

DISS. ETH NO. 21192

**Folate and Elastin Based Radiopharmaceuticals for Cancer
and Cardiovascular Imaging**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

For the degree of

Doctor of Sciences

Presented by

Cindy Ramona Fischer

Dipl.-Chem., TU Dresden

Born May 19th 1983

Citizen of the Federal Republic of Germany

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Simon M. Ametamey, examiner

Prof. Dr. Roger Schibli, co-examiner

2013

SUMMARY

Investigations of the World Health Organization (WHO) showed that cardiovascular diseases and cancer are the main causes of death and illness in the Western world. Atherosclerosis, characterized by the formation of atherosclerotic plaques in the arteries, plays a key role in the pathogenesis of cardiovascular diseases. Single photon emission computed tomography (SPECT) and positron emission tomography (PET) are techniques which allow the non-invasive visualization of accumulated radioactivity within the body. Therefore, identification of targets associated with diseased cells and the development of radiopharmaceuticals that bind specifically to these targets are potent strategies for disease detection and management. In this respect, a promising target is the folate receptor (FR), which is upregulated in various cancer types and on the surface of activated macrophages involved in inflammatory diseases. With regard to specific radiopharmaceuticals for the imaging of the FR, a number of ^{18}F -based folate radioconjugates have been previously reported. However, these radiopharmaceuticals possess several shortcomings such as low radiochemical yield or high abdominal accumulation which precluded their use as imaging agents in the clinic. Elastin, an extracellular matrix protein, is another promising target for the imaging of atherosclerotic plaque lesions. It is present in the arterial vessel walls and its expression is increased during plaque development. Recently, an elastin-specific magnetic resonance contrast agent was successfully evaluated for the non-invasive quantification of plaque burden in atherosclerotic mouse models but no elastin-specific PET imaging agents have been reported so far. The aims of the present work were: (i) the development of an ^{18}F -labeled folic acid derivative with improved *in vivo* properties for the imaging of cancer and inflammation; (ii) investigation of the influence of conjugation at the α - and γ -carboxylic functionalities on the pharmacological behavior of folate radioconjugates and (iii) the evaluation of an elastin-specific PET ligand for atherosclerotic plaque visualization.

In an attempt to improve the radiochemical yield and overall *in vivo* distribution of ^{18}F -based folic acid derivatives, a novel glycosylated ^{18}F -labeled folic acid, [^{18}F]fluoro-deoxy-glucose folate, was prepared using the high yielding Cu(I)-catalyzed 1,2-dipolar [3+2] cycloaddition. The α - and γ -folate alkynes, which served as precursors for the azide alkyne cycloaddition, were obtained in 4 steps in an overall yield of 21% for the α -regioisomer and 31% for the γ -regioisomer.

The coupling of 2-deoxy-2-fluoroglucopyranosyl azide to the α - or γ -conjugated folate alkyne derivative resulted in 25% of α -fluoro-deoxy-glucose folate and 52% of γ -fluoro-deoxy-glucose folate as non-radioactive reference compounds. *In vitro* binding affinity to the FR revealed no difference between the α - and γ -conjugated folate derivatives with relative values of 0.7 for the α -regioisomer and 0.6 for the γ -regioisomer compared to folic acid, which was set to 1. For the radiosyntheses, 2-deoxy-2-[^{18}F]fluoroglucopyranosyl azide was used for the coupling to the α - or γ -folate alkyne. Both regioisomers, α - and γ -[^{18}F]fluoro-deoxy-glucose folates, were obtained in good radiochemical yield (up to 25% decay corrected for the γ -conjugate), high radiochemical purity and good specific radioactivity (up to 170 GBq/ μmol). The novel radioconjugates displayed high hydrophilicity with $\log D_{7.4}$ values of -4.2 ± 0.1 and were stable *in vitro* and *in vivo*. *In vivo* biodistribution and PET imaging studies in KB tumor bearing mice showed high and specific uptake of both regioisomers into FR-positive tumors ($\sim 10\%$ ID/g at 60 min post injection). Importantly, α -[^{18}F]fluoro-deoxy-glucose folate exhibited a 3-fold lower liver uptake compared to its corresponding γ -regioisomer and other ^{18}F -radioconjugates. *In vitro* autoradiography studies on human atherosclerotic plaque sections demonstrated the feasibility of using [^{18}F]fluoro-deoxy-glucose folate to image plaque lesions. The relative accumulation of this radiotracer was on average 7-fold higher on atherosclerotic plaque sections in comparison to normal arteries. Nevertheless, it was not possible to distinguish between stable and the more dangerous vulnerable atherosclerotic plaques (see appendix).

