DISS. ETH NO. 17680

# Development of new silicon-based building blocks for a direct $^{18}$F-labeling of biomolecules for PET imaging

A dissertation submitted to

**ETH Zurich**

for the degree of

*Doctor of Sciences*

presented by

**Aileen Höhne**

Dipl.-Chem., Technical University of Dresden, Germany

born December 26th, 1978

citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. P. August Schubiger, examiner

Prof. Dr. Simon M. Ametamey, co-examiner

Dr. Linjing Mu, co-examiner

**2008**

## SUMMARY

Positron-Emission-Tomography (PET) is a non-invasive nuclear medicine technique for studying biochemical and physiological processes *in vivo*. It is based on the application of bioactive molecules labeled with positron emitters such as fluorine-18. $^{18}$F-labeled biomolecules like peptides have a great potential as molecular imaging probes. The $^{18}$F-labeling of biomolecules is mostly achieved *via* laborious multi-step reaction sequences by means of a prosthetic group. As $^{18}$F has a relatively short half-life (109.7 min) more efficient methods would be attractive. However, most of the existing $^{18}$F-fluorination methods are too harsh and / or not chemoselective enough to label biomolecules directly. As a consequence of the strength of the Si-F bond, silicon has a high affinity for fluorine. Therefore it should be possible to introduce $^{18}$F in silicon-containing biomolecules under mild conditions in a single high-yielding step. The aim of this work was the development of new silicon-based building blocks for a direct $^{18}$F-labeling of biomolecules, in particular peptides, for PET imaging. Chapter 1 of the thesis provides the background of the project.

Chapter 2 describes the synthesis and the $^{18}$F-labeling of a series of bifunctional silicon building blocks containing different linkers, leaving groups and substituents. In most cases, the addition of acetic acid to the reaction mixture enhanced the $^{18}$F-incorporation significantly. After optimization of the radiolabeling conditions, up to quantitative conversions were achieved. For example, the model compound *N*-benzyl-2-(4-(di-*tert*-butyl[$^{18}$F]fluorosilyl)phenyl)acetamide was obtained in 65% radiochemical yield (RCY) and with a specific activity of 65 GBq/µmol at the end of the synthesis (EOS). The hydrolytic stability of the organofluorosilanes was found to depend mainly on the steric hindrance around the silicon center. The application of the most stable di-*tert*-butylsilyl building block for the radiosynthesis of a tetrapeptide (RCY = 15%) and the hydrolytic stability of the obtained product within the time period required for a PET study was shown.

Chapter 3 deals with the development of a theoretical model for the hydrolytic stability of organofluorosilanes. The calculated differences of the Si–F bond lengths between the starting material **A** and the common intermediate structure **C** were found to correlate linearly with the experimental data on the hydrolytic half-lives of a series of synthesized organofluorosilanes. The model allows the estimation of the hydrolytic stability of newly designed compounds and the

facilitated development of improved building blocks for a direct access to novel $^{18}$F-silyl modified biomolecules for PET imaging.

In chapter 4, the applicability of the silicon-based one-step no-carrier-added radiolabeling method for the synthesis of $^{18}$F-labeled bombesin derivatives is demonstrated. Radiochemical yields of 13-30% were achieved. Using the di-*tert*-butylsilyl building block as labeling moiety, products containing a hydrolytically stable $^{18}$F-label were obtained. Biodistribution experiments of a $^{18}$F-labeled di-*tert*-butylsilyl substituted bombesin peptide (specific activity 62 GBq/µmol at EOS) in nude mice bearing a human prostate tumor (PC-3) revealed, besides substantial hepatobiliary clearance, low and unspecific uptake in gastrin-relasing peptide receptor (GRPr) - positive tumors.

In chapter 5, we used the silicon-based radiolabeling method for the synthesis of $^{18}$F-labeled CXCR4 inhibitors. Due to its better *in vitro* properties in comparison with **[$^{18}$F]POL7092** ($IC_{50}$ = 250 nM in a $Ca^{2+}$ flux assay), **[$^{18}$F]POL7102** ($IC_{50}$ = 15 nM) was chosen for *in vivo* evaluation. After optimization of the radiolabeling conditions, **[$^{18}$F]POL7102** was obtained in 13.0±1.7% RCY and with a specific activity of 104±47 GBq/µmol (n = 3, EOS). In *in vivo* experiments with **[$^{18}$F]POL7102** using a PTEN knock-out mouse model, low uptake in CXCR4-expressing prostate tumors and high accumulation in the abdominal region was observed.

Finally, we come to the conclusion that our direct labeling method is transferable to targeting peptides and other biomolecules in general and will allow straightforward access to novel PET imaging probes. However, a reduction of the overall lipophilicity of the radiolabeled peptides would help to avoid their high hepatobiliary accumulation and provide the final confirmation of the suitability of $^{18}$F-labeled silicon-based peptides for PET imaging. Future work will be directed towards the development of such peptides with improved pharmacokinetic and tumor targeting properties.

