -Elafin scheint jedoch deutlich schneller eliminiert zu werden, denn es zeigte eine niedrigere AUC des Blutes (12,4% ID x min./g) und größere Clearance Werte ($\text{CL} = 0,83\%$ ID/g/min.) als $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ (AUC Blut = 721,0% ID x min./g, $\text{CL} = 0,14\%$ ID/g/min.).

4.6 SPECT – Szintigraphie

Die Verteilung von ^{99m}Tc -Elafin wurde mit funktioneller, szintigraphischer Bildgebung untersucht und abgebildet. Die Lokalisation der Radioaktivitäten in den entsprechenden Organen wurde zusätzlich mittels Fusion der funktionellen Hi-SPECTTM Aufnahmen mit MRT Aufnahmen gezeigt. Dies zeigte eine eindeutige Speicherung von ^{99m}Tc -Elafin in den Nieren und der Blase (Abb. 9). Die Speicherung von $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ zeigt sich dagegen und wie zu erwarten in der Schilddrüse und dem Magen (Abb. 10). Eine bedeutende Akkumulation im Gehirn oder anderen Organen konnte für beide Nuklide nicht festgestellt werden. Die Unterschiede in der Verteilung werden als indirekter Beweis für die in vivo Stabilität der Elafin-Markierung betrachtet.

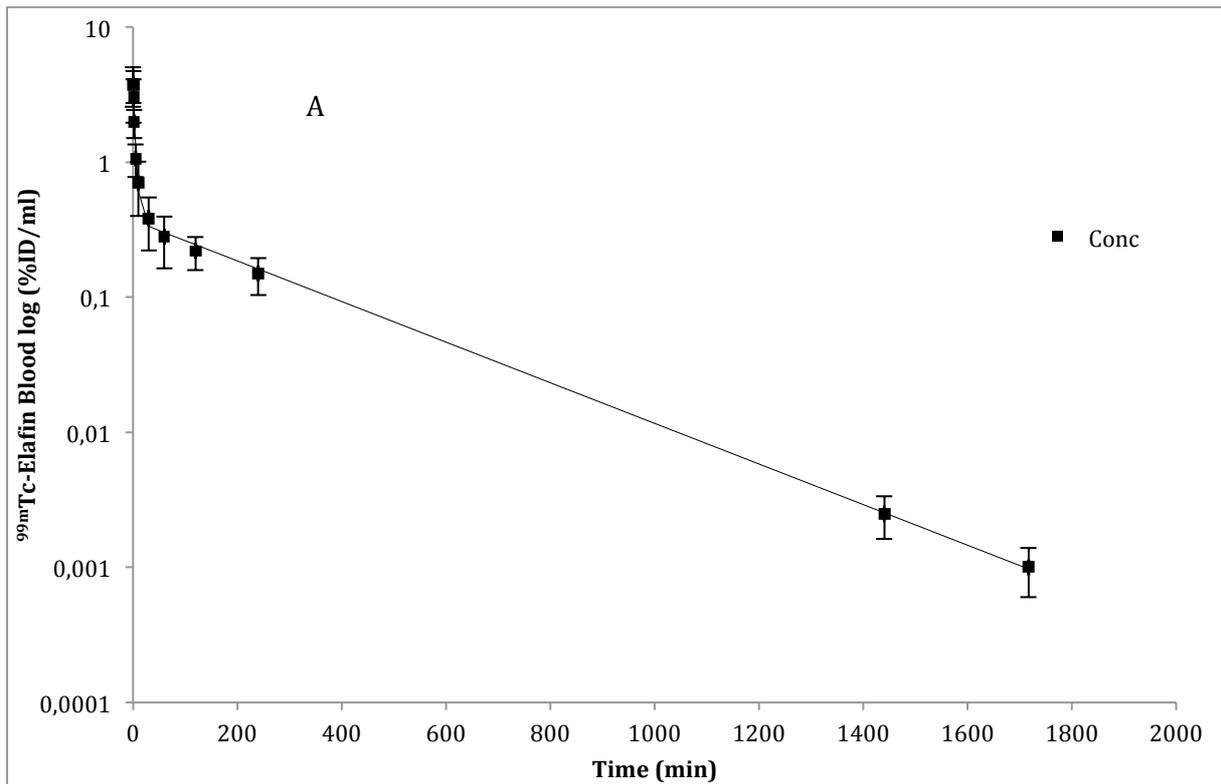


Abb. 8a: Blut log (% ID/g) vs. Zeit nach der zwei Kompartiment-Modellanalyse für ^{99m}Tc -Elafin.

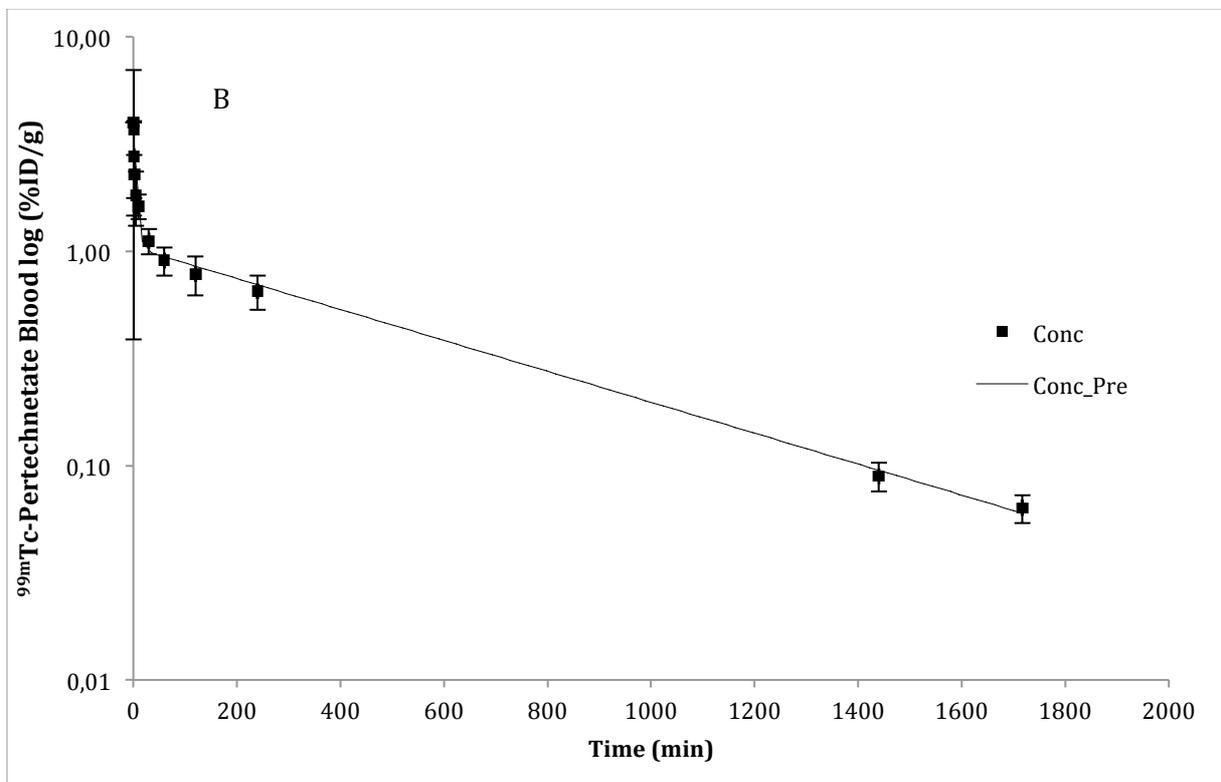


Abb. 8b: Blut log (% ID/g) vs. Zeit nach der zwei Kompartiment-Modellanalyse für $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$.

