

Silicon-based building blocks for the direct F-18 labeling of biomolecules for pet imaging

Doctoral Thesis

Author(s):

Dialer, Lukas Olivier

Publication date:

2013

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-009974581>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

DISS. ETH NO. 21430

**SILICON-BASED BUILDING BLOCKS FOR THE DIRECT F-18 LABELING OF BIOMOLECULES
FOR PET IMAGING**

A dissertation submitted to
ETH ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by
LUKAS OLIVIER DIALER
MSc ETH Chemistry, ETH Zurich

Date of birth

15.10.1984

citizen of

Zurich ZH and Guggisberg BE, Switzerland
and Austria

accepted on the recommendation of
Professor Dr. Simon M. Ametamey, examiner
Professor Dr. Roger Schibli, co-examiner

2013

Summary

Positron emission tomography (PET) is a non-invasive nuclear medicine technique for the visualization of biochemical and physiological processes *in vivo* at the molecular or cellular level. It is a clinically established tool for diagnosing disease and monitoring therapeutic response. Radiolabeled biomolecules such as proteins and peptides have potential as molecular imaging probes due to their specific targeting properties. Fluorine-18 (^{18}F) is the most often used positron emitting radionuclide due to its excellent physical imaging properties.

Peptide labeling with ^{18}F usually requires multi-reaction steps and is, therefore, laborious and time-consuming, which is not optimal with regard to the relatively short half-life of ^{18}F (110 min). Silicon containing moieties attached to peptides allow for more efficient and direct ^{18}F -labeling as a consequence of the high affinity of silicon for fluorine. The *di-tert*-butylphenylsilane building block is currently the only silicon-based building block that has been efficiently used, due to its high hydrolytic stability. However, its inherent high lipophilicity influences the pharmacokinetic profile of radiotracers that they are cleared predominantly via the hepatobiliary pathway, an effect sometimes not optimal for an imaging agent. A major aim of this thesis was therefore to develop a new silicon-based building block, which is hydrolytically stable and far less lipophilic than the more often used *di-tert*-butylphenylsilane building block. The new more hydrophilic and hydrolytically stable building block should then be endowed with a pharmacokinetic profile that shifts the clearance of silicon containing radiotracers from hepatobiliary to renal pathway.

In order to accomplish the abovementioned goal, a series of more hydrophilic *di-tert*-butylfluorosilanes were designed and density functional theory (DFT) calculations were used to predict the hydrolytic stability of the silicon–fluorine (Si–F) bond. Previous studies have established that compounds with a $\Delta_{(\text{Si-F})}$ value $\geq 0.19 \text{ \AA}$ tend to be unstable in aqueous solutions while compounds with a $\Delta_{(\text{Si-F})}$ value $< 0.19 \text{ \AA}$ would be hydrolytically stable. The DFT calculations identified three fluorosilane compounds as hydrolytically stable ($\Delta_{(\text{Si-F})} < 0.19 \text{ \AA}$) and nineteen compounds as hydrolytically unstable ($\Delta_{(\text{Si-F})} \geq 0.19 \text{ \AA}$). In order to verify the theoretical calculations, 2-(*di-tert*-butylfluorosilyl)acetamide ($\Delta_{(\text{Si-F})} = 0.18 \text{ \AA}$), 2-(*di-tert*-

butylfluorosilyl)ethanol ($\Delta_{\text{Si-F}} = 0.21 \text{ \AA}$) and 2-amino-3-(1-(2-(di-*tert*-butylfluorosilyl)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propanoic acid ($\Delta_{\text{Si-F}} = 0.21 \text{ \AA}$) were synthesized via multi-step reaction sequences and examined in hydrolytic stability studies. Contrary to our expectations, the silicon-carbon bond of the *N*-benzylated analog of 2-(di-*tert*-butylfluorosilyl)acetamide was rapidly hydrolyzed. It is speculated that the silicon-carbon bond was destabilized by the electron withdrawing carbonyl and fluorine functionalities. The predicted hydrolytic instability of the Si-F bond of 2-(di-*tert*-butylfluorosilyl)ethanol and 2-amino-3-(1-(2-(di-*tert*-butylfluorosilyl)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propanoic acid could, however, be confirmed experimentally as their hydrolytic half-lives were below 16 h, half-lives not ideal for PET imaging. Future DFT calculations to predict the hydrolytic stability should therefore not only focus on the Si-F bond, but also on the silicon-carbon bonds.

