

DISS. ETH NO. 22443

*SYNTHESES AND EVALUATION OF NOVEL CANNABINOID TYPE 2  
RECEPTOR TRACERS FOR PET IMAGING*

A thesis submitted to attain the degree of  
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

*ROGER SLAVIK*

MSc ETH Pharm. Sc, ETH Zurich

born on 26.06.1985

citizen of Illnau-Effretikon ZH, Switzerland

accepted on the recommendation of

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

2015

## SUMMARY

The Endocannabinoid system is a very complex homeostatic signaling system which includes two main subtypes of G-protein coupled receptors, designated as cannabinoid receptor type 1 (CB1) and cannabinoid receptor type 2 (CB2). Whereas CB1 was subject of intense research since its discovery in 1990 due to its prominent psychoactive properties, CB2 only gained more attention in the past few years. As a receptor involved in modulating the immune system, CB2 is considered a potential therapeutic target in a wide variety of diseases, including difficult to treat conditions such as Parkinson's and Alzheimer's disease, multiple sclerosis (MS) and amyotrophic lateral sclerosis (ALS), schizophrenia or HIV-induced encephalitis. A specific and selective CB2 radiotracer for non-invasive *in vivo* Positron emission tomography (PET) would help to understand the pathophysiology of such diseases on a molecular basis and would allow monitoring disease progression and therapeutic outcome in the clinic.

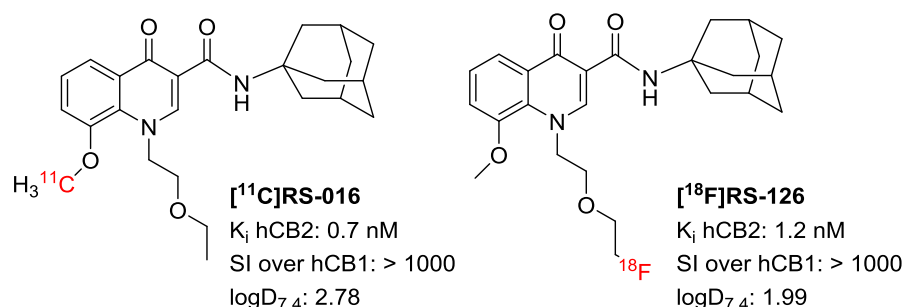
Chapter one of this thesis provides a brief overview on the endocannabinoid system, which is perhaps one of the most intriguing control systems in mammals, and recent developments in the field of PET imaging and PET radiochemistry. The section closes with a discussion on prerequisites for an ideal CB2 PET ligand and the results of attempts made by research groups to develop CB2 PET imaging agents.

Chapter two of this thesis describes two highly specific and selective 4-oxo- and 2-oxo-quinoline derivatives, designated KD2 and KP23. Both compounds were synthesized in five steps using a modified literature procedure in comparable chemical yields. *In vitro* competitive binding assays revealed a  $K_i$  value towards human CB2 (hCB2) of 1.7 nM for KD2 and 6.8 nM for KP23. Selectivity over hCB1 for both compounds was  $> 1000$ . Specific binding to spleen, an organ with a high physiological expression of CB2, was demonstrated *in vitro* and *in vivo* using the carbon-11 radiolabeled analogs, [ $^{11}\text{C}$ ]KD2 and [ $^{11}\text{C}$ ]KP23. [ $^{11}\text{C}$ ]KD2 exhibited superior characteristics compared to [ $^{11}\text{C}$ ]KP23, but was found to bind predominantly to plasma proteins, possibly due to its high lipophilicity resulting from a  $\log D_{7.4}$  value of 3.29. This prompted the design of less lipophilic analogs of KD2 with the aim to reduce plasma protein binding and at the same time retain the excellent binding affinity and selectivity of the new derivatives towards CB2. The results of these efforts are presented in Chapter three.