^{99m}Tc-Elafin							
Best fit model	A (%ID/mg)	α (1/.)	B (%ID/mg)	β (1/min)	t _{1/2a} (min)	t _{1/2b} (min)	
$C = A x e^{-\alpha x t} + B x e^{-\beta x t}$	3.39	0.26	0.37	0.003	2.68	200.2	
	C _{max} ^a (%ID/g)	t _{max} (min)	CL (MBq)/(%ID×min/g)	AUC (%ID×min/g)	AUMC (%ID×min ² /g)	MRT (min)	
Blood	3.81(1.24)	0.1	0.83	120.4 ^b	31044.9	257.8	
Heart	3.2(0.1)	0.5	0.8	124.4	62872.4	505.4	
Liver	0.96(0.23)	0.5	0.2	427.9	884758.0	2067.7	
Lungs	3.55(0.07)	0.5	0.4	233.4	131309.3	562.5	
Brain	0.54(0.19)	0.5	5.0	19.8	5181.1	261.1	
Thyroid	0.78(0.14)	1	0.5	221.3	207947.3	956.9	
Gastric	1.52(0.11)	1	0.2	587.8	1055285.5	1795.4	
Muscles	0.17(0.13)	5	1.5	64.6	39821.2	616.0	
Fat	0.211(0.08)	5	1.1	87.5	65831.1	752.5	
Kidneys	10.2(1.0)	5	0.004	22782.1	64998375.7	2853.0	
Visceral	0.34(0.43)	20	0.4	246.0	238540.0	969.7	
^{99m}TcO₄							
Best fit model	A (%ID/mg)	α (1/min)	B (%ID/mg)	β (1/min)	t _{1/2a} (min)	t _{1/2b} (min)	
$C = A x e^{-\alpha x t} + B x e^{-\beta x t}$	2.54	0.18	1.04	0.002	3.8	417.2	
	C _{max} ^a (%ID/g)	t _{max} (min)	CL (MBq)/(%ID×min/g)	AUC (%ID×min/g)	AUMC (%ID×min ² /g)	MRT (min)	
Blood	3.99(3.30)	0.1	0.14	721.0 ^b	317031.3	439.7	
Heart	1.72(0.75)	0.5	1.0	94.9	36751.7	387.2	
Liver	2.24(0.35)	0.5	0.3	300.5	415386.1	1382.0	
Lungs	2.11(0.35)	0.5	0.6	154.4	63997.8	414.4	
Brain	0.45(1.45)	0.5	2.6	38.6	7462.7	193.5	
Thyroid	4.64(0.07)	1	0.1	1728.1	1587686.1	918.7	
Gastric	12.11(0.07)	30	0.01	9288.8	5970640.7	642.8	
Muscles	0.47(0.14)	5	1.4	73.6	17357.3	235.7	
Fat	0.44(0.5)	2	0.9	108.9	55591.1	510.7	
Kidneys	2.34(0.44)	1	0.05	1862.3	1994830.1	1071.1	
Visceral	1.31(0.31)	1	0.2	533.5	482836.2	905.1	

^a Experimental values expressed as a mean of 5 animals with the SD in the parenthesis.

^b For the calculation of blood AUC by the trapezoid rule for t = 0 min the values calculated for concentration after the model fitting were used: $C^0_{\text{Pertechnetat}} = 2.54\% \text{ ID/g}$; $C^0_{\text{Elafin}} = 3.39\% \text{ ID/g}$.

Tab. 4: PK-Daten für ^{99m}Tc-Elafin und Na^{99m}TcO₄

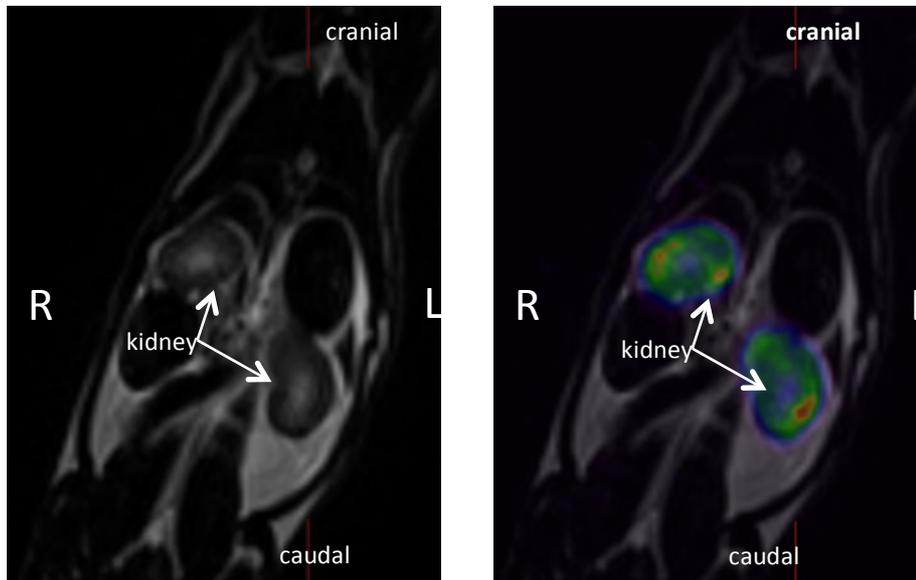


Abb. 9: MRT nach Verabreichung von ^{99m}Tc-Elafin (links) und Fusion mit SPECT Scan zeigt die Speicherung der Radioaktivität in den Nieren (4h p.i.).

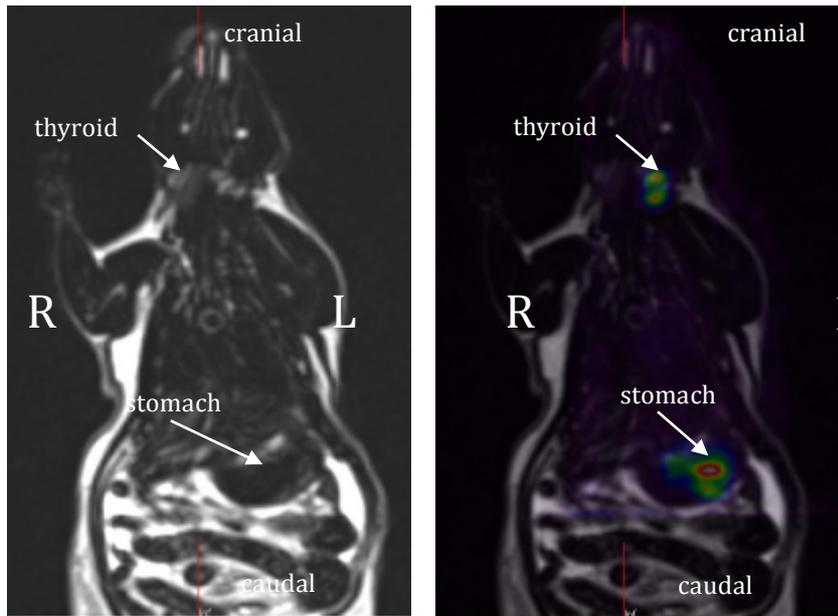


Abb. 10: MRT nach Verabreichung von $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ (links) und Fusion mit SPECT Scan zeigt die Speicherung der Radioaktivität in der Schilddrüse und Magen (4h p.i.).

4.7 Dynamische Nierenszintigraphie

Bei zwei zusätzlichen Ratten (Nr. 6 und 7 in der Tab. 1) wurde die renale Radioaktivität durch eine planare Szintigraphie nach der Injektion von $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Elafin kontinuierlich über 240 Minuten gemessen. Mit Hilfe der ROI-Technik konnte eine %-ID-Zeitkurve der Nieren erstellt werden, die in Abbildung 11 dargestellt wird. Eine signifikante Speicherung der Radioaktivität begann in den Nieren kurz nach der Zirkulationsphase (60s p.i.) und zeigte einen initialen steilen Anstieg mit Erreichen des ersten Maximums nach fünf Minuten (33%ID in beiden Nieren). Darauf folgend fiel die Radioaktivität bis zu einem zwischenzeitlichen Minimum (etwa 25% ID in der 14. Minute) ab. Danach kam es zu einem langsamen erneuten Anstieg bis zu 31% ID in der 45. Minute p.i., bis es dann letztendlich langsam kontinuierlich bis auf 23% ID in der 240 Minute p.i. sank.