As a further step towards improving the *in vivo* characteristics, we evaluated the concept of a prolonged blood circulation by incorporating a small albumin binding entity into γ -[^{18}F]fluoro-deoxy-glucose folate. The radiosynthesis of albumin binding [^{18}F]FDG-folate resulted in 1-2% decay corrected radiochemical yield. We were able to demonstrate that this chemical modification of the folate conjugate improved the tumor-to-kidney ratio significantly. The uptake in the kidneys was ~ 3.5 -fold reduced compared to γ -[^{18}F]fluoro-deoxy-glucose folate without albumin binding entity and uptake into FR-positive tumors was $\sim 15\%$ ID/g at 4 h post injection, which is the highest uptake value ever observed for an ^{18}F -labeled folate derivative. For the purpose of radioiodination, we also prepared and evaluated a folic acid derivative that contains tyrosine and an albumin binding entity. In previous studies it was shown that a partial *in vivo* deiodination of radioiodinated folates resulted in low kidney retention of radioactivity over time.

However, the hypothesis of increasing the tumor-to-kidney ratio by conjugation of an albumin binding entity to a radioiodinated folate derivative was not confirmed. In contrast, an unexpectedly high *in vivo* deiodination resulted in low uptake in FR-positive tumors and kidneys in addition to an enormous accumulation of free [¹²⁵I]iodide in the thyroid gland.

In order to have a pair of radiometallated folate regioisomers, which would allow testing the *in vivo* tissue distribution profile and pharmacokinetic behavior, α - and γ -NODAGA-bz-folates were synthesized and radiolabeled with ⁶⁷Ga. The radiolabeled folate derivatives α - and γ -[⁶⁷Ga]-NODAGA-bz-folates were obtained in high radiochemical yield $\geq 95\%$ and specific radioactivity of ~ 4 MBq/nmol. Both regioisomers were stable *in vitro* and revealed no difference in FR-binding properties. Further *in vivo* evaluations of both regioisomers are planned for the near future.

Regarding the PET imaging of atherosclerosis, we evaluated elastin as a potential target, since it is considered as a key player in the development of atherosclerotic plaques. The elastin derivative, NOTA-EBM, which served as a precursor for radiolabeling with [¹⁸F]AIF, was obtained in 25% yield. The radiosynthesis was accomplished by coordination of [¹⁸F]AIF in 8-13% decay corrected radiochemical yield. *In vitro* autoradiography studies revealed no clear difference in the accumulation of the radiotracer on human atherosclerotic plaque sections compared to control samples of normal human arteries, although *in vivo* PET images of a wild type mouse showed high accumulation of radioactivity in regions of high elastin content, e.g. the heart.

In conclusion, in this thesis several radiotracers for the imaging of cancer and cardiovascular diseases have been evaluated. New ¹⁸F-labeled folate conjugates were synthesized in relatively high radiochemical yields, which exhibited a significantly improved overall *in vivo* distribution, compared to previously reported ¹⁸F-labeled folate radiotracers. The target-to-background contrast was even improved by conjugation of a small albumin binding entity to the ¹⁸F-labeled folate derivative. Our findings of more favorable *in vivo* pharmacokinetics for the α -regioisomer of [¹⁸F]fluoro-deoxy-glucose folate compared to the γ -conjugated folate derivative warrant further investigations using other pairs of folate regioisomers, including α - and γ -[⁶⁷Ga]-NODAGA-bz-folates. With respect to atherosclerosis imaging it remains to be seen whether more specific radiotracers for other targets are able to differentiate between the two plaque phenotypes and can serve as radiopharmaceuticals for the detection of dangerous plaque lesions.

