



Doctoral Thesis

## **Development of PET Radioligands for Imaging N-Methyl-D-Aspartate and Cannabinoid Type 2 Receptors in the Central Nervous System**

**Author(s):**

Haider, Ahmed

**Publication Date:**

2018

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-b-000297993> →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS ETH NO. 25226

# **Development of PET Radioligands for Imaging N-Methyl-D-Aspartate and Cannabinoid Type 2 Receptors in the Central Nervous System**

A thesis submitted to attain the degree of  
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH  
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

AHMED HAIDER

*MSc in Med. and Ind. Pharm. Sc., ETH Zurich*

born on 06.04.1989

citizen of Zug ZG, Switzerland

accepted on the recommendation of

*Prof. Dr. Simon M. Ametamey, examiner*

*Prof. Dr. Roger Schibli, co-examiner*

*Dr. Linjing Mu, co-examiner*

2018

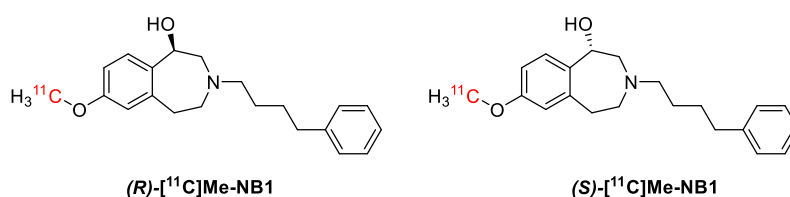
## SUMMARY

Pro-inflammatory cytokines in the central nervous system are produced in response to homeostatic imbalance, fueling neuroinflammatory cascades that are implicated in neurodegenerative disorders. Despite the identification of numerous bona fide cytokines and respective receptors expressed in the mammalian CNS, understanding their differential role in disease etiology remains to be challenging primarily due to confounders resulting from the complexity of neuronal networks. Consequently, mechanisms leading to neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD), multiple sclerosis (MS) and amyotrophic lateral sclerosis (ALS) are not yet fully understood and the development of effective therapeutics remains challenging. The inherent irreversibility of neuronal damage perpetuates neurodegenerative impairments and renders an early diagnosis and immediate therapeutic intervention crucial to successful long-term disease management. Aiming at an improved understanding of neuroinflammatory signaling pathways and with the aspiration to enable early patient diagnosis, our research group has taken up the challenge of developing positron emission tomography (PET) radioligands for a number of specific biological targets that are implicated in neuroinflammation. Besides early patient diagnosis, PET imaging provides the opportunity to study drug/receptor interactions in living organisms, which in turn accelerates drug development and minimizes dose-dependent adverse events often observed with drug candidates targeting the CNS. Due to their broad implication in a number of neurodegenerative disorders, the GluN2B-carrying *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) and the cannabinoid type 2 (CB2) receptors, for which currently no PET radioligand exists, were selected as biological targets.

Chapter one of the present thesis provides a brief overview of the glutamatergic and endocannabinoid systems and elucidates their role in neurodegeneration. The principle of PET is introduced and recent advances with respect to the development of PET radiopharmaceuticals targeting CB2 and NMDA receptors are discussed.

Chapter two of this thesis describes the evaluation of an enantiomeric pair of carbon-11 labeled probes, designated (*R*)-[<sup>11</sup>C]Me-NB1 and (*S*)-[<sup>11</sup>C]Me-NB1 (**Figure 0-1**), for imaging the GluN2B-carrying NMDA receptor. In a previous study using racemic [<sup>11</sup>C]Me-NB1, it was shown that the probe exhibited specificity for GluN2B and excellent pharmacokinetic performance characteristics. Me-NB1 revealed a high target affinity of 5.4 nM to the human GluN2B-carrying NMDA receptor. The benzazepine-based structure of MeNB1 bears one chiral center within the pharmacophore. To assess the performance characteristics of the two distinct enantiomers of [<sup>11</sup>C]Me-NB1 regarding GluN2B specificity and selectivity, we evaluated enantiopure (*R*)-[<sup>11</sup>C]Me-NB1 and (*S*)-[<sup>11</sup>C]Me-NB1 by *in vitro* autoradiography and PET imaging. The syntheses of reference compound Me-NB1 and the respective phenolic precursor NB1 for carbon-11 labeling were performed according to a previously reported procedure via multi-step synthesis involving N-alkylation, intramolecular Friedel-Crafts acylation, saponification, ketone reduction and BBr<sub>3</sub>-mediated demethylation in moderate overall yields of 12%

and 8%, respectively. Upon chiral resolution by HPLC, the absolute configuration of (*R*)-Me-NB1 and (*S*)-Me-NB1 were determined by X-ray crystallography and circular dichroism. Enantiomerically pure (*R*)-[<sup>11</sup>C]Me-NB1 and (*S*)-[<sup>11</sup>C]Me-NB1 were obtained by the treatment of (*R*)-NB1 and (*S*)-NB1 with [<sup>11</sup>C]iodomethane in 42 ± 9 % radiochemical yield (decay corrected) and molar activity of 204 ± 80 GBq/μmol (n = 66). The radiochemical purity was greater than 99% for both enantiomeric forms. (*R*)-[<sup>11</sup>C]Me-NB1 and (*S*)-[<sup>11</sup>C]Me-NB1 revealed entirely different receptor binding behavior as evidenced by distinct binding patterns in autoradiographic studies with rodent brain tissues, molecular dynamics simulations as well as *in vivo* dose-response experiments in Wistar rats.