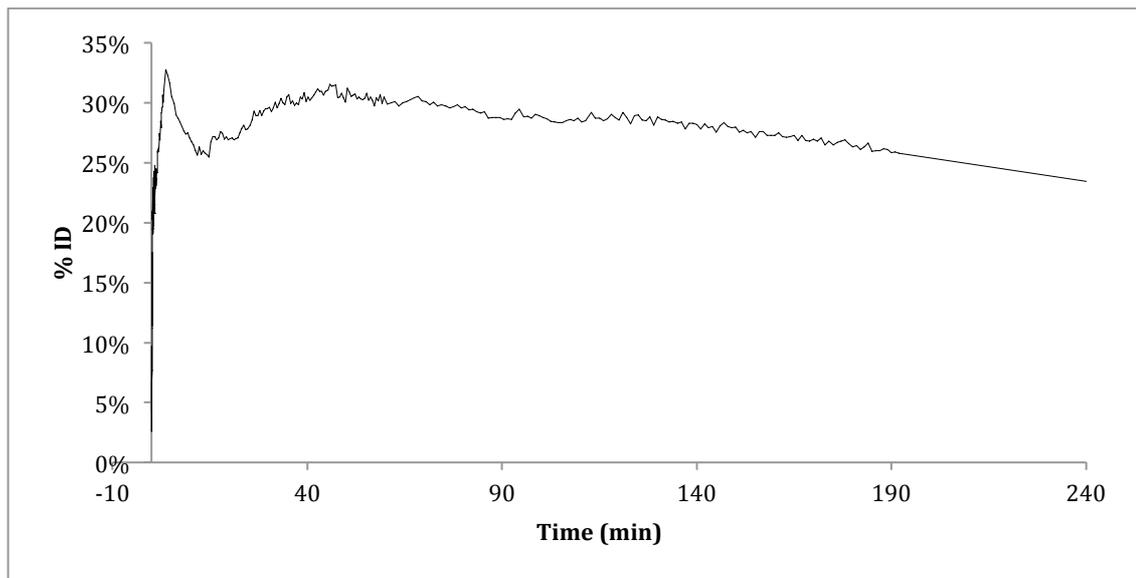


Abb. 11: Nierenkinetik von ^{99m}Tc -Elafin in der dynamischen Nierenszintigraphie 0 – 240min p.i. (n = 2).

4.8 Organverteilung in den entnommenen Organen

Die einzelnen Organen wurden 24 Stunden nach der Injektion des ^{99m}Tc -Elafin entnommen und deren Radioaktivität gemessen. ^{99m}Tc -Elafin wurde fast ausschließlich in den Nieren gefunden (Abb. 12) ($4,98 \pm 1,24\%$ ID/g ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ $0,57 \pm 0,21\%$ ID/g). Die Kontrolltiere, denen $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ verabreicht wurde, zeigten ein Organverteilungsmuster, wie erwartet mit der höchsten Anreicherung im Magen und in der Schilddrüse ($1,98 \pm 0,4$ und $0,59 \pm 0,23\%$ ID/g), die in der Schilddrüse 12,4-mal und im Magen 9,8-mal höher waren als die von ^{99m}Tc -Elafin.

Die anderen Organe wie Gehirn, Herz, Leber, Lunge, Muskel, Fettgewebe, Kolon und Dünndarm zeigten nur geringe Konzentrationsunterschiede zwischen den Radionukliden.

Aus den Unterschieden zwischen dem Organverteilungsmuster von ^{99m}Tc -Elafin und $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ kann geschlossen werden, dass die ^{99m}Tc Markierung von Elafin in Bezug auf die Abspaltung von ^{99m}Tc -Pertechnetat aus dem markierten Elafin Molekül in vivo stabil ist.

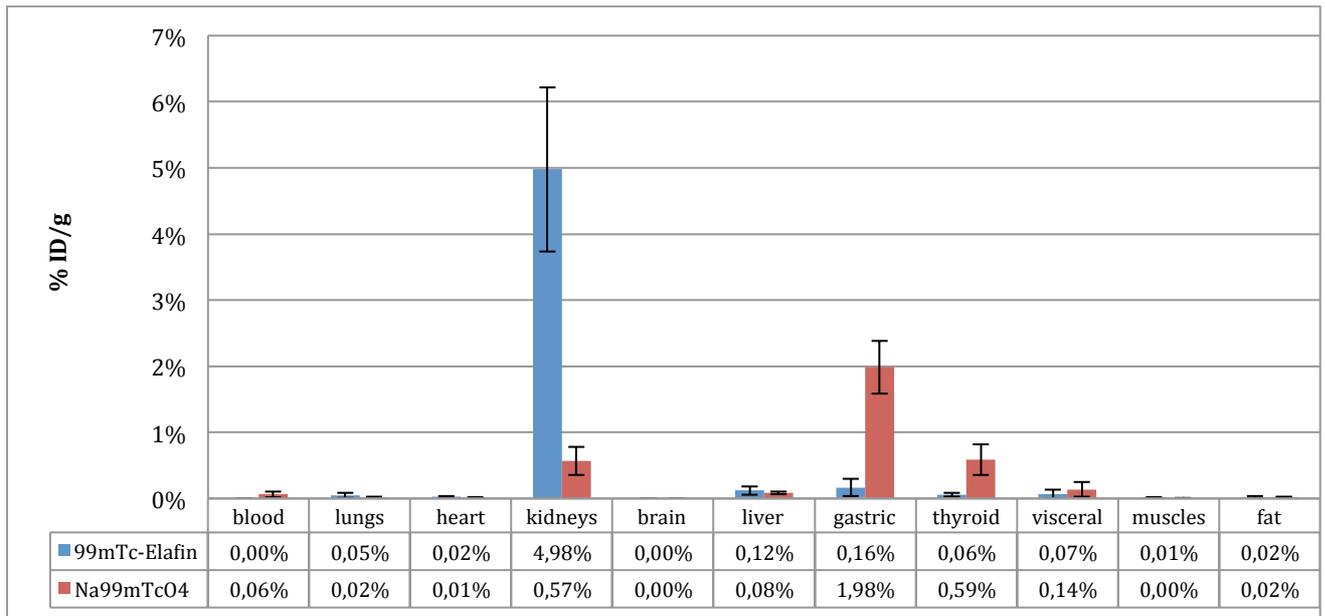


Abb. 12: Vergleich der Organdistribution von ^{99m}Tc -Elafin und $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ 24h p.i. Spezifische Radioaktivität der entnommenen Organe. Balken: Mittelwerte \pm SD, n = 5

5. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Angesichts der enormen Bedeutung der Proteasen für den Stoffwechsel und für die Entstehung von Krankheiten ist es nicht verwunderlich, dass in den letzten zwanzig Jahren auf diesem Gebiet erhebliche Anstrengungen unternommen wurden, um einen potenten und selektiven Inhibitor der Elastasen zu entwickeln. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, haben in der Vergangenheit frühere Studien mit unterschiedlichen Tiermodellen verschiedensten therapeutischen Nutzen von Elafin offengelegt. Wegen seiner multiplen antibakteriellen, immunmodulatorischen und vor allen antiproteatischen Effekten (Guyot et al. 2010) ist Elafin von großem pharmakologischen Interesse.

Eine Steigerung der Antiproteasen mit humanem Elafin ist eine effektive Therapiemöglichkeit für entzündliche, systemische und pulmonale Erkrankungen und zur Reduktion von durch Hypoperfusion bedingtem Entzündungsgeschehen (Shaw et al. 2011).

In dieser Studie sollte erstmalig die Biodistribution und Pharmakokinetik von ^{99m}Tc -Elafin untersucht werden. Dies geschah mit Hilfe von dynamischen Szintigraphien und SPECT-Scans mit nachfolgender 3D Fusion mit zusätzlich erhobenen MRT Daten. Des Weiteren wurde die Pharmakokinetik der Substanz mit Hilfe von entnommenem Gewebe und Blutproben bestimmt.

Die radioaktive Markierung von Elafin mit ^{99m}Tc erfolgte mit einer hohen Ausbeute von ca. 97% und hoher spezifischer Radioaktivität ($> 60\text{GBq}/\mu\text{mol}$). Die Stabilität der markierten Substanz wurde in vitro mit Hilfe von PBS und Rattenplasma bestimmt. Während nach 24-stündiger Inkubation in PBS über 95% des getesteten ^{99m}Tc -Elafin noch intakt blieb, kam es im Rattenplasma zum Teil zu einer partiellen metabolischen Degradierung, aber etwa 65% des ^{99m}Tc -Elafin war nach 24 Stunden noch intakt. Da keine Untersuchungen bezüglich der Stabilität im menschlichen Blutplasma durchgeführt wurden, sollten potentielle speziesspezifische Unterschiede in weiteren präklinischen Untersuchungen beobachtet werden. Studien aus der Vergangenheit bestätigten bereits, dass die in vitro Metaboliten im Plasma zwischen den Spezies (Maus, Ratte, Mensch) die gleichen sind, sie sich jedoch in ihrer Menge unterscheiden. Diese Unterschiede scheinen durch den unterschiedlichen

Metabolismus und unterschiedliche Enzyme zwischen den Spezies bedingt zu sein (Linder et al. 2009, Gu et al. 2011).