The syntheses of the newly designed compounds described in Chapter three were all accomplished in five to six steps in good overall chemical yields of 23 – 48%. Their binding affinity ( $K_i$  values) towards hCB2 ranged from 0.7 nM to 750 nM. RS-016 (Figure 0-1), displaying a clogP value of 3.02, a  $K_i$  value of 0.7 nM and a selectivity of > 10,000 over hCB1, was identified as the most promising compound. Due to these excellent *in vitro* properties, a reliable and high yielding radiosynthetic procedure was developed for RS-016. The carbon-11 labeling was accomplished by reacting desmethyl-RS-016 precursor with [ $^{11}\text{C}$ ]methyl iodide to afford [ $^{11}\text{C}$ ]RS-016 in 15 - 33% decay corrected radiochemical yield and a specific activity of  $545 \pm 154$  GBq/ $\mu\text{mol}$ . The lipophilicity of [ $^{11}\text{C}$ ]RS-016 was experimentally determined using the shake-flask method to afford a  $\log D_{7.4}$  value of 2.78. Compared to [ $^{11}\text{C}$ ]KD2, [ $^{11}\text{C}$ ]RS-016 showed lower non-specific binding in autoradiographic studies on spleen slices. PET imaging studies in rats showed high accumulation in the spleen. Of this high accumulation *in vivo* in spleen, ~ 78% was attributed to specific binding to CB2. In a pilot study on human post mortem ALS spinal cord tissue sections, specific binding to CB2 was also demonstrated, which underlines CB2 as a potential target for imaging in ALS patients. Due to the low abundance of CB2 in the healthy brain, demonstration of specific uptake of a CB2 radioligand in the central nervous system (CNS) is challenging. Therefore, a murine model of neuroinflammation, which induces elevated CB2 levels in the brain after intraperitoneal administration of lipopolysaccharide (LPS), was selected. With this model, we were able to show higher accumulation of [ $^{11}\text{C}$ ]RS-016 in the brains of LPS-treated mice compared to vehicle-treated.

The promising *in vitro* and *in vivo* data obtained from [ $^{11}\text{C}$ ]RS-016 encouraged us to prepare fluorinated derivatives of RS-016 in order to identify potential compounds, which could be labeled with fluorine-18, a radionuclide with a longer physical half-life of 110 min compared to 20 min for carbon-11. Chapter four of this thesis describes the syntheses of three novel fluorinated compounds, which were all accomplished in 6 - 30% overall chemical yields. *In vitro* competitive binding assays revealed compound RS-126 as the most potent fluorinated CB2 ligand.  $K_i$  value towards hCB2 was 1.2 nM with greater than 8,000-fold selectivity over hCB1. Labeling with fluorine-18 was accomplished in a one-step radiosynthesis by reacting the bromo precursor with [ $^{18}\text{F}$ ]TBAF at 110 °C in DMF for 10 min. The desired product, [ $^{18}\text{F}$ ]RS-126, was obtained in  $\geq 99\%$  radiochemical purity with a specific activity of  $98 \pm 44$  GBq/ $\mu\text{mol}$  in moderate radiochemical yields of ~ 6% (decay corrected). The *in vitro* data collected with [ $^{18}\text{F}$ ]RS-126 revealed a  $\log D_{7.4}$  value of 1.99 and low non-specific binding in autoradiographic studies using spleen tissues. No degradation was observed when

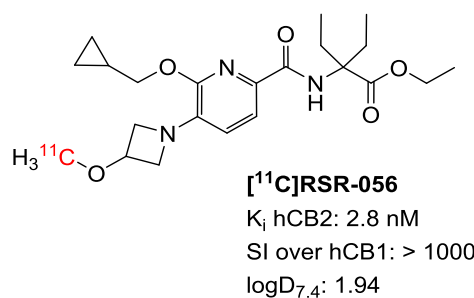
[<sup>18</sup>F]RS-126 was incubated in rat or human plasma for up to 2 h at 37 °C. In rat blood plasma, 55% of intact parent compound was found 15 min post injection. No defluorination was observed in rats over a time course of 60 min. From the high tracer accumulation in spleen, 79% was attributed to specific binding to CB2.