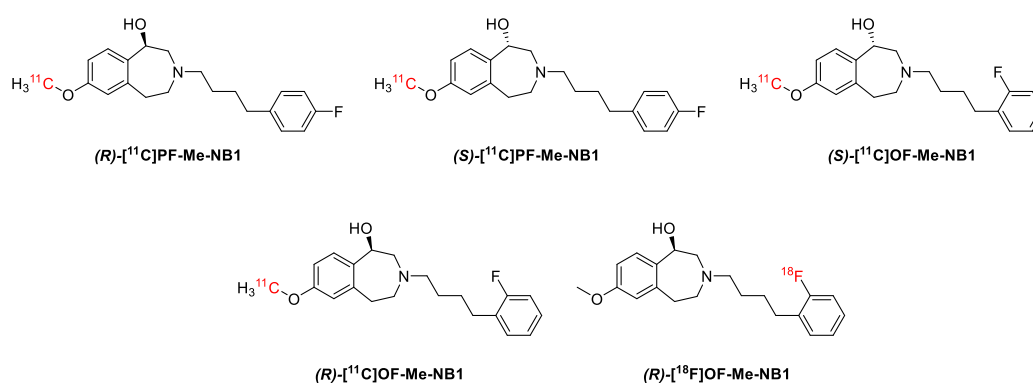


**Figure 0-1:** Chemical structures of (*R*)-[<sup>11</sup>C]Me-NB1 and (*S*)-[<sup>11</sup>C]Me-NB1.

(*R*)-[<sup>11</sup>C]Me-NB1 exhibited high selectivity for the GluN2B-rich forebrain by *in vitro* and *ex vivo* autoradiography. *In vitro* and *in vivo* specificities were demonstrated by blockade studies with GluN2B-antagonists CP101,606 and eliprodil. In sharp contrast, (*S*)-[<sup>11</sup>C]Me-NB1 displayed a homogenous distribution pattern in autoradiograms of rodent brains and was found to predominantly bind to σ1 receptors, thereby raising awareness of the tightrope walk between GluN2B- and σ1 receptor-targeted PET imaging. Applying (*R*)-[<sup>11</sup>C]Me-NB1 to assess the receptor occupancy of the well-characterized GluN2B-antagonist CP101,606, we found that the clinically used dose of 200 ng/mL exhibited 80 % receptor occupancy and thus demonstrated the utility of (*R*)-[<sup>11</sup>C]Me-NB1 for *in vivo* drug occupancy studies. To pave the way for clinical translation, (*R*)-[<sup>11</sup>C]Me-NB1 was validated on post-mortem human brain tissue sections. The results show that (*R*)-[<sup>11</sup>C]Me-NB1 specifically binds to the GluN2B-subunit of the NMDA receptor in humans. Our research group has thus become the first group to successfully develop a useful carbon-11 labeled PET radioligand for imaging the GuN2B subunit of the ionotropic NMDA receptor.

Despite the promising results obtained with (*R*)-[<sup>11</sup>C]Me-NB1, a major drawback remains to be the short half-life of carbon-11 (physical half-life of 20.3 min), which confines the use of (*R*)-[<sup>11</sup>C]Me-NB1 to nuclear medicine facilities with an on-site cyclotron. To overcome this limitation, the development of a suitable fluorine-18 (physical half-life of 109.8 min) labeled analogue was envisioned. Chapter three of the present thesis describes the development of four fluorinated (*R*)-Me-NB1 derivatives designated (*R*)-OF-Me-NB1, (*S*)-OF-Me-NB1, (*R*)-PF-Me-NB1 and (*S*)-PF-Me-NB1 which were prepared in chemical yields of 41-49%. The four candidates (**Figure 0-2**) were initially labeled with carbon-11 and their *in vitro* performance characteristics assessed by *in vitro* autoradiography. Starting from the respective phenolic precursors, the four probes were obtained in radiochemical yields ranging from 7 – 36%

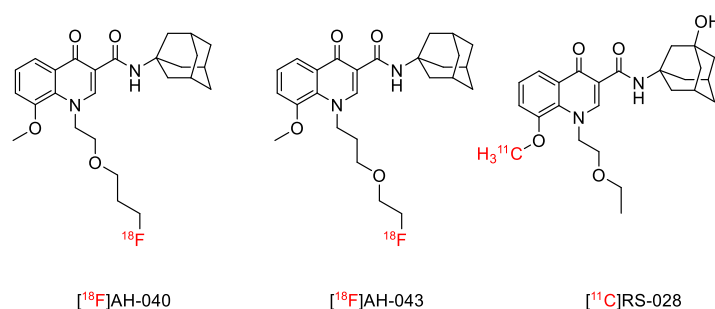
(decay-corrected), molar activities between 54 and 220 GBq/ $\mu\text{mol}$  and a radiochemical purity greater than 99%. Autoradiograms of rodent brain sections with the four radioligands revealed that (*S*)-[ $^{11}\text{C}$ ]OF-Me-NB1, (*R*)-[ $^{11}\text{C}$ ]PF-Me-NB1 and (*S*)-[ $^{11}\text{C}$ ]PF-Me-NB1 accumulated in virtually all brain regions and exhibited considerable  $\sigma_1$  receptor off-target binding. In contrast, (*R*)-[ $^{11}\text{C}$ ]OF-Me-NB1 showed high selectivity and specificity for the GluN2B-rich rat forebrain and revealed similar *in vitro* performance characteristics compared to the lead compound, (*R*)-[ $^{11}\text{C}$ ]Me-NB1. Consequently, (*R*)-OF-Me-NB1 was selected for radiofluorination and the respective aryl boronic ester precursor was synthesized, followed by chiral HPLC separation. (*R*)-[ $^{18}\text{F}$ ]OF-Me-NB1 (**Figure 0-2**) was obtained via copper-mediated radiofluorination in radiochemical yields of 13-25% and molar activities ranging from 61-168 GBq/ $\mu\text{mol}$ . The radiochemical purity was >99% and a  $\log D_{7.4}$  value of  $2.2 \pm 0.1$  ( $n=4$ ) was obtained using the shake-flask method.