Das Vorkommen von Metabolit A mit dessen Retentionszeit ähnlich der des intakten Peptides führte zu der Annahme, dass der metabolische Prozess am C-Terminus stattfinden müsste, wo die Aminosäuren offensichtlich am angreifbarsten zu sein scheinen.

Die Blutkonzentrationswerte für ^{99m}Tc -Elafin und $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ passen in ein sogenanntes Zwei-Kompartiment-Kinetik-Modell mit einer Kinetik erster und zweiter Ordnung ($t_{1/2a} = 2,7$ min, $t_{1/2b} = 200,2$ min) und ($t_{1/2a} = 3,8$ min, $t_{1/2b} = 417,2$ min) (Tab. 3). ^{99m}Tc -Elafin bewegt sich offensichtlich innerhalb zweier Kompartimente (Blut und Nieren).

Die sechs- bis zehnmals niedrigeren Blut-AUC- und AUMC-Werte für ^{99m}Tc -Elafin, verglichen mit $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$, zeigten eine niedrige Bioverfügbarkeit von ^{99m}Tc -Elafin im Gegensatz zu der von $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$. Im Gegensatz dazu wurden sehr hohe Nieren AUC- und AUMC-Werte für ^{99m}Tc -Elafin beobachtet (12,2- und 32,6-mal höher als bei $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$). Die Akkumulation und Retention in den Nieren sind wohl vor allem bedingt durch die Ladung des ^{99m}Tc -Elafin Moleküls und die Hydrophilie des Moleküls. Der Literatur nach zu urteilen, erfolgt die tubuläre Reabsorption, die oftmals von einer lysosomalen Degradation des absorbierten Proteins gefolgt wird, durch rezeptorvermittelte Endozytose nach der Bindung an den Low-Density Lipoprotein Rezeptor. Megalin mit seinem Co-Rezeptor Cubilin fungieren hier vor allem als Rezeptoren (Maack, 1975, Tojo und Kinugasa, 2012). Die tubuläre Reabsorption durch die Bindung an Megalin ist für mehr als 50 Proteine beschrieben worden, die durch Cubilin für mehr als zehn (Marzolo und Farfán, 2011).

Insbesondere die tubuläre Reabsorption der peptidartigen Protease Inhibitoren wurde intensiv für Aprotinin (Trasylol) und Cystatin C untersucht. Beide Moleküle können als Vergleich zu Elafin dienen (6 kDa, pI 9,7), da sie beide funktionell und physikochemikalisch dem Elafin ähneln (Aprotinin 6,5 kDa, pI 10,5; Cystatin C 13,3 kDa, pI 9,3). ^{99m}Tc -Aprotinin hat vier Stunden nach der Injektion die höchste spezifische Anreicherung (% ID/g) in der Niere im Vergleich zu anderen Organen (Komarek et al. 2005). Die hohe Anreicherung von ^{99m}Tc -Elafin in den Nieren ist laut Literatur anderen ^{99m}Tc - Markierten Peptiden ähnlich.

Um einwandfreie Daten zu erhalten, kamen nur gesunde Ratten zur Auswertung, bei denen die Testsubstanzen sicher intravenös verabreicht wurden. Die Tiere, bei denen es während der intravenösen Injektion zu einem Paravasat gekommen war, wurden von der weiteren Verwendung ausgeschlossen.

Mittels SPECT-Aufnahmen, gefolgt von der Fusion mit MRT Daten, konnten die Radioaktivitäten in den unterschiedlichen Organen bestimmt werden. Bei der Auswertung der Aufnahmen konnte eine signifikante Anreicherung von ^{99m}Tc -Elafin in den Nieren beobachtet werden. Diese Feststellung konnte durch die Radioaktivitätsmessung in den entnommenen Organen untermauert werden. In der Kontrollgruppe mit $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ [Natriumpertechnetat] wurde, wie vermutet und von der Schilddrüsenszintigraphie bekannt, die Substanz in der Schilddrüse gespeichert. Außerdem fand sich auch eine Anreicherung im Magen hauptsächlich in den Parietalzellen im Fundus und Corpus (Meier-Ruge und Friedrich, 1969). Der deutliche Unterschied in der Organverteilung der Nuklide kann als indirekter Nachweis für die Stabilität von ^{99m}Tc -Elafin in Bezug auf die Abspaltung von Pertechnetat aufgefasst werden.

Die hohe Affinität von ^{99m}Tc -Elafin zu den Nieren ist von großer Bedeutung, weil sie als Ansatz bzw. als therapeutisches Potential für die Entwicklung von Pharmaka zur Behandlung u. a. von entzündlichen und systemischen Erkrankungen der Nieren dienen können. Auch 24 Stunden nach der intravenösen Applikation war in den Nieren noch eine Restradioaktivität von $4,98 \pm 1,24\%$ ID/g der initial injizierten Aktivität der Substanz nachweisbar. Das heißt, dass Elafin nur langsam aus den Nieren eliminiert wird.

Über einen möglichen therapeutischen Einsatz zur Prävention von den sogenannten CAN (chronic allograft nephropathy) durch intravenöse Gabe von Elafin könnte diskutiert werden. Dabei handelt es sich um eine der häufigsten Ursachen der Transplantatabstoßung. Die CAN tritt frühestens drei Monate nach einer Nierentransplantation auf und ist die Folge einer Ischämie, die wiederum zu einer vermehrten Ausschüttung von neutrophilen Granulozyten und Elastase führt (Shaw und Wiedow, 2011).

Von dem günstigen Einfluss des Serin-Elastase-Inhibitors bei experimentell induzierter Myokarditis und dem damit verbundenen ischämischen Reperfusionsschaden wurde berichtet (Lee et al. 1998). Ebenso ließ sich tierexperimentell nach wiederholter Ischämie und Myokardinfarkt die myokardiale Funktion nach Gabe von Elafin verbessern (Tiefenbacher et

al. 1997). Ferner wurde vermutet, dass das Auftreten einer postkardialen Transplantationskoronararteriopathie sowie eine Reduktion der myokardialen Nekrose nach im Tierexperiment durchgeführter Herztransplantation nach Gabe von Elafin minimiert wird (Cowan et al. 1996).

Sowohl Elafin als auch sein Vorläufer Trappin-2 könnten als potentiell antientzündliche Substanzen ein therapeutisches Potential zur Behandlung verschiedener entzündlicher Erkrankungen der Lunge besitzen (Zani et al. 2004). Es konnte in den hier beschriebenen Tierexperimenten jedoch weder bei der Hi-SPECTTM-Untersuchung noch in den Untersuchungen der entnommenen Lungen nach parenteraler Gabe von ^{99m}Tc-Elafin eine signifikante Anreicherung von ^{99m}Tc-Elafin in den Lungen festgestellt werden, so dass angenommen werden muss, dass die intravenöse Darreichung in dieser Form nicht ausreichend ist bzw. nicht zum Ziel führen kann oder es bei gesundem Lungengewebe nicht zu einer signifikant erhöhten Anreicherung kommt. Die perorale Gabe in Nativform könnte wegen des kleinen Moleküls an der Magensäure scheitern. Eine Möglichkeit wäre, magensaftresistente Darreichungsformen bzw. magensaftresistente Tabletten oder Kapseln zu applizieren. Ob die Verabreichung der Substanzen auf einem anderen Weg, z.B. per Inhalation sinnvoll ist, wurde von Zani et al. 2011 untersucht und bestätigt, da sie dabei ihre strukturelle Integrität und volle inhibierende Potenz gegenüber den zu hemmenden Ziel-Enzymen beibehalten. Eine subcutane Applikation wäre eine zusätzliche therapeutische Option zur Darreichung.