An alternative to developing more hydrophilic silicon building blocks is the introduction of hydrophilic linkers between the target molecule and the established di-*tert*-butylphenylsilane building block to offset the high hepatobiliary uptake. The results of such a promising strategy are described in Chapter 2. A previously ^{18}F -labeled silicon containing peptide was synthetically modified by inserting two L-cysteic acids and tartaric acid between the peptide and the di-*tert*-butylphenylsilane building block. The resulting bombesin derivatives were labeled with ^{18}F and purified by HPLC to afford the final products in radiochemical yields of 1–2% with specific radioactivities of 35–70 GBq/ μmol . As demonstrated in a mouse model of prostate cancer, the overall enhanced hydrophilicity of the ^{18}F -labeled silicon-containing peptides led to an improved pharmacokinetic profile and to an enhanced tumor uptake (1.8–3.5%ID/g) compared to the previously ^{18}F -labeled and less hydrophilic silicon containing peptide (tumor uptake: 0.4%ID/g). The strategy to incorporate hydrophilic linkers is a promising approach as demonstrated with the bombesin derivatives, but greater improvements can be achieved in future studies, if a carbohydrate linker would be incorporated between the di-*tert*-butylphenylsilane building block and the peptide sequence or, if a hydrolytically stable silicon-based building block with significantly reduced lipophilicity would become available.

Chapter 3 describes the applicability of the direct one-step ^{18}F -labeling of exendin, a forty amino acid macromolecule, using the di-*tert*-butylphenylsilane building block. It was hypothesized that the high kidney uptake of exendin derivatives labeled with radiometals (*e.g.* $^{99\text{m}}\text{Tc}$ and ^{111}In) could be reduced by incorporating the rather lipophilic di-*tert*-butylphenylsilane building block. In order to verify this, a silicon containing exendin-4 analog was labeled with ^{18}F . A maximal ^{18}F -incorporation yield of 6% was achieved. HPLC purification afforded the final compound in a radiochemical yield of 1.0–1.5% with a specific radioactivity of 12–16 GBq/ μmol . The results of the *in vivo* studies showed the expected *in vivo* behaviour: The uptake in the kidneys was in the range between 30 to 50%ID/g which was dramatically lower compared to the kidney uptake of radiometal labeled compounds, which is normally much higher than 100%ID/g. The hypothesis that the incorporation of the di-*tert*-butylphenylsilane building block

in exendin-4 would shift renal to hepatobiliary clearance of the new ^{18}F -silyl exendin-4 was thus confirmed. The same strategy could therefore also be applied to improve the pharmacokinetic profile of minigastrin analogs or other biomolecules, which suffer from high kidney uptake.

Finally, we come to the conclusion that ^{18}F -labeling using silicon-fluorine chemistry is an attractive approach to label peptides and macromolecules due to its simplicity. Much, however, remains to be accomplished for the development of a more hydrophilic and hydrolytically stable silicon-based building block. Such a building block, without a negative influence on the pharmacokinetic profile of radiotracers, could make the direct and the site-specific ^{18}F -labeling of biomolecules using silicon-fluorine chemistry a routine procedure.

Zusammenfassung

Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) ist ein nicht-invasives Verfahren der Nuklearmedizin für die bildliche Darstellung biochemischer und physiologischer Prozesse *in vivo* auf molekularer oder zellulärer Ebene. Sie ist eine klinisch etablierte Methode, um Krankheiten zu diagnostizieren und um den Verlauf einer Therapie zu überwachen. Dabei werden radioaktiv markierte Moleküle eingesetzt, wovon Biomoleküle wie Proteine und Peptide sich aufgrund ihrer spezifischen Trägereigenschaften gut als molekulare Bildgebungssubstanz eignen. Unter den Positron-emittierenden Radionukliden ist Fluor-18 (^{18}F) das meist eingesetzte aufgrund seiner exzellenten physikalischen Eigenschaften für die Bildgebung.