**Figure 0-2:** Chemical structures of (*R*)-[ $^{11}\text{C}$ ]PF-Me-NB1, (*S*)-[ $^{11}\text{C}$ ]PF-Me-NB1, (*S*)-[ $^{11}\text{C}$ ]OF-Me-NB1, (*R*)-[ $^{11}\text{C}$ ]OF-Me-NB1 and (*R*)-[ $^{18}\text{F}$ ]OF-Me-NB1.

PET imaging and *ex vivo* biodistribution studies with (*R*)-[ $^{18}\text{F}$ ]OF-Me-NB1 showed high and specific accumulation in the GluN2B expressing brain regions such as the cortex, hippocampus, thalamus and the striatum upon injection into male Wistar rats. *Ex vivo* metabolite studies confirmed the presence of intact tracer in the brain. Receptor occupancy studies with CP101,606 revealed a  $D_{50}$ -value of 7.5  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  (iv. injected dose that exhibited 50% receptor occupancy), which was in the same range as the previously determined 5.2  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  with (*R*)-[ $^{11}\text{C}$ ]Me-NB1. Off-target binding to the  $\sigma_1$  receptor was excluded *in vivo* by PET imaging with  $\sigma_1$  receptor knock-out mice since no difference in the brain time-activity curves of (*R*)-[ $^{11}\text{C}$ ]Me-NB1 upon tail-vein injection into  $\sigma_1$  receptor knock-out mice and the respective wild-type animals was observed. In conclusion, (*R*)-[ $^{18}\text{F}$ ]OF-Me-NB1 revealed appropriate characteristics for imaging the GluN2B-containing NMDA receptor *in vitro* as well as *in vivo* and the longer physical half-life provides the opportunity for satellite distribution to nuclear facilities without an on-site cyclotron. We anticipate that (*R*)-[ $^{11}\text{C}$ ]Me-NB1 and the respective radiofluorinated analogue (*R*)-[ $^{18}\text{F}$ ]OF-Me-NB1 will be used to assess the role of GluN2B-carrying NMDA receptors in neuronal signaling cascades that trigger persisting neuroinflammation and will furthermore find application in receptor occupancy studies of GluN2B-antagonists.

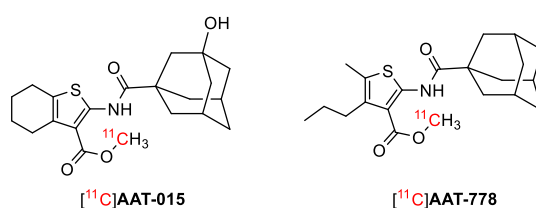
Chapter four of this thesis describes the efforts made to improve the oxoquinoline-based structure of CB2 PET radioligand [ $^{18}\text{F}$ ]-RS-126, which was developed in a recent doctoral thesis carried out in our group. The utility of [ $^{18}\text{F}$ ]-RS-126 for imaging the CB2 receptor was hampered by its metabolic instability and high lipophilicity. In order to address the issue of metabolic instability, two RS-126 derivatives, designated AH-040 and AH-043, with elongated fluoroalkyl side chains were synthesized in chemical yields of 24% and 33%, respectively. Their  $K_i$ -values towards the CB2 receptor were found to be 0.9 nM (AH-040) and 6.3 nM (AH-043), and comparable to the binding affinity of RS-126 ( $K_i = 1.2$  nM). The respective mesylate precursors were obtained in good chemical yields of 65-70%. [ $^{18}\text{F}$ ]AH-040 and [ $^{18}\text{F}$ ]AH-043 (**Figure 0-3**) were synthesized in low to moderate radiochemical yields of 4% and 11%, respectively (decay-corrected). Molar activities ranged between 65-75 GBq/ $\mu\text{mol}$  and the radiochemical purity was greater than 98% for both radioligands. Liver microsome stability studies showed that prolongation of the fluoroalkyl side chain resulted in improved metabolic stability towards mouse liver enzymes. However, the improved stability was accompanied by a significant reduction in selectivity over the cannabinoid type 1 (CB1) receptor. The selectivity index hCB2/hCB1 was 389 for AH-040, 222 for AH-043 and  $>10'000$  for RS-126. Due to the high CB1 density in the mammalian CNS, an excellent selectivity factor over CB1 is crucial for CB2 neuroimaging. Therefore, [ $^{18}\text{F}$ ]AH-040 and [ $^{18}\text{F}$ ]AH-043 were not further considered for animal studies. To address the issue of [ $^{18}\text{F}$ ]-RS-126 lipophilicity, we evaluated the utility of the newly developed [ $^{11}\text{C}$ ]RS-028, a potent and a more polar derivative of RS-126 derivative that bears a hydroxyl group in the adamantyl-moiety. In autoradiographic experiments on post-mortem human ALS spinal cord and control tissues, [ $^{11}\text{C}$ ]RS-028 outperformed [ $^{18}\text{F}$ ]-RS-126 by exhibiting a significant reduction in unspecific tissue binding *in vitro*. Applying [ $^{11}\text{C}$ ]RS-028, we were able to quantify the CB2 receptor upregulation in the ALS patient spinal cord tissue. Preliminary PET studies in male Wistar rats, however, showed only limited *in vivo* CB2-specificity in Wistar rats and therefore [ $^{11}\text{C}$ ]RS-028 was not pursued further for *in vivo* applications.