Auch bei der Entwicklung der pulmonalen Hypertonie spielen diese Inhibitoren eine Rolle. Experimentelle Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Veränderung der Elastin- und Kollagensynthese mit der Entwicklung und Progression einer pulmonalen Hypertonie mit vermehrter Ausschüttung von endogenen vaskulären Elastasen (EVE) (Todorovich-Hunter et al. 1988, Zhu et al. 1994) in Zusammenhang steht. Dagegen führte eine Hemmung der Elastase-Aktivität zu einer Reduktion oder verhindert die Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie (Maruyama et al. 1991, Ye und Rabinovitch, 1991).

Zaidi et al. 1999 konnten im Tierversuch beobachten, dass eine gezielte vermehrte Ausschüttung von Elafin eine schützende Wirkung auf die kardiale Dysfunktion und Mortalität nach Virus-Myokarditis auszuüben vermag. Es konnte jedoch bei der Untersuchung auch im gesunden Rattenherzen, zumindest bei dieser Applikationsform, keine

signifikante Anreicherung von Elafin nachgewiesen werden, sodass sich daraus eine therapeutische Überlegung auf diesem Wege bei gesunden Ratten erübrigt.

Ein weiteres wichtiges Ergebnis dieser Arbeit ist, dass im zentralen Nervensystem, insbesondere im gesunden Rattengehirn keine signifikante Radioaktivität nachweisbar war. Das ist ein Hinweis darauf, dass Elafin die intakte Blut-Hirn-Schranke nicht zu überwinden vermag. Diese Feststellung ist für die therapeutische Nutzung von erheblicher Bedeutung, da hierdurch bei intakter Blut-Hirn-Schranke keine Wirkung, insbesondere jedoch keine Nebenwirkung auf das zentrale Nervensystem zu erwarten wäre.

Die Placenta-Durchgängigkeit, die auch von Bedeutung ist in Hinblick auf die mögliche toxische Wirkung in der embryonalen Entwicklung, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Es ist bekannt, dass die SLPI-Konzentration bei Schwangeren im dritten Schwangerschaftsmonat höher ist als die im zweiten. Es wird vermutet, dass SLPI in der Amnionflüssigkeit zur Immunabwehr in der Schwangerschaft beiträgt (Zhang et al. 2001).

Wie erwähnt, haben bisherige Studien an unterschiedlichen Tiermodellen dem Elafin vielfältigen therapeutischen Nutzen zugeschrieben. Wegen seiner multiplen Wirkungen wie antibakterieller-, immunmodulierender- und antiproteatischer Wirkung (Guyot et al. 2010) ist Elafin wie bereits erwähnt von großem pharmakologischem Interesse. Eine Erhöhung der Antiproteasen mit humanem Elafin ist eine effektive Strategie zur Behandlung von entzündlichen-, systemischen- und pulmonalen Erkrankungen und zur Verminderung einer Entzündung, die durch Minderperfusion bedingt ist (Shaw und Wiedow, 2011).

6. ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel dieser Arbeit war es, Erkenntnisse über die Biodistribution und die Pharmakokinetik von Elafin an Hand eines Rattenmodells zu gewinnen. Als Testsubstanzen dienten ^{99m}Tc -Elafin und für die Kontrollgruppe ^{99m}Tc -Pertechnetat. Die radioaktiven Testsubstanzen wurden intravenös verabreicht.

Die Analyse der Blutkinetik basierte auf Blutuntersuchungen von einer Minute bis 24 Stunden nach der Injektion der Testsubstanzen.

Die Elimination des radioaktiven Materials wurde in einem am besten passenden sogenannten Zwei-Kompartiment-Modell untersucht.

Es stellte sich heraus, dass ^{99m}Tc -Elafin fast ausschließlich in den Nieren gespeichert wurde. Diese Beobachtung wurde durch zwei verschiedene voneinander unabhängige Messmethoden untermauert. Die Hi-SPECTTM-Scans mit anschließender MRT Fusion ergaben eine identische Organverteilung mit vergleichbaren Ergebnissen mit der Radioaktivitätsmessung in den entnommenen Organen nach 24 Stunden. Die hier erstmalig gewonnenen Biodistributions- und Pharmakokinetikdaten sind von großer Bedeutung, weil sich daraus Konsequenzen für die therapeutische Anwendbarkeit und die Entwicklung von unterschiedlichsten Pharmaka ergeben könnten.

Besonderes Augenmerk fiel auf die Tatsache, dass sich im gesunden Rattengehirn mit intakter Blut-Hirn-Schranke weder in der Bildgebung noch in der ex vivo Messung der Organe keine Radioaktivität nachweisen ließ. Das bedeutet, dass Elafin die sogenannte Blut-Hirnschranke nicht zu überwinden vermag, und somit wären keine negativen Auswirkungen auf die Hirnfunktion zu erwarten.

In der Lunge gesunder Ratten hatte bei dieser Applikationsart keine Anreicherung von ^{99m}Tc -Elafin stattgefunden. Ob eine andere Applikationsart doch zu einer Aufnahme der Substanz in der Lunge führt, bleibt abzuwarten. In der Literatur wurde dem Elafin eine große therapeutische Wirkung für dieses Organ zugeschrieben. Deshalb sind weitere Untersuchungen mit anderem Darreichungsformen sowie bei unterschiedlichen Spezies von großer Wichtigkeit.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Abbenante G, Fairlie DP. Protease inhibitors in the clinic. *Med Chem* 2005; 1, 71-104
- Abian O, Vega S, Sancho J et al. Allosteric inhibitors of the NS3 protease from the hepatitis C virus. *PLoS One* 2013 ; 8(7):e69773.doi:10.1371/journal.pone.0079773
- Aratani Y, Koyama H, Nyui S et al. Severe impairment in early host defense against *Candida albicans* in mice deficient in myeloperoxidase. *Infect Immun* 1999; 67(4):1828-36
- Barolet AW, Nili N, Cheema A et al. Arterial elastase activity after balloon angioplasty and effects of elafin, an elastase inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21(8):1269-74
- Baranger L, Zani ML, Labas V et al. Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) is, like its homologue trappin-2 (pre-elafin), a transglutaminase substrate. *PLoS One* 2011; 6(6):e20976. doi: 10.1371/journal.pone.0020976
- Belaouaj A, McCarthy R, Baumann M et al. Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis. *Nature Medicine* 1998; 4, 615-618
- Belaouaj A, Kim KS, Shapiro SD. Degradation of outer membrane protein A in *Escherichia coli* killing by neutrophil elastase. *Science* 2000; 289(5482):1185-8
- Belaouaj A. Neutrophil elastase-mediated killing of bacteria: lessons from targeted mutagenesis. *Microbes Infect* 2002; 4(12):1259-64
- Bergen van BH, Andriessen MP, Spruijt KI et al. Expression of SKALP/elafin during wound healing in human skin. *Arch Dermatol Res* 1996; 288 (8):458-62
- Biedermann A, Köhnlein T, Alpha-1-Antitrypsin-Mangel- eine versteckte Ursache der COPD. *Deutsches Ärzteblatt* 30.Juni 2006; Jg 103, Heft 26
- Bode W, Huber R. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur J Biochem* 1992; 204(2):433-51
- Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 1997; 89 (10): 3503-21
- Brantly M, Nukiwa T, Crystal RG. Molecular basis of alpha-1-antitrypsin deficiency. *Am J Med* 1988; 84(6A): 13-31
- Carey Gregory, Multivariate Analysis of Variance (MANOVA): I.Theory, 1998; ibgwww.colorado.edu/carey/.../manova1.pdf.
- Clauss A, Ng V, Liu J et al. Overexpression of elafin in ovarian carcinoma is driven by genomic gains and activation of the nuclear factor kappaB pathway and is associated with poor overall survival. *Neoplasia* 2010; 12(2):161-72
- Cohen JR, Mandell C, Wise L. Characterisation of human aortic elastase found in patients with abdominal aortic aneurysms. *Surg Gynecol Obstet* 1987; 165(4):301-4
- Cowan B, Baron O, Crack J et al. Elafin, a serine elastase inhibitor, attenuates post-cardiac transplant coronary arteriopathy and reduces myocardial necrosis in rabbits after heterotopic cardiac transplantation. *Clin Invest* 1996; Volume 97, Number 11, 2452-2468
- Dinerman JL, Mehta JL, Saldeen TG et al. Increased neutrophil elastase release in unstable angina pectoris and acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1990; 15(7):1559-63
- Döring G. The role of neutrophil elastase in chronic inflammation. *Amer J Respir Crit Care Med* 1994; 150:S114-S117