Die Peptidmarkierung mit ^{18}F schliesst normalerweise mehrere Reaktionsschritte mit ein und ist daher arbeitsintensiv und zeitaufwändig. Diese Bedingungen sollten jedoch vermieden werden in Anbetracht der relativ kurzen Halbwertszeit von ^{18}F (110 min). Peptidreste, die Silicium enthalten, ermöglichen eine direkte und effizientere ^{18}F -Markierung aufgrund der hohen Affinität von Silicium zu Fluor. Wegen seiner hohen, hydrolytischen Stabilität ist der Di-*tert*-butylphenylsilan Baustein zurzeit der einzige, Silicium-basierte Baustein, der hierfür effizient eingesetzt wurde. Seine inherent hohe Lipophilie hat aber einen Einfluss auf das pharmakokinetische Profil der radioaktiven Marker, welche dadurch vornehmlich ins hepatobiliäre System aufgenommen werden; ein manchmal nicht optimaler Effekt für einen Radiotracer. Ein Hauptziel dieser Arbeit war es daher einen neuen Silicium-basierten Baustein zu entwickeln, der hydrolytisch stabil und weit weniger lipophil ist als der öfters eingesetzte Di-*tert*-butylphenylsilan Baustein. Der neue, hydrophilere und hydrolytisch stabile Baustein soll demzufolge das pharmakokinetische Profil des Tracer beeinflussen, sodass sich die Ausscheidung der siliciumhaltigen Radiomarker von der hepatobiliären zur renalen verlagert.

Um das oben erwähnte Ziel zu erreichen, wurde eine Serie von hydrophilere Di-*tert*-butylfluorsilanen entworfen und Berechnungen mittels Dichtefunktionaltheorie (DFT) wurden für die Vorhersage der hydrolytischen Stabilität der Silicium-Fluor Bindung verwendet. Vorgängige Studien postulierten, dass Verbindungen mit einem $\Delta_{(\text{Si-F})}$ Wert $\geq 0.19 \text{ \AA}$ dazu tendieren, in wässrigen Lösungen instabil zu sein, während Verbindungen mit ein $\Delta_{(\text{Si-F})}$ Wert $<$

0.19 Å hydrolytisch stabil sind. Die DFT Berechnungen identifizierten drei Fluorosilan-Verbindungen als hydrolytisch stabil und neunzehn Verbindungen als hydrolytisch instabil. Um die theoretischen Berechnungen zu verifizieren, wurden 2-(Di-*tert*-butylfluorosilyl)acetamid ($\Delta_{\text{Si-F}} = 0.18 \text{ \AA}$), 2-(Di-*tert*-butylfluorosilyl)ethanol ($\Delta_{\text{Si-F}} = 0.21 \text{ \AA}$) und 2-Amino-3-(1-(2-(di-*tert*-butylfluorosilyl)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propansäure ($\Delta_{\text{Si-F}} = 0.21 \text{ \AA}$) in mehreren Stufen synthetisiert und auf ihre hydrolytische Stabilität hin untersucht. Entgegen unseren Erwartungen wurde die Silicium-Kohlenstoff Bindung des *N*-benzylierten Analog von 2-(di-*tert*-butylfluorosilyl)acetamid hydrolysiert. Es wird spekuliert, dass die Silicium-Kohlenstoff Bindung durch die Carbonyl- und Fluorfunctionalitäten destabilisiert wurde. Die vorausgesagte, hydrolytische Instabilität der Si-F Bindung von 2-(Di-*tert*-butylfluorosilyl)ethanol und 2-Amino-3-(1-(2-(di-*tert*-butylfluorosilyl)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propansäure konnte hingegen experimentell bestätigt werden: Die hydrolytischen Halbwertszeiten betragen jeweils unter 16 h, was für PET Studien eine zu kurze Zeit und daher nicht ideal ist. Künftige DFT Berechnungen für die Vorhersage der hydrolytischen Stabilität sollten sich daher nicht nur auf die Si-F Bindung fokussieren, sondern auch auf die Silicium-Kohlenstoff Bindungen.