**Figure 0-3:** Chemical structures of [ $^{18}\text{F}$ ]AH-040, [ $^{18}\text{F}$ ]AH-043 and [ $^{11}\text{C}$ ]RS-028.

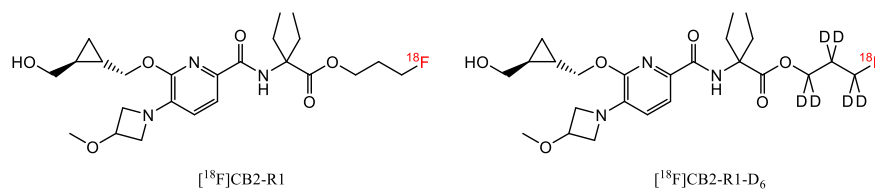
To include structural diversity, we evaluated a novel thiophene-based class of potent CB2 ligands as PET imaging probes in collaboration with the University of Siena as described in chapter five. Two candidates, designated AAT-015 and AAT-778, were synthesized using Gewald reaction conditions and

subsequent amide formation in chemical yields of 14% and 47%, respectively. The respective precursors for carbon-11 labeling were obtained by saponification in chemical yields of 69-75%. High binding affinities for CB2 and selectivities over CB1 were observed for AAT-015 ( $K_i$  hCB2 = 3.3 nM,  $K_i$  hCB1 = 1.0  $\mu$ M) and AAT-778 ( $K_i$  hCB2 = 4.3 nM,  $K_i$  hCB1 = 1.1  $\mu$ M). [ $^{11}$ C]AAT-015 and [ $^{11}$ C]AAT-778 (**Figure 0-4**) were obtained in 99% radiochemical purity. Radiochemical yields ranged from 12 to 37% and molar activities were between 96 - 449 GBq/ $\mu$ mol. Despite the promising *in vitro* binding affinities, [ $^{11}$ C]AAT-015 and [ $^{11}$ C]AAT-778 did not demonstrate any CB2 specificity in autoradiograms of the CB2-positive spleen.



**Figure 0-4:** Chemical structures of [ $^{11}$ C]AAT-015 and [ $^{11}$ C]AAT-778.

Chapter six of this thesis describes the structure-activity relationship of the pyridine-based derivatives of [ $^{11}$ C]RSR-056, which showed promising attributes for CB2 imaging in a recent doctoral thesis completed in our group. With the aim to develop a suitable fluorinated derivative, sixty new compounds were synthesized and tested for their binding affinities towards CB2 and CB1 in collaboration with Hoffmann-La Roche (Basel). With a subnanomolar affinity ( $K_i$ ) for CB2 of 0.7 nM and a remarkable selectivity factor of 14'286 over CB1, CB2-R1 emerged as the most promising candidate for further evaluation as a PET radioligand. [ $^{18}$ F]CB2-R1 (**Figure 0-5**) was obtained in molar activities ranging from 52 - 65 GBq/ $\mu$ mol and excellent radiochemical purity (> 99 %). The radiochemical yield was 9% (decay-corrected). Autoradiograms on Wistar rat spleen and brain tissue confirmed the high specificity and selectivity of [ $^{18}$ F]CB2-R1. Further *in vitro* autoradiography experiments with [ $^{18}$ F]CB2-R1 revealed that the radioligand was sensitive to the CB2-upregulation in human post-mortem ALS spinal cord tissue. *Ex vivo* biodistribution studies in Wistar rats were conducted and showed a specificity of 86% for the CB2-rich spleen. PET experiments revealed that target engagement in the spleen was reversible, as demonstrated by displacement experiments. No radiometabolites were detected in the brain samples at 15 and 45 min post injection, however, significant *in vivo* defluorination was observed, which could be circumvented by designing an analogue bearing a deuterated fluoroalkyl side chain ([ $^{18}$ F]CB2-R1- $d_6$ , **Figure 0-5**). In sharp contrast to [ $^{18}$ F]CB2-R1, [ $^{18}$ F]CB2-R1- $d_6$  did not accumulate in the skull and showed high spleen specificity as evidenced by PET imaging experiments. [ $^{18}$ F]CB2-R1- $d_6$  exhibited outstanding performance characteristics for imaging CB2 and is a promising candidate for clinical translation.



**Figure 0-5:** Chemical structures of  $[^{18}\text{F}]\text{CB2-R1}$  and  $[^{18}\text{F}]\text{CB2-R1-d}_6$ .

After several years of concerted research efforts, we have identified the first CB2 PET radioligand that shows promise for translation into the clinic. The clinical availability of such a CB2 PET radioligand would facilitate clinical decision-making and enable personalized patient treatment.