- Doumas S, Kolokotronis A, Stefanopoulos P. Anti-Inflammatory and Antimicrobial Roles of Secretory Leukocyte Protease Inhibitor. *Infect Immun* 2005; vol. 73 no. 3 1271-1274
- Drannik AG, Nag K, Yao XD et al. Anti-HIV-1 activity of elafin is more potent than its precursor's, trappin-2 in genital epithelial cells. *J Virol* 2012; 86(8):4599-610 doi:10.1128/JVI.06561-11
- Drummond AH, Beckett P, Brown PD et al. Preclinical and clinical studies of MMP inhibitors in cancer. *Ann NY Acad Sci* 1999; 878: 228-35
- Ferry G, Lonchampt M, Pennel L et al. Activatoin of MMP-9 by neutrophil elastase in an in vivo model of acute lung injury. *FEBS Lett* 1997; 402:111-115[PubMed]
- Flach CF, Eriksson A, Jennische E et al. Detection of elafin as a candidate biomarker for ulcerative colitis by whole-genome microarray screening. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12(9):837-42
- Flynn DL, Becker DP, Dilworth VM et al. The herpesvirus protease: mechanistic studies and discovery of inhibitors of the human cytomegalovirus protease. *Drug Des Discov* 1997; 15(1):3-15
- Fowkes FRG, Housley E, Rattray A et al. Cross-linked fibrin degradation products, progression of peripheral arterial disease, and risk of coronary heart disease. *Dawes J. Lancet* 1993; 342(8863):84-6
- Fragogeorgi EA, Zikos C, Gourni, E et al. Spacer site modifications for the improvement of the in vitro and in vivo binding properties of (99m)Tc-N(3)S-Xbombesin[2-14] derivatives. *Bioconjug Chem* 2009; 20, 856-867
- Fregonese L, Stolk J. Hereditary alpha-1-antitrypsin defeciency and its clinical consequences. *Orphanet J Rare Dis* 2008; 3:16. doi 10.1186/1750-1172-3-16
- Gaut, JP, Yeh GC, Tran HD et al. Neutrophils employ the myeloperoxidase system to generate antimicrobial brominating and chlorinating oxidants during sepsis. *Proc Nat Acad Sci USA* 2001; 98: 11961-11966
- Geraghty P, Rogan MP, Green CM et al. Neutrophil elastase up-regulates cathepsin B and matrix metalloprotease-2 expression. *Journal of Immunology* 2007; 178(9): 5871-8
- Ghosh M, Shen Z, Fahey JV et al. Trappin-2/Elafin: a novel innate anti-human immunodeficiency virus-1 molecule of the human female tract. *Immumology*. 2010; 129(2):207-19
- Greene Catherine M and McElvaney Noel G. Proteases and antproteases in chronic neutrophilic lung disease-relevance to drug discovery. *Br J Pharmacol* 2009; 158(4):1048-1058
- Gu D, Ma Y, Niu G et al. LC/MS evaluation of metabolism and membrane transport of bombesin peptides. *Amino Acids* 2011; 40, 669-675
- Grothey A, Van Cutsem E, Sobrero A et al. Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet* 2013; Volume 381, Issue 9863, Pages 303-312
- Guyot N, Zani ML, Berger P et al. Proteolytic susceptibility of the serine protease inhibitor trappin-2 (pre-elafin): evidence for trypsin-mediated generation of elafin. *Biol Chem* 2005; 386(4):391-9
- Guyot N, Buttler MW, McNally P et al. Elafin, an elastase-specific inhibitor, is cleaved by its cognate enzyme neutrophil elastase in sputum from individuals with cystic fibrosis. *J Biol Chem* 2008; 283(47):32377-85
- Guyot N, Bergsson G, Butler MW et al. Functional study of elafin cleaved by Pseudomonas aeruginosa metalloproteinases. *Biol Chem* 2010; 391(6):705-16 doi: 10.1515/BC.2010.066
- Henriksen PA, Sallenave JM. Human neutrophil elastase: mediator and therapeutic target in atherosclerosis. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40(6-7):1095-100 doi:10.101/j.biocel.2008.01.004
- Hiemstra PS, Maasen RJ, Stolk J et al. Antibacterial activity of antileukoprotease. *Infect Immun* 1996; 64: 4520-4524
- Ho S, Pothoulakis C, Koon HW. Antimicrobial peptides and colitis. *Curr Pharm Des* 2013; 19(1):40-7

- Hunt Kelly K, Wingate Hannah, Yokota Tomoya et al. Elafin, an inhibitor elastase, is a prognostic indicator in breast cancer. *Breast Cancer Research* 2013; 15: R3 doi: 10.11867bcr 3374
- Igbal SM, Ball TB, Levinson P et al. Elevated elafin/ trappin-2 in the female genital tract is associated with protection against HIV acquisition. *AIDS* 2009; 23(13):1669-77. doi. 1097/QAD.013e32832ea643
- Imai K, Yokohama Y, Nakanishi I et al. Matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) from human rectal carcinoma cells. Activation of the precursor, interaction with other matrix metalloproteinases and enzymic properties. *J Biol Chem* 1995; 270:6691-6697. [PubMed.]
- Jasinghe Viraj J, Peyrotte Erika Arnau, Meyers Adrienne FA et al. Human rElafin Inhibits HIV-1 Replication in Its Natural Target Cells. *BioRes Open Access* 2013; 2(2): 128-137
- Johnson LL, Dyer R, Hupe DJ. Matrix metalloproteinases. *Curr Opin Chem Biol* 1998;2(4):466-71
- Kähäri VM, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour growth and invasion. *Ann Med* 1999; 31(1):34-45
- Komarek P, Kleisner I, Komarkova I et al. Accumulation of Radiolabeled Low Molecular Peptides and Proteins in Experimental Inflammation. *Int J Pharm* 2005; 291, 119-125
- Kramps JA, Rudolphus A, Stolk J et al. Role of Antileukoprotease in the Human Lung. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1991; 624:97-108. doi:10.1111/j. 1749-6632. Tb17010.x
- Kuijpers AL, Schalkwijk J, Rulo HF et al. Extremely low levels of epidermal skin-derived antileucoprotease/elafin in a patient with impetigo herpetiformis. *Br J dermatol* 1997; 137(1):123-9
- Lee JK, Zaidi SHE, Liu P et al. A serine elastase inhibitor reduces inflammation and fibrosis and preserves cardiac function after experimentally-induced murine myocarditis. *Nature Medicine* 1998; 4, 1383-1391 doi:10.1038/3973
- Lehrer RI, Ganz T. Antimicrobial polypeptides of human neutrophils. *Blood* 1990;76(11):2169-2181
- Levitzki A, Mishani E. Tyrosinase and other tyrosine kinase inhibitor. *Annu Rev Biochem* 2006; 75:93-109
- Linder KE, Metcalfe E, Arunachalam T et al. In vitro and in vivo metabolism of Lu-AMBA, a GRP-receptor binding compound, and the synthesis and characterization of its metabolites. *Bioconjug Chem* 2009; 20, 1171-1178
- Lominadze G, Powell DW, Luerman GC et al. Proteomics analysis of human neutrophil granules. *Mol Cell Proteomics* 2005; 4(10):1503-21. Epub 2005 Jun 28
- Maack T. Renal handling of low molecular weight proteins. *Am J Med* 1975; 58, 57-64
- Malerba M, Ricciardolo F, Radaeli A et al. Neutrophilic inflammation and IL-8 Levels in induced sputum of alpha-1-antitrypsin PiMZ subjects. *Thorax* 2006; 61:129-133. doi 10.1136/thx.2005.043471
- Maruyama K, Ye CL, Woo M et al. Chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats and increased elastolytic activity. *Am J Physiol* 1991; 261(6 Pt 2):H1716-26
- Marzolo MP, Farfán P. New Insights into the Roles of Megalin/LRP2 and the Regulation of its Functional Expression. *Biol Res* 2011; 44, 89-105
- McNeely TB, Dealy M, Dripps DJ et al. Secretory leucocyte protease inhibitor: a human saliva protein exhibiting anti-human immunodeficiency virus 1 activity in vitro. *J Clin Invest* 1995; 96:456-464
- Meier-Ruge W, Fridrich R. Die Verteilung von Technetium-99m und Jod-131 in der Magenschleimhaut. *Histochemie* 1969; Volume 19, Issue 2, pp 147-154
- Miyoshi S, Hamada H, Ito R et al. Usefulness of a selective neutrophil elastase inhibitor, sivelestat, in acute lung injury patients with sepsis. *Drug Des Devel Ther* 2013; 7:305-16. doi: 10.2147/DDDT.S42004. Print 2013

