

Diss. ETH No.: 15450

**Development of novel nucleoside analogues for the
PET imaging of herpes simplex virus type 1 thymidine
kinase gene expression**

A thesis submitted to the
Swiss Federal Institute of Technology Zurich
for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by

Anass Johayem

Pharmacist (Dipl. Pharm. ETH)
ETH Zürich

born October 13th, 1970
citizen of Souida, Syria

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. P.A. Schubiger, examiner
Prof. Dr. L. Scapozza, co-examiner
PD Dr. S.M. Ametamey, co-examiner

2004

SUMMARY

Gene therapy offers a promising new treatment modality for a variety of inherited and acquired disorders. All of the gene therapy approaches are based on the common strategy to use gene delivery to effect production of a therapeutic protein in a target tissue. For application in humans as well as for research purposes, it is critically important to have a noninvasive imaging modality such as positron emission tomography (PET), which offers the possibility of monitoring the location, magnitude, and duration over time of the expression of delivered therapeutic genes. One of the most promising approaches in imaging gene expression uses the gene of the viral enzyme herpes simplex virus thymidine kinase (HSV1 *tk*) as a reporter gene in combination with an appropriate reporter probe. Two main categories of substrates have been investigated as PET reporter probes for imaging HSV1 *tk* expression: uracil analogues labeled with iodine-124 and acycloguanosine analogues labeled with fluorine-18. These two classes of substrates are selectively phosphorylated by HSV1 TK to their monophosphates and metabolically trapped in transfected cells.

Our investigations were prompted by the need to develop PET imaging agents that lack the disadvantages of already existing reporter probes. These disadvantages include cytotoxicity, unfavorable pharmacokinetics and the so-called bystander effect. In order to define the advantages and disadvantages for each reporter probe, studies that directly compare the new substrates with already established reporter probes *in vivo*, using the same tumor model and under the same levels of HSV1 *tk* expression have been performed.

The first chapter of this thesis describes the synthesis and *in vitro* evaluation of the new pyrimidine derivative 6-(1,3-dihydroxy-isobutyl)thymine (DHBT). The synthesis of DHBT was accomplished in a 10 step reaction sequence. Compared to already established substrates DHBT exhibited good binding affinity for the HSV1 TK and lacked affinity for the mammalian thymidine kinase. Furthermore, cytotoxicity assays using various HSV1 *tk* transduced and nontransduced human osteosarcoma cell lines indicated that DHBT is noncytotoxic at concentrations at which the well-established substrate ganciclovir (GCV) is cytotoxic. DHBT thus represents a promising lead

compound of a non-toxic reporter probe for the *in vivo* monitoring of HSV1 *tk* gene expression via PET.

These findings prompted us to develop two other new C-6 alkylated pyrimidine derivatives namely 6-(2-hydroxy-3-hydroxypropyl)-5-methyl-(1H,3H)-pyrimidine-2,4-dione (HHT) and its fluorinated derivative 6-(2-fluoro-3-hydroxypropyl)-5-methyl-(1H,3H)-pyrimidine-2,4-dione (FHHT). Their syntheses and *in vitro* characterizations are described in chapter 2. Both compounds were specifically and efficiently phosphorylated by the HSV1 TK. The fluorinated pyrimidine derivative, FHHT, exhibited a higher binding affinity for HSV1 TK than established substrates such as aciclovir (ACV) and ganciclovir (GCV). The catalytic turnover constant (k_{cat}) of FHHT was close to the k_{cat} values of ACV and GCV. For both compounds, no cytotoxic effects in HSV *tk* transduced and non-transduced cell lines were observed. In order to assess the potential of FHHT as a reporter probe for PET imaging of HSV1 *tk* expression, FHHT was labeled with fluorine-18 by nucleophilic substitution of the mesylate using [^{18}F] tetrabutylammonium fluoride as fluorinating reagent. However, this strategy gave low radiochemical yield. FHHT was therefore brominated in the 5-position of the pyrimidine ring and subsequently labeled with fluorine-18.