## Zusammenfassung

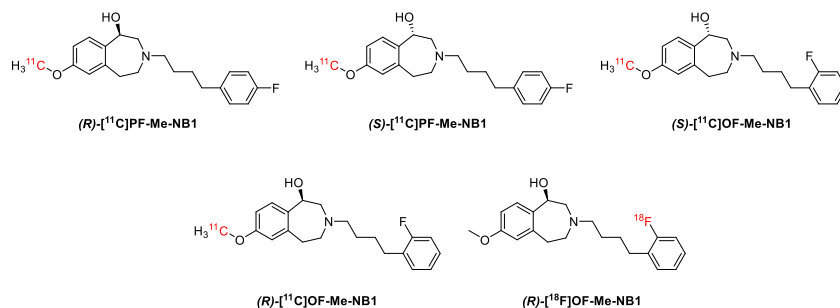
Entzündungsmediatoren werden bei Störungen des homöostatischen Gleichgewichtes im Zentralnervensystem freigesetzt und lösen neuroinflammatorische Signalkaskaden aus, welche im Verlauf von neurodegenerativen Erkrankungen eine essentielle Rolle spielen. Obwohl zahlreiche Entzündungsmediatoren und deren zugehörigen Rezeptoren bereits identifiziert wurden, bleibt die Aufklärung ihrer Funktionen in der Krankheitsentstehung durch die Komplexität von neuronalen Netzwerken eine erhebliche Herausforderung für Neurowissenschaftler. Folglich sind die Mechanismen, welche neurodegenerative Erkrankungen wie die Alzheimer-Krankheit (AD), Parkinson-Krankheit (PD), multiple Sklerose (MS) oder die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) beeinflussen, noch weitgehend ungeklärt und die Entwicklung von wirksamen Arzneimitteln bleibt anspruchsvoll. Die inhärente Irreversibilität von Nervenschäden schränkt eine effiziente Therapierbarkeit mit fortschreitendem Krankheitsverlauf massiv ein, weshalb eine Frühdiagnose und unmittelbare therapeutische Intervention für ein erfolgreiches Therapiemanagement massgebend sind. Um das Verständnis von neuroinflammatorischen Signalkaskaden zu optimieren und mit dem Streben nach verbesserten Möglichkeiten zur Frühdiagnostik von neurodegenerativen Erkrankungen, arbeitet unsere Forschungsgruppe an der Entwicklung von Positronen-Emissions-Tomographie (PET) Liganden für verschiedene biologische Zielmoleküle, welche bei Entzündungsprozessen im Zentralnervensystem nachweislich involviert sind. Neben der essenziellen Rolle von PET bei der klinischen Frühdiagnostik bietet die moderne Bildgebungstechnik die Möglichkeit, Rezeptor-Arzneimittel-Interaktionen zu untersuchen, was wiederum den Entwicklungsprozess innovativer Pharmazeutika beschleunigt und die häufig beobachteten Nebenwirkungen bei zentral wirkenden Präparaten minimiert. Aufgrund der weitreichenden Auswirkungen in einer Reihe von neurodegenerativen Erkrankungen wurden der GluN2B-beinhaltende *N*-Methyl-D-Aspartate (NMDA)-Rezeptor und der Cannabinoidrezeptor Typ 2 (CB2) als biologische Zielmoleküle zur Bildgebung mittels PET ausgewählt. Für beide genannten Rezeptoren gibt es bisher noch keinen erfolgreichen PET Radioliganden.

Kapitel eins der vorliegenden Arbeit gewährt einen generellen Überblick zu den glutaminergen und cannabinoiden Systemen und erörtert deren Rolle bei der Neurodegeneration. Das Prinzip der PET-Bildgebung wird erläutert und die neuesten Fortschritte in Bezug auf die Entwicklung von NMDA- und CB2-gerichteten PET Liganden werden zusammengefasst.

Kapitel zwei dieser Arbeit beschreibt die Evaluierung eines Enantiomerenpaares von  $^{11}\text{C}$ -markierten Liganden, genannt (*R*)- $^{11}\text{C}$ Me-NB1 und (*S*)- $^{11}\text{C}$ Me-NB1 (**Abbildung 0-1**), zur Visualisierung des GluN2B-beinhaltenden NMDA Rezeptors. In einer früheren Studie wurde die GluN2B-Spezifität von racemischem  $^{11}\text{C}$ Me-NB1 nachgewiesen, wobei der Radioligand eine exzellente Verteilungscharakteristik aufgewiesen hat. Me-NB1 zeigte eine hohe Bindungsaffinität von 5.4 nM zu humanem GluN2B, wobei die auf einem Benzazepine-basierende Struktur von Me-NB1 ein chirales Zentrum innerhalb des Pharmakophors aufweist. Um die Leistungseigenschaften der beiden Enantiomere