- Moreau T, Baranger K, Dadé S et al. Multifaceted roles of human elafin and secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI), two serine protease inhibitors of the chelonianin family. *Biochimie* 2008 Feb; 90(2):284-95
- Motta JP, Magne L, Descamps D et al. Modifying the protease, antiprotease pattern by elafin overexpression protects mice from colitis. *Gastroenterology* 2011; 140(4):1272-82. doi:10.1053/j.gastro.2010.12.050
- Muto J, Kuroda K, Wachi H et al. Accumulation of elafin in actinic elastosis of sun-damaged skin: elafin binds to elastin and prevents elastolytic degradation. *J Invest Dermatol* 2007; 127(6):1358-66
- Pfundt R, van Ruissen F, van Vlijmen-Willems IM et al. Constitutive and inducible expression of SKALP/elafin provides anti-elastase defense in human epithelia. *J Clin Invest* 1996; Volume 98, Number 6, 1389-1399
- Puente XS, Sanchez LM, Overall CM et al. Human and mouse proteinases: a comparative genomic approach. *Nature Rev Genet.* 2003; 4(7):544-58
- Pschyrembel. Klinisches Wörterbuch. 2002; 259. Auflage, Berlin: de Gruyter, 2002, ISBN 3-11-016522-8
- Reid PT, Marsden M, Cunningham GA et al. Human neutrophil elastase regulates the expression and secretion of elafin (elastase-specific inhibitor) in type II alveolar epithelial cells. *FEBS Lett* 1999; 457(1):33-7
- Rutenberger E, Fauman EB, Keenan RJ et al. Structure of a non-peptide inhibitor complexed with HIV-1 protease. Developing a cycle of structure-based drug design. *J Biol Chem* 1993; 268(21):15242-6
- Sallenave JM. Secretory leukocyte protease inhibitor and elafin/trappin-2: versatile mucosal antimicrobials and regulators of immunity. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2010; Vol. 42 No 6, 635-643
- Sallenave JM, Ryle AP. Purification and characterization of elastase-specific inhibitor: sequence homology with mucus proteinase inhibitor. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1991; 372: 13-21
- Sallenave JM, Shulmann J, Crossley J et al. Regulation of secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI) and elastase-specific inhibitor (ESI/Elafin) in human airway epithelial cells by cytokines and neutrophilic enzymes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994; 11(6): 733-41
- Schalkwijk J, Chang A, Janssen P et al. Skinderived antileukoproteinases (SKALPs): Charakterization of two new elastase inhibitors from psoriatic epidermis. *Br J Dermatol* 1990; 122:631-641
- Schalkwijk Joost, Wiedow Oliver and Hirose Shigehisa. The trappin gene family: proteins defined by an N-terminal transglutaminase substrate domain and a C-terminal four-disulphide core. *Biochem J* 1999; 340 (569-577)
- Shamamiam P, Schwartz JD, Pockock BJ et al. Activation of progelatinase A (MMP-2) by neutrophil elastase, cathepsin G, and proteinase-3: a role for inflammatory cells in tumor invasion and angiogenesis. *J Cell Physiol* 2001; 189:197-206. [PubMed]
- Shaw L, Wiedow O. Therapeutic potential of human elafin. *Biochem Soc Trans* 2011; 39(5):1450-4. doi:10.1042/BST0391450
- Simpson AJ, Maxwell AL, Govan JR et al. Elafin (elastase-specific inhibitor) has anti-microbial activity against gram-positive and gram-negative respiratory pathogens. *FEBS Lett* 1999; 452(3):309-13
- Simpson AJ, Wallace WA, Marsden ME et al. Adenoviral augmentation of elafin protects the lung against acute injury mediated by activated neutrophils and bacterial infection. *J Immunol.* 2001; 167(3); 1778-86
- Stoller JK, Aboussouan LS. Alpha1-antitrypsin deficiency. *Lancet* 2005; 365(9478):2225-36
- Taggart CC, Lowe GJ, Greene CM et al. Cathepsin B and S cleave and inactivate secretory leucoprotease inhibitor. *J Biol Chem* 2001; 276:33345-33352
- Teckman JH. Liver disease in alpha-1-antitrypsin deficiency: current understanding and future therapy. *COPD.* 2013; 10 Suppl 1:35-43. doi: 10.3109/15412555.2013.765839

- Tiefenbacher CP, Ebert M, Niroomand F et al. Inhibition of elastase improves myocardial function after repetitive ischaemia and myocardial infarction in the rat heart. *Pflug Arch Eur J Physiol* 1997; 433, 563-570
- Tkalcevic J, Novelli M, Phylactides M et al. Impaired immunity and enhanced resistance to endotoxin in the absence of neutrophil elastase and cathepsin G. *Immunity* 2000; 12(2):201-10
- Todorovich-Hunter L, Johnson DJ, Ranger P et al. Altered elastin and collagen synthesis associated with progressive pulmonary hypertension induced by monocrotaline. A biochemical and ultrastructural study. *Lab Invest* 1988; 58(2):184-95
- Tojo A, Kinugasa S. Mechanisms of Glomerular Albumin Filtration and Tubular Reabsorption. *Int J Nephrol* 2012; Article ID 481520
- Tremblay GM, Sallenave JM, Israël-Assayag E et al. Elafin/elastase-specific inhibitor in bronchoalveolar lavage of normal subjects and farmer's lung. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154(4 Pt 1):1092-8
- Tsantrizos YS. The design of a potent inhibitor of the hepatitis C virus NS3 protease: BILN 2061—from the NMR tube to the clinic. *Biopolymers* 2004; 76(4): 309-23
- Verrier T, Solhonne B, Sallenave JM et al. The WAPprotein Trappin-2/Elafin: a handyman in the regulation of inflammatory and immune responses. *Int J Biochem Cell Biol* 2012; 44(8):1377-80. doi:10.1016/j.biocel.2012.05.007
- Waxman L, Darke PL. The herpesvirus proteases as targets for antiviral chemotherapy. *Antivir Chem Chemother* 2000; 11(1):1-22
- Weinrauch Y, Drujan D, Shapiro SD et al. Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria. *Nature* 2001; 417(6884):91-1
- Wetering van S, Linden van der AC, Sterkenburg van MA et al. Regulation of secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI) production by human bronchial epithelial cells: increase of cell-associated SLPI by neutrophil elastase. *J Invest Med* 2000; 48(5):359-66
- Wetering van S, Linden van der AC, Sterkenburg van MA et al. Regulation of SLPI and elafin release from bronchial epithelial cells by neutrophil defensins. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 278(1):L51-8
- Wiedow O, Schröder J-M, Gregory H et al. Elafin: an elastase-specific inhibitor of human skin. Purification, characterization, and complete amino acid sequence. *J Biol Chem* 1990; Vol.265, No. 25 Issue of September 5. pp. 14791-14795
- Wiedow O, Harder J, Bartels J et al. Antileukoprotease in human skin: an antibiotic peptide constitutively produced by keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 248(3):904-9
- Williams SE, Brown TI, Roghanian A et al. One glove, many fingers. *Clin Sci* 2006; 110:21-35
- Wlodawer Alexander and Vondrasek Jiri. Inhibitors of HIV-protease: A major success of structure-assisted drug design. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 1998; Vol. 27:249-28.4
- Wong LC, Langille BL. Developmental remodeling of the internal elastic lamina of rabbit arteries: effect of blood flow. *Circ res* 1996; 78(5):799-805
- Ye CL, Rabinovitch M. Inhibition of elastolysis by SC-37698 reduces development and progression of monocrotaline pulmonary hypertension. *Am J Physiol* 1991; 261(4 Pt 2):H1255-67
- Ying QL, Simon SR. Kinetics of the inhibition of human leukocyte elastase by elafin, a 6-kilodalton elastase-specific inhibitor from human skin. *Biochemistry* 1993; 32(7), pp 1866-1874. doi:10.1021/bi00058a021
- Yoshida N, Egami H, Yamashita J et al. Immunohistochemical expression of SKALP/elafin in squamous cell carcinoma of human lung. *Oncol Rep* 2002; 9(3):495-501
- Zaidi Syed HE, Hui Chi-Chung, Cheah Alexander YL et al. Targeted overexpression of elafin protects mice against cardiac dysfunction and mortality following viral myocarditis. *J Clin Invest* 1999; 103:1211-1219