**Figure 0-1.** Two novel oxo-quinoline CB2 PET tracers developed in this thesis. SI = selectivity index.

In collaboration with Hoffmann-La Roche (Basel), we also investigated the utility of 2,5,6-substituted pyridines as potential CB2 PET imaging agents. In Chapter five of this thesis are presented a total of 21 novel compounds, which were designed and synthesized. Three carboxylic acid key intermediates were synthesized in four to six steps in overall chemical yields of 11 - 19%. These intermediates were coupled to appropriate primary amines in 18 - 85% to obtain the final compounds, which were all characterized by NMR and MS. Pharmacological evaluation included the determination of  $EC_{50}$  values on human CB1 and CB2,  $K_i$  values towards both human and murine CB2 as well as  $\log D$  values. The  $K_i$  values obtained ranged from 1.8 nM to 10  $\mu$ M and  $\log D$  values were between 1.7 and 3.8. The most promising compound, denoted RSR-056, exhibited  $K_i$  values of 1.8 nM and 2.5 nM towards murine and human CB2, respectively, with a selectivity over hCB1 of > 1000-fold (Figure 0-2). A one-step radiosynthetic procedure towards the synthesis of [<sup>11</sup>C]RSR-056 was successfully established by reacting the sodium salt of a hydroxyl precursor with [<sup>11</sup>C]MeI. The desired product was obtained in maximal radiochemical yield of 29% (decay corrected) with high specific activity of  $194 \pm 139$  GBq/ $\mu$ mol and > 99% radiochemical purity. The  $\log D_{7.4}$  value of [<sup>11</sup>C]RSR-056 was 1.94. This tracer showed high *in vitro* specific binding to spleen slices in autoradiographic studies, which was confirmed *in vivo* in PET and biodistribution experiments. The specific binding of [<sup>11</sup>C]RSR-056 *in vivo* to CB2 in the spleen was 79% and similar to the value obtained with [<sup>11</sup>C]RS-016 or [<sup>18</sup>F]RS-126. *In vivo* stability in rats was moderate and 21% intact parent compound was found in blood plasma 20 min p.i.. Increased accumulation of [<sup>11</sup>C]RSR-056 was also found in the whole brain in

mice after LPS treatment compared to vehicle group, which could be reduced by the specific CB2 ligand GW40833.



**Figure 0-2.** Novel tri-substituted pyridine CB2 PET tracer developed in this thesis.

In conclusion, three novel promising CB2 radioligands, [<sup>11</sup>C]RS-016, [<sup>18</sup>F]RS-126 and [<sup>11</sup>C]RSR-056, have been identified as potential CB2 PET imaging agents. Their utility in imaging neuroinflammatory conditions, however, remains to be validated in further animal models.

## ZUSAMMENFASSUNG

Das endogene Cannabinoid-System ist ein komplexer homöostatischer Teil des Nervensystems von Säugetieren und umfasst zwei G-Protein gekoppelte Cannabinoid-Rezeptortypen (CB1 und CB2) mit ihren dazugehörigen Liganden. Seit der Entdeckung von CB1 im Jahre 1990 konzentrierte sich die Cannabinoid-Forschung nahezu ausschliesslich auf diesen Rezeptorsubtypen. Ein Hauptgrund dafür lag in den psychoaktiven Eigenschaften, die mit diesem Rezeptortypen assoziiert werden. Erst in den letzten Jahren gewann CB2 mehr Aufmerksamkeit. CB2 ist involviert in der Steuerung des Immunsystems und gilt daher als potenzielles Target für eine Pharmakotherapie in verschiedenen Erkrankungen, unter anderem auch in schwierig therapierbaren neurodegenerativen Leiden wie Parkinson, Alzheimer, multiple Sklerose (MS), amyotrophe Lateralsklerose (ALS), Schizophrenie oder HIV-induzierter Enzephalitis. Ein spezifischer und selektiver CB2 Radioligand für nicht-invasive *in vivo* Positron-Emissions-Tomographie (PET) würde dazu beitragen, die Pathophysiologie solcher Erkrankungen auf molekularer Ebene besser zu verstehen und die Überwachung des Krankheitsablaufs und Therapieerfolges zu ermöglichen.