Trotz der vielversprechenden Resultate mit (*R*)-[<sup>11</sup>C]Me-NB1 bleibt die kurze physikalische Halbwertszeit, bedingt durch die <sup>11</sup>C-Markierung (physikalische Halbwertszeit von Kohlenstoff-11: 20.3 Minuten), ein entscheidender Limitierungsfaktor, welcher ein Zyklotron zur Herstellung des Radioliganden vor Ort zwingend voraussetzt. Um eine breitere Anwendung und den Versand des Radioliganden an Nuklearmedizin-Einrichtungen ohne Zyklotron vor Ort zu ermöglichen hat unsere Gruppe die Entwicklung eines <sup>18</sup>F-markierten Analogons von (*R*)-[<sup>11</sup>C]Me-NB1 angestrebt (physikalische Halbwertszeit von Fluor-18: 109.8 Minuten). Kapitel drei der vorliegenden Arbeit beschreibt die Entwicklung von vier fluorierten (*R*)-[<sup>11</sup>C]Me-NB1-Derivaten mit den Codenamen (*R*)-OF-Me-NB1, (*S*)-OF-Me-NB1, (*R*)-PF-Me-NB1 und (*S*)-PF-Me-NB1, welche in chemischen Ausbeuten von 41-49% synthetisiert wurden. Die vier Kandidaten (**Abbildung 0-2**) wurden zunächst mit Kohlestoff-11 markiert, um eine initiale Machbarkeitsstudie mittels *in vitro* Autoradiographie zu ermöglichen mit dem Ziel, die beste Struktur für die aufwendige Radiofluorierung zu wählen. Ausgehend von den phenolischen Vorstufen wurden die vier <sup>11</sup>C-markierten Liganden in radiochemischen Ausbeuten von 7-36% (zerfallskorrigiert), spezifischen Aktivitäten zwischen 54 und 220 GBq/μmol sowie einer radiochemischen Reinheit > 99% synthetisiert. Autoradiogramme von Mäuse- und Rattenhirnschnitten haben ergeben, dass (*S*)-[<sup>11</sup>C]OF-Me-NB1, (*R*)-[<sup>11</sup>C]PF-Me-NB1 und (*S*)-[<sup>11</sup>C]PF-Me-NB1 sich in praktisch allen Hirnregionen angereichert haben und signifikante Bindung zum σ<sub>1</sub>-Rezeptor aufgewiesen haben. Im Gegensatz dazu hat (*R*)-[<sup>11</sup>C]OF-Me-NB1 eine hohe Selektivität für die GluN2B-exprimierenden Hirnregionen gezeigt und erwies sich als ebenbürtiger Radioligand im Vergleich zur Leitstruktur von (*R*)-[<sup>11</sup>C]Me-NB1. Folglich wurde (*R*)-OF-Me-NB1 gewählt für die Radiofluorierung und der entsprechende Arylboronsäureester-Vorläufer wurde synthetisiert, gefolgt von einer chiralen HPLC-Trennung. (*R*)-[<sup>18</sup>F]OF-Me-NB1 (**Abbildung 0-2**) wurde mit Hilfe der Kupfer-vermittelten Radiofluorierung in radiochemischen Ausbeuten von 13-25% und spezifischen Aktivitäten zwischen 61-168 GBq/μmol erfolgreich synthetisiert. Die radiochemische Reinheit war > 99% und ein log*D*<sub>7,4</sub> Wert von 2.2 ± 0.1 (n=4) wurde mit Hilfe der Shake-Flask-Methode bestimmt.

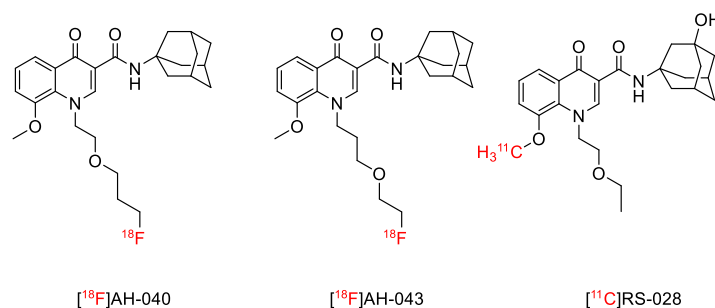


**Abbildung 0-2:** Chemische Strukturen von (*R*)-[<sup>11</sup>C]PF-Me-NB1, (*S*)-[<sup>11</sup>C]PF-Me-NB1, (*S*)-[<sup>11</sup>C]OF-Me-NB1, (*R*)-[<sup>11</sup>C]OF-Me-NB1 und (*R*)-[<sup>18</sup>F]OF-Me-NB1.

PET Bildgebungs- und *ex vivo* Bioverteilungsexperimente mit (*R*)-[<sup>18</sup>F]OF-Me-NB1 haben eine hohe spezifische Anreicherung des Radioliganden in den GluN2B-exprimierenden Hirnregionen wie dem Cortex, Thalamus, Hippocampus und den Striatum nach Injektion in männliche Wistar-Ratten gezeigt, wobei durch *ex vivo* Metabolitenstudien die Identität des Radioliganden im Gehirn bestätigt werden konnte. Rezeptorbelegungsstudien mit CP101,606 ergaben einen D<sub>50</sub>-Wert von 7.5 µmol/kg (intravenös injizierte Dosis, welche zu einem Rezeptorbelegungsgrad von 50% führt), was vergleichbar war mit dem D<sub>50</sub>-Wert von 5.2 µmol/kg, welcher zuvor mit (*R*)-[<sup>11</sup>C]Me-NB1 bestimmt wurde. Off-Target Bindung zum σ1-Rezeptor wurde durch *in vivo* PET Bildgebungsstudien mit σ1-Rezeptor-Knockout-Mäusen ausgeschlossen, denn es wurde kein Unterschied in den Zeit-Aktivitäts-Kurven zwischen σ1-Rezeptor-Knockout-Mäusen und den entsprechenden Wildtyp-Tieren festgestellt. Zusammenfassend hat (*R*)-[<sup>18</sup>F]OF-Me-NB1 geeignete Eigenschaften zur *in vitro* und *in vivo* Visualisierung des GluN2B-enthaltenden NMDA Rezeptors gezeigt und die grössere physikalische Halbwertszeit erlaubt es, den radiofluorierten Liganden an Nuklearmedizin-Einrichtungen ohne Zyklotron vor Ort zu liefern. Wir rechnen damit, dass (*R*)-[<sup>11</sup>C]Me-NB1 und deren radiofluoriertes Analogon (*R*)-[<sup>18</sup>F]OF-Me-NB1 künftig Licht in die Rolle des GluN2B-enthaltenden NMDA Rezeptors bei neuronalen Signalkaskaden bringen, welche zur anhaltenden Neuroinflammation führen. Weiterhin erwarten wir, dass das Potential der neuen PET Radioliganden bei der Entwicklung von GluN2B-Antagonisten für therapeutische Zwecke mittels Rezeptorbelegungsstudien ausgeschöpft werden wird.