ZUSAMMENFASSUNG

Nach Einschätzung der World Health Organization (WHO) zählen Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Krebs zu den häufigsten Gesundheitsproblemen und Todesursachen in den westlichen Ländern. Die Einzelphotonen-Emissions-Computertomographie (SPECT) und die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) sind nicht-invasive bildgebende Verfahren, welche die Verteilung eines applizierten Radiopharmazeutikums im Körper abbilden. Die Identifizierung von Zielstrukturen und die Entwicklung von Radiopharmazeutika, die spezifisch an diese Zielstrukturen binden können, zählen zu den vielversprechenden Strategien für die Diagnostik und Beurteilung von Krankheiten.

Der Folatrezeptor (FR) stellt eine geeignete Zielstruktur für das Tumortargeting und die Diagnose von Entzündungskrankheiten, wie z.B. rheumatoider Arthritis und Atherosklerose dar. Eine Überexpression des FR findet man in zahlreichen Krebsarten und auf der Oberfläche von aktivierten Makrophagen, die sich vor allem in Entzündungsregionen anreichern. Es wurden bereits mehrere mit Fluor-18 markierte und spezifisch an den FR bindende Folsäurekonjugate synthetisiert und untersucht. Diese ¹⁸F-markierten Folsäurederivate konnten jedoch aufgrund von geringen radiochemischen Ausbeuten oder einer hohen Aufnahme im abdominalen Bereich nicht überzeugen und sind daher nicht für die klinische Routine geeignet.

Das Protein Elastin, ein Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix, ist eine aussichtsreiche Zielstruktur für die Diagnostik von Atherosklerose, einer Krankheit, bei der Ablagerungen in den Gefäßwänden, sogenannte atherosklerotische Plaques, gebildet werden. Atherosklerose ist eine der Hauptgründe für die Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Elastin kommt als Strukturprotein in den Gefäßwänden vor, wobei eine erhöhte Expression während der Entstehung von atherosklerotischen Plaques nachgewiesen wurde. Ein kürzlich entwickeltes Elastin-spezifisches Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie wurde erfolgreich zur Quantifizierung von Ablagerungen in den Gefäßen eines atherosklerotischen Mausmodells angewendet. Für die PET-Bildgebung ist bis jetzt kein Elastin-spezifischer Radiotracer bekannt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten darauf aufbauend folgende Themen erarbeitet werden: (i) Die Entwicklung eines Fluor-18 markierten Folsäurederivates mit verbesserten *in vivo*-Eigenschaften für die Bildgebung von Krebs und Entzündungsherden; (ii) die Untersuchung des Einflusses einer unterschiedlichen Konjugation an den α - und γ -Carboxylgruppen des Folsäuremoleküls auf die pharmakologischen Eigenschaften von Folatradiokonjugaten und (iii) die Evaluation eines Elastin-spezifischen PET-Radiopharmazeutikums für die Diagnose von atherosklerotischen Plaques.