Kapitel eins dieser Dissertation bietet einen Überblick über das endogene Cannabinoid-System, wohl eines der faszinierendsten Kontrollsysteme in Säugetieren, und fasst aktuelle Entwicklungen im Bereich der PET Bildgebung und der PET Radiochemie zusammen. Das Kapitel schliesst mit einer Diskussion von wünschenswerten Eigenschaften eines CB2 PET Radioliganden und den Versuchen anderer Forschungsgruppen, ein solches CB2 PET Radiopharmakon zu entwickeln.

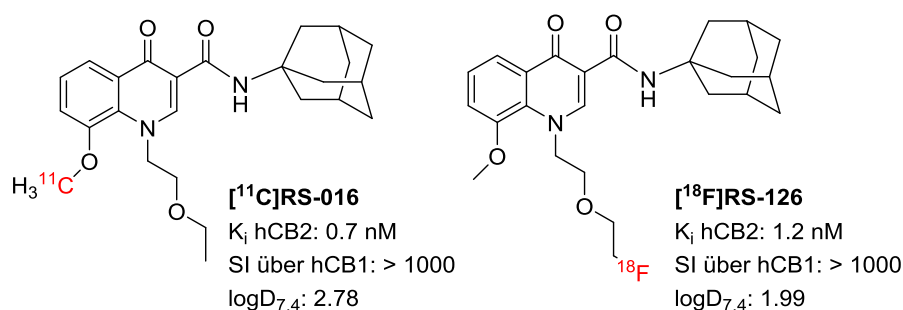
Kapitel zwei beschreibt zwei hochspezifische und selektive 2-Oxo- oder 4-Oxo-Chinolinderivate, KP23 und KD2. Beide Liganden wurden in fünf Schritten synthetisiert, basierend auf den Beschreibungen aus der Literatur in vergleichbaren chemischen Ausbeuten. Durchgeführte *in vitro* kompetitive Bindungsstudien ergaben einen  $K_i$ -Wert zum humanen CB2 (hCB2) von 1.7 nM für KD2 und 6.8 nM für KP23. Die Selektivität über hCB1 war für beide Liganden  $> 1000$ . Die spezifische Bindung in der Milz, ein Organ mit physiologisch hoher CB2 Expression, konnte *in vitro* wie auch *in vivo* mit den Kohlenstoff-11 markierten Analoga, [ $^{11}\text{C}$ ]KD2 und [ $^{11}\text{C}$ ]KP23, gezeigt werden. [ $^{11}\text{C}$ ]KD2 zeigte zwar das vielversprechendere Potential verglichen mit [ $^{11}\text{C}$ ]KP23, war aber wahrscheinlich auf Grund der hohen Lipophilie ( $\log D_{7.4}$  von 3.29) stark an Plasmaproteinen gebunden. Dies veranlasste uns, neue weniger lipophile Derivate von KD2 zu entwickeln, um die Plasma Protein Bindung

zu reduzieren und zugleich aber die exzellente Bindungsaffinität und Selektivität zu CB2 zu bewahren. Die Resultate dieser Bemühungen werden in Kapitel drei präsentiert.