## ZUSAMMENFASSUNG

Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) ist ein nicht-invasives nuklearmedizinisches Verfahren zur Untersuchung biochemischer und physiologischer Prozesse *in vivo*. Es basiert auf der Anwendung bioaktiver Moleküle, welche mit Positronenemittern, wie zum Beispiel Fluor-18, markiert sind. $^{18}$F-markierte Biomoleküle, beispielsweise Peptide, haben ein grosses Potential als Sonden für die molekulare Bildgebung. Die $^{18}$F-Markierung von Biomolekülen wird meist über eine aufwendige mehrstufige Reaktionsfolge mit Hilfe einer prosthetischen Gruppe erreicht. Da $^{18}$F eine relativ kurze Halbwertszeit hat (109.7 min), wären effizientere Methoden wünschenswert. Allerdings sind die meisten der existierenden $^{18}$F-Fluorierungsmethoden zu harsch und / oder zu wenig chemoselektiv, um Biomoleküle direkt zu markieren. Infolge der Stärke der Si-F-Bindung hat Silizium hat eine hohe Affinität zu Fluor. Daher sollte es möglich sein, $^{18}$F in Silizium-haltige Biomoleküle unter milden Bedingung in einem einzigen Schritt mit hoher Ausbeute einzuführen. Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung neuer Silizium-basierter Bausteine für eine direkte $^{18}$F-Markierung von Biomolekülen, insbesondere von Peptiden, für die PET-Bildgebung. Kapitel 1 dieser Dissertation vermittelt den Hintergrund des Projektes.

Kapitel 2 beschreibt die Synthese und die $^{18}$F-Markierung einer Reihe bifunktioneller Silizium-Bausteine mit verschiedenen Linkern, Abgangsgruppen und Substituenten. In den meisten Fällen verbesserte der Zusatz von Essigsäure zum Reaktionsgemisch die $^{18}$F-Inkorporation signifikant. Nach Optimierung der Reaktionsbedingungen wurden bis zu quantitative Umsetzungen erreicht. Zum Beispiel wurde die Modellverbindung *N*-Benzyl-2-(4-(di-*tert*-butyl[$^{18}$F]fluorsilyl)phenyl)acetamid in 65% radiochemischer Ausbeute (RCY) und mit einer spezifischen Aktivität von 64 GBq/µmol am Ende der Synthese (EOS) erhalten. Es wurde herausgefunden, dass die hydrolytische Stabilität der Organofluorsilane hauptsächlich von der sterischen Hinderung um das Silizium-Zentrum abhängt. Die Verwendung des stabilsten Di-*tert*-butylsilyl-Bausteins für die Radiosynthese eines Tetrapeptids (RCY = 15%) und die hydrolytische Stabilität des erhaltenen Produkts innerhalb des Zeitraums, welcher für eine PET-Studie benötigt wird, wurde gezeigt.

Kapitel 3 beschäftigt sich mit der Entwicklung eines theoretischen Modells für die hydrolytische Stabilität von Organofluorsilanen. Es wurde gefunden, dass die berechneten

Unterschiede der Si-F-Bindungslängen zwischen dem Ausgangsstoff **A** und der gemeinsamen Zwischenstufe **C** mit den experimentellen Daten der hydrolytischen Halbwertszeiten einer Reihe synthetisierter Organofluorsilane linear korrelieren. Das Modell erlaubt die Abschätzung der hydrolytischen Stabilität neu entworfener Verbindungen und die vereinfachte Entwicklung verbesserter Bausteine für einen direkten Zugang zu neuartigen $^{18}$F-silyl-modifizierten Biomolekülen für die PET-Bildgebung.

In Kapitel 4 wird die Anwendbarkeit der Silizium-basierten einstufigen Radiomarkierungsmethode ohne Trägerzusatz auf die Synthese $^{18}$F-markierter Bombesin-Derivate demonstriert. Radiochemische Ausbeuten von 13-30% wurden erreicht. Bei Verwendung des Di-*tert*-butylsilyl-Bausteins als Markierungsgruppe wurden Produkte mit einer hydrolytisch stabilen $^{18}$F-Markierung erhalten. Bioverteilungsexperimente mit einem $^{18}$F-markierten di-*tert*-butylsilyl-substituierten Bombesin-Peptid (spezifische Aktivität 62 GBq/µmol bei EOS) in Nacktmäusen mit einem humanen Prostatatumor (PC-3) zeigten neben substanzieller hepatobiliärer Ausscheidung eine niedrige und unspezifische Aufnahme in GRPr (Gastrin-freisetzender Peptidrezeptor) -positive Tumore.

Im Kapitel 5 haben wir die Silizium-basierte Radiomarkierungsmethode zur Synthese von $^{18}$F-markierten CXCR4-Inhibitoren genutzt. Aufgrund seiner besseren *in vitro*-Eigenschaften im Vergleich mit **[$^{18}$F]POL7092** ($IC_{50}$ = 250 nM in einem $Ca^{2+}$-Flux-Assay) wurde **[$^{18}$F]POL7102** ($IC_{50}$ = 15 nM) für die *in vivo*-Evaluation ausgewählt. Nach Optimierung der Reaktionsbedingungen wurde **[$^{18}$F]POL7102** in 13.0±1.7% RCY und mit einer spezifischen Aktivität von 104±47 GBq/µmol (n = 3, EOS) erhalten. Bei *in vivo*-Experimenten mit **[$^{18}$F]POL7102** unter Verwendung eines PTEN-knock-out-Mausmodells wurde eine geringe Aufnahme in CXCR4-exprimierende Prostatatumore und eine hohe Anreicherung in der abdominalen Region beobachtet.

Schliesslich kommen wir zu dem Fazit, dass unsere direkte Markierungsmethode auf spezifische Peptide und andere Biomoleküle allgemein übertragbar ist und einen vereinfachten Zugang zu neuartigen PET-Bildgebungssonden erlauben wird. Allerdings würde eine Reduzierung der Gesamtlipophilie der radiomarkierten Peptide helfen, ihre hohe hepatobiliäre Anreicherung zu vermeiden und eine endgültige Bestätigung der Eignung von $^{18}$F-markierten Silizium-basierten Peptiden für die PET-Bildgebung zu liefern. Zukünftige Arbeiten werden auf

die Entwicklung solcher Peptide mit verbesserten pharmakokinetischen und tumorspezifischen Eigenschaften ausgerichtet sein.