Ein alternativer Ansatz, um der hohen hepatobiliären Aufnahme entgegenzuwirken, ist nebst der Entwicklung von hydrophileren Silicium Bausteinen die Einführung von hydrophilen Verknüpfungssequenzen in die Schnittstelle zwischen rezeptor-affinen Peptidsequenz und etablierten Di-*tert*-butylphenylsilan Baustein. Die Resultate dieser vielversprechender Strategie sind im Kapitel 2 beschrieben. Ein früher ^{18}F markiertes siliciumhaltiges Peptid wurde synthetisch modifiziert, indem zwei L-Cysteinsäuren und Weinsäure zwischen das Peptid und dem Di-*tert*-butylphenylsilan Baustein synthetisch eingebaut wurden. Die daraus resultierenden Bombesin Derivate wurden mit ^{18}F markiert und mittels HPLC gereinigt. Die Endprodukte wurden in radiochemischer Ausbeute von 1-2% und mit einer spezifischen Radioaktivität von 35–70 GBq/ μmol erhalten. In einer Versuchsreihe mit Mäusen, die einen Prostatakrebs in sich trugen, wurde gezeigt, dass die erhöhte Gesamthydrophilie der ^{18}F -markierten Silicium-Peptide zu einem verbesserten pharmakokinetischem Profil führte: Die Aufnahme im Tumor (1.8-3.5%ID/g) war höher verglichen mit dem früher ^{18}F -markierten und weniger hydrophileren Silicium-Peptid (0.4%ID/g). Die Strategie, hydrophile Verknüpfungssequenzen einzubauen, ist daher ein aussichtsreicher Ansatz, wie anhand der Bombesin Derivate gezeigt wurde. Künftige Studien könnten sogar noch bessere Resultate erzielen, wenn Kohlenhydratlinker zwischen dem Di-*tert*-butylphenylsilan Baustein und der Peptidsequenz eingefügt oder wenn ein hydrolytisch stabiler silicium-haltiger Baustein von signifikant geringerer Lipophilie erhältlich würde.

Das dritte Kapitel beschreibt die Anwendbarkeit der direkten ^{18}F -Markierung in einem Syntheseschritt mittels Di-*tert*-butylphenylsilan Baustein anhand von Exendin, ein Makromolekül von vierzig Aminosäuren. Dabei wurde angenommen, dass die hohe Nierenaufnahme von Exendinderivaten, die mit radioaktiven Metallen (z.Bsp. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ und ^{111}In)

markiert wurden, reduziert werden könnte, indem man den sehr lipophilen Di-*tert*-butylphenylsilane Baustein an Exendin koppelt. Um diese Hypothese zu verifizieren, wurde ein siliciumhaltiges Exendin-4 Analog mit ^{18}F markiert, wobei eine ^{18}F -Markierungseffizienz von bis zu 6% erzielt wurde. Die Reinigung mittels HPLC brachte das Endprodukt in einer radiochemischen Ausbeute von 1.0-1.5% und mit einer spezifischen Radioaktivität von 12-16 GBq/ μmol hervor. Die Resultate der *in vivo* Studien zeigten das erwartete *in vivo* Verhalten: Die Aufnahme in den Nieren war im Bereich zwischen 30 und 50%ID/g, was klar tiefer war im Vergleich zu mit Radiometallen markierten Verbindungen, deren Aufnahme in den Nieren typischerweise viel höher als 100%ID/g ist. Die Hypothese, dass die Einführung des Di-*tert*-butylphenylsilan Baustein in Exendin-4 zu einer Verschiebung der renalen zur hepatobiliären Ausscheidung des neuen, ^{18}F -silyl Exendin-4 führen würde, konnte also bestätigt werden. Dieselbe Strategie könnte daher auch angewandt werden, um das pharmakokinetische Profil von Minigastrin Analoga oder anderen Biomolekülen, die unter hoher Nierenaufnahme leiden, zu verbessern.

Zum Schluss halten wir fest, dass die ^{18}F -Markierung mittels Silicium-Fluor Chemie aufgrund ihrer Einfachheit ein attraktives Verfahren ist, um Peptide und Makromoleküle zu markieren. Vieles bleibt indes noch zu bewältigen, um einen hydrophilieren und hydrolytisch stabilen Silicium-basierten Baustein zu entwickeln. Solch ein Baustein, der keinen negativen Einfluss auch das pharmakokinetische Profil von Radiotracer hat, könnte die direkte und chemospezifische ^{18}F -Markierung von Biomolekülen mittels Silicium-Fluor Chemie zu einer Routine-Prozedur werden lassen.