In chapter 3 of this thesis, we first examined the feasibility of monitoring the *in vivo* biodistribution of murine HSV1 *tk*-transduced T-lymphocytes in C57 BL/6 mice with the most commonly used reporter probe 9-[4-fluoro-3-(hydroxymethyl)butyl]guanine [^{18}F]FHBG by PET. This approach might be attractive since several immunotherapy applications are based on the transfer of lymphocytes capable of mediating anti-tumor effects to a tumor-bearing host. Although control experiments with *ex vivo* [^{18}F]FHBG labeled lymphocytes suggested the feasibility of this approach, *in vivo* experiments with [^{18}F]FHBG did not show distinct radioactivity accumulation in target organs (lymph nodes and spleen). Furthermore, due to its unfavorable hepatobiliary and intestinal background accumulation [^{18}F]FHBG may not represent an optimal PET reporter probe for this application.

In another approach, we compared the potential of [^{18}F]FHBG to visualize HSV1 *tk* transgene expression in tumors with our new PET reporter probe [^{18}F]fluoromethyl-HHT. For this purpose, allografts of two different melanoma cell lines, HSV1 *tk* transduced B16F1 and wild-type B16F1 were analyzed in Balb/c mice. Both tracers

clearly visualized HSV1 TK expressing tumors. Whereas [^{18}F]FHBG PET images demonstrated significant hepatobiliary and intestinal background activity, [^{18}F]fluoromethyl-HHT exhibited only low background levels. For [^{18}F]FHBG, *post mortem* tumor counting studies revealed a 3-fold higher standard uptake value (SUV) in HSV1 TK positive tumors compared to the wild-type tumors. On the other hand, [^{18}F]fluoromethyl-HHT showed a 24-fold higher SUV value in HSV1 TK positive tumor. This preliminary result suggests that in this tumor model, [^{18}F]fluoromethyl-HHT is far superior to [^{18}F]FHBG due to its higher specificity and lower background accumulation.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Gentherapie ist eine vielversprechende neue Behandlungsmethode für eine Reihe erblicher und erworbener Krankheiten. Allen gentherapeutischen Ansätzen liegt die gemeinsame Strategie zugrunde, ein Gen in ein Zielgewebe einzuschleusen, um die Produktion eines therapeutischen Proteins auszulösen. Für eine präklinische und klinische Anwendung ist es von entscheidender Wichtigkeit, ein nicht-invasives, bildgebendes Verfahren wie die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) zur Verfügung zu haben, mit welchem Ort, Ausmass und Dauer der Expression eines therapeutischen Genes überwacht werden können. Einer der vielversprechendsten Ansätze für eine bildliche Darstellung von Genexpression verwendet das Gen für das Enzym Thymidinkinase des Herpes Simplex Virus (HSV1 *tk*) als Reportergen in Kombination mit einem geeigneten Reportersubstrat. Für die Visualisierung der HSV1 TK-Expression sind vor allem zwei Klassen von Substraten bekannt: Iod-124 markierte Uracilanaloga und Fluor-18 markierte Acylguanosinanaloga. Diese Substrate werden durch HSV1 TK zu Monophosphaten metabolisiert und reichern sich somit in den transfizierten Zellen an.

Unsere Untersuchungen sind dadurch motiviert, neue PET-Reportersubstanzen ohne die Nachteile der bereits existierenden Reportersubstanzen zu entwickeln. Die Nachteile dieser Verbindungen betreffen unter anderem deren Zytotoxizität, ungünstige Pharmakokinetik und den sogenannten Bystander-Effekt. Mit Hilfe dieser Studie sind die neuen Substrate *in vivo* mit den bereits bekannten Reportersubstraten verglichen worden und, unter Verwendung desselben Tumormodells und Expressionsniveaus von HSV1 *tk*, die Vor- und Nachteile der einzelnen Substrate bestimmt worden.

Das erste Kapitel dieser Arbeit beschreibt die Synthese und die *in vitro*-Untersuchung des neuen Pyrimidinderivates 6-(1,3-dihydroxy-isobutyl)-thymine (DHBT). DHBT wurde in einer zehnstufigen Reaktion synthetisiert und zeigte im Vergleich zu bereits charakterisierten Substraten eine gute Bindungsaffinität für die virale Thymidinkinase (HSV1 TK) sowie keine Affinität für die Thymidinkinase von Säugetieren. Des Weiteren ergaben Zytotoxizitätsversuche mit verschiedenen HSV1 *tk*-transduzierten und nicht transduzierten humanen Osteosarkom-Zelllinien, dass DHBT weit weniger

zytotoxisch als das gängige Substrat Ganciclovir (GCV) ist. DHBT stellt daher einen vielversprechenden Kandidaten einer nicht zytotoxischen Reportersubstanz für das *in vivo* PET-Monitoring der Expression des HSV1 *tk* Genes dar.