Alle neuen Derivate in Kapitel drei wurden in guten chemischen Ausbeuten von 23 - 48% in fünf bis sechs Schritten synthetisiert. Die gemessenen  $K_i$ -Werte an hCB2 lagen zwischen 0.7 nM und 750 nM. Hier wurde RS-016 (Abbildung 0-1) als das erfolgversprechendste Derivat für eine Radiomarkierung ausgewählt, das es mit einem  $K_i$ -Wert von 0.7 nM, einem  $\text{clogP}$ -Wert von 3.02 und einer hohen Selektivität über CB1 von  $> 10,000$  herausragende Eigenschaften besass. Eine verlässliche Radiosynthese mit hohen Ausbeuten wurde entwickelt und etabliert. Zur Kohlenstoff-11 Markierung wurde eine desmethyl-Vorstufe von RS-016 benutzt und mit [ $^{11}\text{C}$ ]Methyliodid reagiert. Dies ergab den erwünschten Radioliganden [ $^{11}\text{C}$ ]RS-016 in 15 - 33% zerfallskorrigierten radiochemischen Ausbeuten und einer spezifischen Radioaktivität von  $545 \pm 154 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$ . Die Lipophilie wurde mit der Schüttelmethode experimentell bestimmt und ein  $\text{logD}_{7.4}$ -Wert von 2.78 ermittelt. In autoradiographischen Studien mit Milzschnitten zeigte [ $^{11}\text{C}$ ]RS-016, verglichen mit [ $^{11}\text{C}$ ]KD2, eine geringere unspezifische Bindung. Eine hohe Akkumulation in der Milz konnte auch in PET Studien in Ratten gezeigt werden, wobei etwa 78% dieser Akkumulation der spezifischen Bindung an CB2 angerechnet werden konnte. Auch in einer Pilotstudie mit humanen post mortem ALS Rückenmarkproben konnte eine spezifische CB2 Bindung nachgewiesen werden. Dies unterstreicht das Potential von CB2 als PET Target für die Bildgebung in ALS Patienten. Auf Grund des geringfügigen Expressionslevels von CB2 im gesunden Hirn ist es besonders schwierig, eine spezifische CB2 Bindung eines Radioliganden im Hirn nachzuweisen. Folglich wurde ein Mausmodell für Hirnentzündungen ausgewählt, worin erhöhte CB2 Expression mittels Lipopolysacchariden (LPS) induziert wird. Verglichen mit den Vehikel-behandelten Mäusen konnte mit diesem Tiermodell eine erhöhte Akkumulation von [ $^{11}\text{C}$ ]RS-016 in den Hirnen von LPS-behandelten Mäusen gezeigt werden.

Da sich das Radionuklid Fluor-18 gegenüber Kohlenstoff-11 durch eine längere Halbwertszeit von etwa 110 Minuten auszeichnet und geeignete Zerfallscharakteristika aufweist, sollten fluoriierte Derivate von RS-016 entwickelt werden. Kapitel vier dieser Dissertation beschreibt die Synthesen von drei neuen fluorierten Liganden, welche alle in chemischen Ausbeuten von 6 - 30% hergestellt werden konnten. *In vitro* Bindungsstudien haben RS-126 als den potentesten fluorierten Liganden identifiziert, dessen  $K_i$ -Werte an hCB2 zu 1.2 nM bestimmt wurde und sich durch eine hohe Selektivität über CB1 von  $> 8,000$  auszeichnete. Ausgehend von einem bromierten Markierungsvorläufer wurde eine Ein-Schritt-Radiosynthese,

( $[^{18}\text{F}]\text{TBAF}$ , 10 min, DMF, 110 °C) etabliert. Das gewünschte Produkt  $[^{18}\text{F}]\text{RS-126}$  wurde in einer radiochemischen Reinheit von  $\geq 99\%$  und einer spezifischen Aktivität von  $98 \pm 44 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$  in hinreichend hohen radiochemischen Ausbeute von etwa 6% (zerfallskorrigiert) erhalten. Der  $\log D_{7,4}$ -Wert wurde zu 1.99 bestimmt. Ferner zeigten autoradiographische Studien mit Milzschnitten von Ratten eine geringe unspezifische Bindung. Plasmastabilitätsstudien mit humanem Blutplasma oder Rattenplasma zeigten über eine Inkubationszeit von zwei Stunden bei 37 °C keine Abbauprodukte von  $[^{18}\text{F}]\text{RS-126}$ . *In vivo* PET Experimente zeigten keine defluorierung in Ratten innerhalb von 60 min nach Injektion. Wiederum konnten 79% der Akkumulation in der Milz der spezifischen Bindung an CB2 zugeschrieben werden.

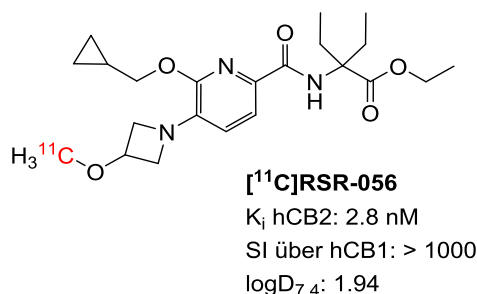


**Abbildung 0-1.** Zwei neue Oxo-Chinolin CB2 PET Radioliganden, die im Rahmen dieser Dissertation entwickelt wurden. SI = Selektivitätsindex.