Zani ML, Nobar SM, Lacour SA et al. Kinetics of the inhibition of neutrophil proteinases by recombinant elafin and pre-elafin (trappin-2) expressed in *Pichia pastoris*. *Eur J Biochem* 2004; 271(12):2370-8

Zani ML, Tanga A, Saidi A et al. SLPI and trappin-2 as therapeutic agents to target airway serine proteases in inflammatory lung diseases: current and future directions. *Biochem Soc Trans* 2011; 39(5):1441-6. doi:10.1042/BST0391441

Zhang Y, DeWitt DL, McNeely TB et al. Secretory leukocyte protease inhibitor suppresses the production of monocyte prostaglandin H synthase-2, prostaglandin E₂, and matrix metalloproteinases. *The Journal of Clinical Investigation* 1997; Volume 99, Number 5, 894-900

Zhang Q, Shimoya K, Moriyama A et al. Production of secretory leukocyte protease inhibitor by human amniotic membranes and regulation of its concentration in amniotic fluid. *Molecular Human Reproduction* 2001; Vol. 7, No.6 pp. 573-579

Zhang Y, Huo M, Zhou J et al. PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Comput. Methods Programs Biomed* 2010; 99, 306-314

Zhu L, Wigle D, Hinek A et al. The endogenous vascular elastase that governs development and progression of monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats is a novel enzyme related to the serine proteinase adipsin. *J Clin Invest* 1994; Volume 94, 1163-1171

8. ABKÜRZUNGEN

ACE	:	Angiotensin Converting Enzyme
AIC	:	Akaike Information Criteria
ALP	:	Antileukoproteinase
ARDS	:	Acute Respiratory Distress Syndrome
AUC	:	Area under the Curve
AUMC	:	Area under the Moment Curve
BGBI	:	Bundesgesetzblatt
CAN	:	Chronic allograft nephropathy
CL	:	Clearance
cm	:	Zentimeter
COPD	:	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
¹³⁷ Cs	:	Caesium-137
DMF	:	Dimethylformamide
ELF	:	Epithel Lung Fluid
ESI	:	Electrospray Ionization
ESI-MS	:	Electrospray Ionisation Mass Spectrometry
EVE	:	Endogene vaskuläre Elastase
FOV	:	Field Of View
g	:	Gramm
G	:	Gravitationskonstante
GBq	:	Gigabecquerel (=10 ⁹ Bq)
GQDPVK	:	Gly-Gln-Asp-Pro-Val-Lys (Aminosäuresequenz)
h	:	Stunde(n)
HCl	:	Salzsäure
HIV	:	Human Immunodeficiency Virus
H ₂ O	:	Wasser
HPLC	:	High-Performance Liquid Chromatography
HS-HCl	:	N-Hydroxysuccinimid- Salzsäuer
HSV	:	Herpes simplex Virus
HYNIC	:	Hydrazinonicotinamid
ID	:	Injizierte Dosis
I.E.	:	Internationale Einheit
IL-β	:	Interleukin-β
ITLC-SG	:	Instant Thin Layer Chromatography Silica Gel
i.v.	:	Intravenös
kb	:	Kilobasen (Länge der DNA-Basenpaare)
KDa	:	Kilodalton
Kg	:	Kilogramm
KG	:	Körpergewicht
LC-MS	:	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
LEHR	:	Low energy high resolution
LPS	:	Lipopolysaccharid
mg	:	Milligramm
min	:	Minute(n)
ml	:	Milliliter
mm	:	Millimeter
MMP	:	Matrix-Metallo-Protease
⁹⁹ Mo	:	Molybden-99
MRT	:	Mean Residence Time
	:	Magnetic Resonance Tomography
mRNA	:	Messenger Ribonucleic Acid
MS	:	Massenspektroskopie
msec	:	Millisekunde
MW	:	Molekulargewicht
μl	:	Mikroliter
μmol	:	Mikromol
Na	:	Natrium
NaCl	:	Kochsalz (Natriumchlorid)
Nm	:	Nanometer

NE	:	Neutrophil-Elastase
NSP	:	Neutrophil Serin Protease
OSEM	:	Ordered subset expectation maximization
Pb	:	Blei
PBEC	:	Primary Bronchial Epithelial Cell
PBS	:	Phosphate buffered saline
p.i.	:	Post injectionem
PK	:	Pharmakokinetisches Kompartimentmodell
pI	:	Isoelectric point (isoelektrischer Punkt)
P3-P3'	:	Bindungsstelle eines Segmentes eines Proteinnase-Inhibitors
RF-Coil	:	Radiofrequency-Coil
ROI	:	Region of Interest
RP-HPLC	:	Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography
Rt	:	Retentionszeit
s	:	Sekunde(n)
SB	:	Antimon
SIRS	:	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SKALP	:	Skin-derived-Antileukoproteinase
SLPI	:	Secretory-Leukocyte-Proteinase-Inhibitor
SnCl ₂	:	Zinn-Chlorid
SPECT	:	Single Photon Emission Computed Tomography
t _{1/2}	:	Halbwertszeit
^{99m} Tc	:	Technetium-99m
^{99m} TcO ₄	:	Pertechnetat
Tc(V)O	:	Oxidationsstufe des Technetiums
TFA	:	Trifluoroacetic acid
TNF- α	:	Tumour Necrosis Factor- α
UKSH	:	Universitätsklinik Schleswig-Holstein
VOI	:	Volume of Interest
WAP	:	Whey Acidic Protein
2D	:	Zweidimensional
3D	:	Dreidimensional

9. DANKSAGUNG

Herrn PD Dr. rer. nat. habil M. Zuhayra, Leiter der Radiochemie der Klinik für Nuklearmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, danke ich sehr für die Überlassung des Dissertationsthemas und für seine jedwede Hilfe und Geduld, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre. Auch danke ich Dr. med. U. Lützen, komm. Direktor der Klinik für Nuklearmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, für die Möglichkeit zur Promotion in seiner Klinik sowie für seine persönliche und intensive Betreuung und Unterstützung. Herrn Dr. M. Kaschwich danke ich für die Überlassung der Rohdaten.

Darüber hinaus gilt ein großer Dank allen engagierten Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern, die an den Planungen dieser Studie und den umfangreichen Versuchen zu dieser Arbeit beteiligt waren.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mich während des Studiums jeder Zeit unterstützt haben, gilt mein besonderer Dank.

10. LEBENSLAUF

Name: Angelina Larissa Tjong
Geburtsdatum: 09. November 1985
Geburtsort: Köln
Nationalität: Deutsch
Familienstand: Ledig
Eltern: Dr. Hong-Boen Tjong, Internist
Brigitte Tjong, Studienrätin

Schule: 1991-1995 katholische Grundschule Thurnerstraße, Köln
1995-2004 Gymnasium Blücherstraße, Köln
2004 Abitur

Universität: 2005-2008 Medizinstudium an der Universität Leipzig
2009-2013 Medizinstudium an der Universität Kiel

Dissertation: 2012-2014 Biodistribution und Pharmakokinetik von ^{99m}Tc -markiertem
Elafin im Rattenmodell.
Klinik für Nuklearmedizin der Universität Kiel
Komm. Direktor: Dr. U. Lützen

Weiterbildung: Seit dem 1. August 2014 wissenschaftliche Assistentin in der
Neuroradiologie des Universitätsklinikums Heidelberg.

11. ANHANG

TIERVERSUCHSGENEHMIGUNG

Die Tierversuchsgenehmigung wurde erteilt vom Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein am 25.01.2011 unter dem Aktenzeichen: V312-72241.121-9 [13-1/11].

Der Titel des Versuchsvorhabens lautet: *„Organdistribution des humanen Protease-Inhibitors Elafin in Tierversuch mittels Radionuklidmarkierung und anschließenden PET-Scan/SPECT“*.