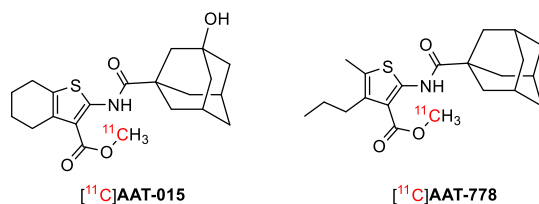
Kapitel vier der vorliegenden Arbeit beschreibt die Bemühungen zur Optimierung des Oxochinolin-basierten CB2 PET Radioliganden [<sup>18</sup>F]-RS-126, welcher in einer kürzlich abgeschlossenen Doktorarbeit in unserer Forschungsgruppe entwickelt wurde. Die Verwendung von [<sup>18</sup>F]-RS-126 zur Visualisierung des CB2 Rezeptors wurde beeinträchtigt durch die metabolische Instabilität und die hohe Lipophilie des Radioliganden. Um die Problematik der metabolischen Instabilität anzugehen, wurden zwei neue RS-126-Derivate (AH-040 und AH-043) mit verlängerter Fluoroalkyl-Seitenkette in chemischer Ausbeute von 24% bzw. 33% synthetisiert. Deren K<sub>i</sub>-Werte zum CB2 Rezeptor waren mit 0.9 nM (AH-040) and 6.3 nM (AH-043) vergleichbar mit demjenigen von RS-126 (K<sub>i</sub> = 1.2 nM). Die zugehörigen mesylierten Vorläufer für die Radiofluorierung wurden in chemischen Ausbeuten von 65-70% erhalten. [<sup>18</sup>F]AH-040 and [<sup>18</sup>F]AH-043 (**Abbildung 0-3**) wurden in radiochemischen Ausbeuten von 4% bzw. 11% (zerfallskorrigiert) synthetisiert und die spezifische Aktivität reichte von 65-75 GBq/µmol. Die radiochemische Reinheit war grösser als 98% für beide Radioliganden. Stabilitätsstudien mit Lebermikrosomen haben ergeben, dass die Verlängerung der Seitenkette zu einer verbesserten Stabilität gegenüber Maus-Leberenzymen führte. Allerdings ist mit der verbesserten Stabilität gleichzeitig eine signifikante Reduktion der Selektivität gegenüber dem Cannabinoidrezeptor Typ 1 (CB1) einhergegangen. Der Selektivitätsindex (hCB2/hCB1) war 389 für AH-040, 222 für AH-043 und >10'000 für RS-126. Aufgrund der hohen Dichte an CB1 Rezeptoren im Zentralnervensystem ist ein exzellenter Selektivitätsfaktor entscheidend für eine erfolgreiche Visualisierung des CB2

Rezeptors. Folglich wurden [ $^{18}\text{F}$ ]AH-040 und [ $^{18}\text{F}$ ]AH-043 nicht mehr in Tierversuchen weiterentwickelt. Um die Problematik der hohen Lipophilie zu umgehen, haben wir das Potential eines neu entwickelten, potenten RS-126-Derivates ([ $^{11}\text{C}$ ]RS-028) mit reduzierter Lipophilie, bedingt durch die Einführung einer Hydroxyl-Gruppe am Adamantyl-Strukturelement, evaluiert. Autoradiographische Studien mit humanem post-mortem Rückenmarksgewebe von ALS Patienten und gesundem Kontrollgewebe haben gezeigt, dass [ $^{11}\text{C}$ ]RS-028 eine signifikante Reduktion der unspezifischen Bindung im Vergleich zu [ $^{18}\text{F}$ ]RS-126 aufwies und somit die Quantifizierung der CB2 Rezeptor-Aufregulierung im Patientengewebe ermöglichte. Erste *in vivo* Experimente mit [ $^{11}\text{C}$ ]RS-028 in männlichen Wistar-Ratten liessen allerdings darauf schliessen, dass *in vivo* nur eine bedingte CB2-Spezifität vorhanden war, weshalb [ $^{11}\text{C}$ ]RS-028 nicht mehr in Tierversuchen weiterverfolgt wurde.



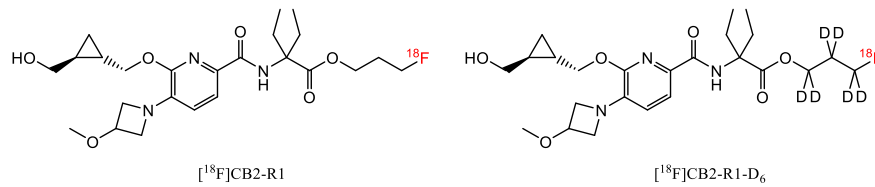
**Abbildung 0-3:** Chemische Strukturen von [ $^{18}\text{F}$ ]AH-040, [ $^{18}\text{F}$ ]AH-043 und [ $^{11}\text{C}$ ]RS-028.