Um die radiochemische Ausbeute und *in vivo*-Verteilung von ^{18}F -markierten Folsäurederivaten zu verbessern, wurde eine ^{18}F -markierte glykosylierte Folsäure, [^{18}F]Fluordeoxyglucose-Folat, mit Hilfe der Kupfer(I)-katalysierten 1,2-dipolaren [3+2] Cycloaddition synthetisiert. Die α - und γ -konjugierten Folatalkine, die als Vorstufen für die Azid-Alkin-Cycloaddition dienten, wurden in vier Stufen und einer Ausbeute von 21% für das α -Regioisomer und 31% für das γ -Regioisomer erhalten. Die Kopplung von 2-Deoxy-2-Fluorglucopyranosyl-Azid mit dem α - oder γ -Folatalkinderivat führte zu den nicht-radioaktiven Referenzverbindungen mit Ausbeuten von 25% für das α -Fluordeoxyglucose-Folat und 52% für das γ -Fluordeoxyglucose-Folat. *In vitro*-Bindungsaffinitätsstudien zeigten keinen Unterschied zwischen den Bindungsaffinitäten des α - und γ -Regioisomers zum Folatrezeptor. Im Vergleich zu natürlicher Folsäure mit einem Referenzwert von 1, wurden relative Werte von 0.7 für das α -Regioisomer und 0.6 für das γ -Regioisomer bestimmt.

Für die Radiosynthesen wurde 2-Deoxy-2- ^{18}F Fluorglucopyranosyl-Azid als prosthetische Gruppe für die Kopplung mit dem α - oder γ -Folatalkin verwendet. Beide Regioisomere, α - und γ - ^{18}F Fluordeoxyglucose-Folat, wurden in guten radiochemischen Ausbeuten (bis zu 25% zerfallskorrigiert für das γ -Regioisomer), hohen radiochemischen Reinheiten und guten spezifischen Radioaktivitäten (bis zu 170 GBq/ μmol) erhalten. Die neuen Folatradiokonjugate wiesen mit einem $\log D_{7.4}$ -Wert von -4.2 ± 0.1 eine hohe Hydrophilie auf und waren sowohl *in vitro* als auch *in vivo* stabil. *In vivo*-Biodistributions- und PET-Studien in Tumormäusen zeigten eine hohe und spezifische Aufnahme beider Regioisomere in den FR-positiven Tumoren ($\sim 10\%$ ID/g, 60 min nach Injektion). Im Vergleich zum γ -Regioisomer und anderen ^{18}F -markierten Folatkonjugaten zeigte das α - ^{18}F Fluordeoxyglucose-Folat erstaunlicherweise eine wesentlich geringere Aufnahme (1/3 der Menge) in der Leber.

In vitro-Autoradiographiestudien auf Schnitten von humanen atherosklerotischen Plaques bestätigten die Möglichkeit, [^{18}F]Fluordeoxyglucose-Folat für die Diagnose von atherosklerotischen Plaques zu nutzen. Im Durchschnitt war die relative Anreicherung des Radiotracers auf Schnitten atherosklerotischer Plaques siebenmal höher als auf denen normaler Arterien. Dennoch war es nicht möglich, zwischen stabilen und den gefährlicheren, instabilen atherosklerotischen Plaques zu unterscheiden (siehe Anhang). Ein weiterer Schritt zu einer verbesserten *in vivo*-Verteilung wurde durch die Untersuchung einer verlängerten Blutzirkulation gemacht. Dafür erfolgte die Konjugation einer kleinen Albumin-bindenden Einheit an γ -[^{18}F]Fluordeoxyglucose-Folat. Die Radiosynthese des Albumin-bindenden [^{18}F]FDG-Folates lieferte eine radiochemische Ausbeute von 1-2% (zerfallskorrigiert). Das Tumor-zu-Niere-Verhältnis konnte durch die chemische Modifizierung des Folatradiokonjugates signifikant verbessert werden. Im Vergleich zum γ -[^{18}F]Fluordeoxyglucose-Folat ohne Albumin-bindende Eigenschaften konnte die Aufnahme in den Nieren um das 3.5-fache reduziert werden. Die Aufnahme in die FR-positiven Tumore betrug $\sim 15\%$ ID/g (4 h nach Injektion), der bisher höchste erzielte Wert für die Aufnahme eines ^{18}F -markierten Folatderivates in FR-positive Tumore.