Aufgrund dieser Ergebnisse entwickelten wir zwei weitere neue C-6-alkylierte Pyrimidinderivate, nämlich 6-(2-hydroxy-3-hydroxypropyl)-5-methyl-(1H,3H)-pyrimidin-2,4-dion (HHT) und sein fluoriertes Derivat 6-(2-fluoro-3-hydroxypropyl)-5-methyl-(1H,3H)-pyrimidine-2,4-dion (FHHT). Ihre Synthesen und *in-vitro*-Charakterisierungen sind in Kapitel 2 beschrieben. Beide Verbindungen wurden durch HSV1 TK spezifisch und effizient phosphoryliert. Das fluorierte Pyrimidinderivat FHHT zeigte eine höhere Bindungsaffinität für HSV1 TK als bekannte Substrate wie Aciclovir (ACV) und GCV. Die katalytische Umsatzkonstante (k_{cat}) von FHHT lag nahe bei den k_{cat} -Werten von ACV und GCV. Für beide Substanzen wurde in HSV1 *tk*-transduzierten und nicht transduzierten Zelllinien keine zytotoxische Wirkung beobachtet. Um das Potential von FHHT als Reportersubstrat für das PET-Imaging der HSV1 *tk*-Expression zu beurteilen, wurde FHHT durch nukleophile Substitution des Mesylats unter Verwendung von [^{18}F]Tetrabutylammoniumfluorid als Fluorierungsgagens mit Fluor-18 markiert. Diese Strategie ergab jedoch eine niedrige radiochemische Ausbeute. FHHT wurde daher in Position 5 des Pyrimidinrings bromiert und anschliessend mit Fluor-18 markiert. In Kapitel 3 dieser Arbeit wurde zunächst untersucht, ob die *in vivo*-Biodistribution muriner HSV1 *tk*-transduzierter T-Lymphozyten in C57 BL/6-Mäusen mit der etablierten Reportersubstanz 9-[4-fluoro-3-(hydroxymethyl)butyl]guanin [^{18}F]FHBG durch PET verfolgt werden kann. Dieser Ansatz könnte attraktiv sein, da einige Anwendungen der Immuntherapie eines tumortragenden Wirtes auf dem Transfer von Lymphozyten beruhen, die Anti-Tumoreffekte vermitteln können. Obwohl Kontrollexperimente mit *ex vivo* [^{18}F]FHBG-markierten Lymphozyten die Machbarkeit dieses Ansatzes nahe legten, zeigten *in vivo*-Experimente mit [^{18}F]FHBG keine eindeutige Anreicherung von Radioaktivität in den Zielorganen (Lymphknoten und Milz). Ausserdem könnte [^{18}F]FHBG aufgrund seiner ungünstigen hepato biliären und intestinalen Hintergrundanreicherung eine für diese Anwendung nicht optimale Reportersubstanz sein.

In einem anderen Ansatz verglichen wir, wie die transgene Expression von HSV1 *tk* in Tumoren mit [^{18}F]FHBG im Vergleich zu unserer neuen PET-Reportersubstanz

[¹⁸F]fluormethyl-HHT visualisiert werden kann. Dazu wurden Allotransplantate zweier verschiedener Melanomzelllinien (HSV1 *tk*-transduzierte B16F1-Zellen und Wildtyp-B16F1 Zellen) in Balb/c-Mäusen untersucht. Während mit [¹⁸F]FHBG aufgenommene PET-Bilder eine signifikante hepatobiliäre und intestinale Hintergrundaktivität aufwiesen, zeigte [¹⁸F]fluormethyl-HHT nur ein niedriges Hintergrundniveau. *Post mortem* Messungen von entnommenen Tumoren zeigten für [¹⁸F]FHBG eine dreimal höhere normalisierte Aktivitätskonzentration in HSV1 TK-positiven Tumoren verglichen mit Wildtyp-Tumoren. [¹⁸F]fluormethyl-HHT dagegen reicherte sich 24-mal stärker in HSV1 TK positiven Tumoren an. Dieses vorläufige Resultat legt nahe, dass [¹⁸F]fluormethyl-HHT bei diesem Tumormodell aufgrund seiner höheren Spezifität und seiner niedrigeren Hintergrundanreicherung [¹⁸F]FHBG überlegen ist.