Des Weiteren untersuchten wir im Rahmen einer Kollaboration mit der Firma Hoffmann-La Roche (Basel) 2,5,6-substituierte Pyridine auf ihr Potential als CB2 PET Liganden. In Kapitel fünf dieser Dissertation werden insgesamt 21 neu entworfene und synthetisierte Derivate beschrieben. Zu diesem Zwecke wurden drei Carbonsäurederivate als Schlüsselbausteine in vier bis sechs Schritten in chemischen Ausbeuten von 11 - 19% hergestellt. Diese Zwischenprodukte wurden mit ausgewählten primären Aminen in 18 – 85% Ausbeute zu Carbonsäureamiden als Endprodukte umgesetzt, welche alle mittels NMR und MS charakterisiert wurden. Die pharmakologische Evaluierung beinhaltete die Bestimmung der  $\text{EC}_{50}$ -Werte an hCB1 und hCB2, der  $K_i$ -Werte an hCB2 und Maus-CB2, wie auch die Bestimmung der  $\log D$ -Werte. Die erhaltenen  $K_i$ -Werte lagen alle im Bereich zwischen 1.8 nM und 10  $\mu\text{M}$ , wobei die  $\log D$ -Werte im Bereich von 1.7 - 3.8 lagen. Der vielversprechendste Ligand RSR-056 (Abbildung 0-2) besass einen  $K_i$ -Wert von 1.8 nM zum Maus-CB2 und 2.5 nM zum hCB2, und eine über 1000-fache Selektivität über hCB1. Eine Ein-Schritt-Radiosynthese für  $[^{11}\text{C}]\text{RSR-056}$  wurde erfolgreich etabliert. Ausgehend vom Natriumsalz der Hydroxyvorstufe und  $[^{11}\text{C}]\text{MeI}$  wurde das gewünschte Produkt in einer



radiochemischen Ausbeute von max. 29% (zerfallskorrigiert) mit hoher spezifischen Aktivität von  $194 \pm 139$  GBq/ $\mu$ mol und  $\geq 99\%$  radiochemischer Reinheit erhalten. Der  $\log D_{7,4}$ -Wert von [ $^{11}\text{C}$ ]RSR-056 lag bei 1.94. Hohe *in vitro* spezifische Bindung an Milzschnitten wurden in autoradiographischen Experimenten gezeigt, was mit *in vivo* PET Studien und Bioverteilungsexperimenten bestätigt werden konnte. Die spezifische Bindung von [ $^{11}\text{C}$ ]RSR 056 *in vivo* an CB2 war 79% und entspricht den Werten von [ $^{11}\text{C}$ ]RS-016 oder [ $^{18}\text{F}$ ]RS-126. [ $^{11}\text{C}$ ]RSR-056 wurde *in vivo* in Ratten schnell metabolisiert und nur 21% des intakten Radioliganden wurden nach 20 min im Blutplasma gefunden. Eine erhöhte Akkumulation von [ $^{11}\text{C}$ ]RSR-056 konnte in den Hirnen von LPS-behandelten gegenüber Vehikel-behandelten Mäusen gezeigt werden. Diese Aufnahme konnte mit dem spezifischen CB2 Blocker GW405833 reduziert werden.



**Abbildung 0-2.** Neu entwickeltes dreifach substituiertes Pyridin Derivat als CB2 PET Radioligand.

Als Endergebnis dieser Dissertation wurden drei neue, vielversprechende CB2 Radioliganden, [ $^{11}\text{C}$ ]RS-016, [ $^{18}\text{F}$ ]RS-126 und [ $^{11}\text{C}$ ]RSR-056, als potentielle CB2 PET Radiopharmaka entwickelt. Die Eignung zur Bildgebung von neurodegenerativen Erkrankungen sollte aber noch in weiteren Tiermodellen studiert werden.