Für die Durchführung einer Radioiodierung wurde ein Folatderivat mit einer Tyrosinseitenkette und einer Albumin-bindenden Einheit synthetisiert. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass die *in vivo* Deiodierung von radioiodierten Folatderivaten zu einem kürzeren Verbleib der Radioaktivität in den Nieren führte. Allerdings konnte die Hypothese, dass durch Konjugation einer Albumin-bindenden Einheit an ein radioiodiertes Folatderivat ein besseres Tumor-zu-Niere-Verhältnis erzielt werden kann, nicht bestätigt werden. Es zeigte sich hingegen eine unerwartet hohe Deiodierung und eine geringe Aufnahme des Radiotracers in den FR-positiven Tumoren und Nieren. Ausserdem wurde eine massive Anreicherung von freiem [^{125}I]Iodid in der Schilddrüse detektiert.

Für die Untersuchung der *in vivo*-Verteilung und des pharmakologischen Verhaltens eines radiometallierten α - und γ -konjugierten Folsäurepaares wurde α - und γ -NODAGA-Folat synthetisiert und mit Gallium-67 radiomarkiert. Die beiden radiomarkierten Folatregioisomere, α - und γ -[^{67}Ga]-NODAGA-Folat, wurden in hohen radiochemischen Ausbeuten von $\geq 95\%$ und spezifischen Radioaktivitäten von ~ 4 MBq/nmol erhalten.

Beide Regioisomere waren *in vitro* stabil und wiesen keinen Unterschied in den FR-Bindungseigenschaften auf. Zukünftige *in vivo*-Studien sind mit beiden Regioisomeren geplant.

Im Hinblick auf die PET-Bildgebung von atherosklerotischen Plaques erfolgte die Untersuchung von Elastin als potentielle Zielstruktur, da ein Zusammenhang dieses Proteins mit der Entwicklung von atherosklerotischen Plaques nachgewiesen wurde. Es wurde ein Elastin-bindendes Derivat, NOTA-EBM, welches als Markierungsvorstufe für die Radiomarkierung mit [^{18}F]AIF diente, mit einer Ausbeute von 25% synthetisiert. Durch Koordination von [^{18}F]AIF im Chelator wurde [^{18}F]AIF-NOTA-EBM in radiochemischen Ausbeuten von 8-13% (zerfallskorrigiert) erhalten. *In vitro*-Autoradiographiestudien mit diesem Radiotracer zeigten auf Schnitten von humanen atherosklerotischen Plaques keine Unterschiede im Vergleich zu Schnitten von normalen Arterien, obwohl *in vivo*-PET-Studien in einer Wildtyp-Maus eine hohe Anreicherung von Radioaktivität in Organen mit hohem Elastingehalt (z.B. im Herz) zeigten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Radiotracer zur Diagnose von Krebs und Herz-Kreislauf-Erkrankungen synthetisiert und untersucht. Die neuen ^{18}F -markierten Folsäurekonjugate wurden im Vergleich zu vorhergehenden, mit Fluor-18 markierten Folatderivaten in guten radiochemischen Ausbeuten synthetisiert. Durch die chemische Modifizierung eines ^{18}F -markierten Folsäurederivates mit einer Albumin-bindenden Einheit konnte der Target-zu-Hintergrund-Kontrast noch weiter verbessert werden. Die bessere *in vivo*-Pharmakokinetik des α -Regioisomers des [^{18}F]Fluorodeoxyglucose-Folates im Vergleich zum dazugehörigen γ -Regioisomer zeigt, dass weitere Folsäurekonjugat-Regioisomerenpaare, z.B. α - und γ -[^{67}Ga]-NODAGA-Folat, in Bezug auf ihre pharmakologischen Eigenschaften untersucht werden sollten. Hinsichtlich der Bildgebung von Atherosklerose bleibt abzuwarten, ob weitere, spezifischere Radiotracer für andere Zielstrukturen zwischen den zwei Plaque-Arten unterscheiden können und somit als Radiopharmazeutika für die Detektion von atherosklerotischen Plaques in Frage kommen.