Um strukturelle Vielfalt einzubringen, wurde eine neue Klasse von Thiophen-basierten, potenten CB2 Liganden als PET Radioliganden in Kollaboration mit der Universität Siena evaluiert, was in Kapitel fünf dieser Arbeit erörtert wird. Zwei potenzielle CB2 Liganden mit den Codenamen AAT-015 und AAT-778 wurden mittels Gewalt-Reaktion und anschliessender Amid-Kopplung in chemischer Ausbeute von 14% bzw. 47% synthetisiert. Die entsprechenden phenolischen Vorläufer für die  $^{11}\text{C}$ -Markierung wurden durch Verseifung in chemischer Ausbeute von 69-75% erhalten. Hohe Bindungsaffinitäten zum CB2 Rezeptor in Kombination mit einer markanten Selektivität über den CB1 Rezeptor wurden für beide Liganden gemessen (AAT-015,  $K_i$  hCB2 = 3.3 nM,  $K_i$  hCB1 = 1.0  $\mu\text{M}$  und AAT-778,  $K_i$  hCB2 = 4.3 nM,  $K_i$  hCB1 = 1.1  $\mu\text{M}$ ). Die radiomarkierten Analoga [ $^{11}\text{C}$ ]AAT-015 und [ $^{11}\text{C}$ ]AAT-778 (**Abbildung 0-4**) wurden in exzellenter radiochemischer Reinheit von > 99% synthetisiert, wobei die radiochemische Ausbeute bei 12 bis 37% und die spezifische Aktivität zwischen 96 und 449 GBq/ $\mu\text{mol}$  lag. Trotz der vielversprechenden *in vitro* Bindungsaffinitäten konnte weder bei [ $^{11}\text{C}$ ]AAT-015 noch [ $^{11}\text{C}$ ]AAT-778 eine Spezifität zum CB2 Rezeptor mittels Autoradiographie der CB2-positiven Rattenmilz festgestellt werden.



**Abbildung 0-4:** Chemische Strukturen von  $[^{11}\text{C}]\text{AAT-015}$  und  $[^{11}\text{C}]\text{AAT-778}$ .

In Kapitel sechs der vorliegenden Arbeit wird die Struktur-Aktivitäts-Beziehung von Pyridin-basierten  $[^{11}\text{C}]\text{RSR-056}$ -Derivaten beschrieben.  $[^{11}\text{C}]\text{RSR-056}$  ist ein vielversprechender CB2 PET Radioligand, der kürzlich im Rahmen einer bereits abgeschlossenen Doktorarbeit entwickelt wurde. Mit der Bestrebung, ein radiofluoriertes Analogon mit grösserer Halbwertszeit zu entwickeln, wurden insgesamt 60 neue, fluorierte Derivate in Zusammenarbeit mit Hofmann-La Roche (Basel) synthetisiert und ihre Bindungsaffinitäten zum CB2 bzw. CB1 Rezeptor wurden experimentell bestimmt. Mit einer subnanomolaren Bindungsaffinität von 0.7 nM ( $K_i$  hCB2) und einem beeindruckenden Selektivitätsfaktor von 14'286 gegenüber hCB1, hat sich die Struktur vom Liganden CB2-R1 deutlich von den anderen Derivaten abgehoben, weshalb sie ausgewählt wurde zur Evaluierung als PET Radioligand.  $[^{18}\text{F}]\text{CB2-R1}$  (**Abbildung 0-5**) wurde erfolgreich synthetisiert mit einer radiochemischen Ausbeute von 9% (zerfallskorrigiert), einer spezifischen Aktivität von 52 - 65 GBq/ $\mu\text{mol}$  und einer radiochemischen Reinheit > 99%. Autoradiogramme der Wistar Rattenmilz und des Rattenhirnes bestätigten die hohe Spezifität und Selektivität des Radioliganden für den CB2 Rezeptor. Weiterhin wurde mit Hilfe von  $[^{18}\text{F}]\text{CB2-R1}$  die CB2-Aufregulierung im Rückenmark von ALS Patienten mittels *in vitro* Autoradiographie visuell dargestellt. Ex vivo Biodistributions-Experimente zeigten eine 86-prozentige Spezifität zur CB2-positiven Rattenmilz, wobei wir durch PET Bildgebungsexperimente die Reversibilität der Radioligand-Bindung zum CB2 Rezeptor *in vivo* mittels Displacement zeigen konnten. Es wurden keine Radiometaboliten im Rattenhirn 15 und 45 Minuten nach der Injektion des Radioliganden gefunden. Allerdings wurde eine beachtliche Menge an *in vivo* Defluorierung beobachtet, welche zur Anreicherung von radioaktivem Fluor im Schädel führte und die Auswertung der Bilder massiv beeinträchtigte. Diese Problematik konnte beseitigt werden durch die Substitution aller Wasserstoff-Atome in der Fluoroalkyl-Seitenkette von  $[^{18}\text{F}]\text{CB2-R1}$  durch Deuterium-Atome ( $[^{18}\text{F}]\text{CB2-R1-d}_6$ , **Abbildung 0-5**). Im Gegensatz zu  $[^{18}\text{F}]\text{CB2-R1}$  zeigte die deuterierte Form ( $[^{18}\text{F}]\text{CB2-R1-d}_6$ ) keine Anreicherung von Radioaktivität im Schädel, wobei die hohe Spezifität zur CB2-positiven Milz erhalten geblieben ist. Insgesamt zeigte  $[^{18}\text{F}]\text{CB2-R1-d}_6$  ausgezeichnete Eigenschaften zur Sichtbarmachung des CB2 Rezeptors sowohl *in vitro* als auch *in vivo* und ist ein vielversprechender Kandidat, welcher für die klinische Verwendung vorgeschlagen wird.



**Abbildung 0-5:** Chemische Strukturen von  $[^{18}\text{F}]\text{CB2-R1}$  und  $[^{18}\text{F}]\text{CB2-R1-d}_6$ .

Nach vielen Jahren präklinischer Forschung haben wir nun den ersten CB2 PET Radioliganden entwickelt, welcher für die Umsetzung in der klinischen Praxis ein vielversprechendes Profil besitzt. Die Verfügbarkeit eines solchen Liganden würde die Entscheidungsfindung der Neurologen vereinfachen und neue Möglichkeiten zur personalisierten Therapie der Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen bieten.