ETH zürich

ETH Library

Development of novel ligands for PET imaging of the metabotropic glutamate receptor subtype 5 (mGluR5)

Doctoral Thesis

Author(s):
Kessler, Lea Janine

Publication date:
2004

Permanent link:
https://doi.org/https://doi.org/10.3929/ethz-a-004842638

Rights / license:
In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

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.: 15633

Development of Novel Ligands for PET Imaging of the Metabotropic Glutamate Receptor Subtype 5 (mGluR5)

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

presented by

Lea Janine Kessler

Eidg. Dipl. Apothekerin

born August 14th, 1974
citizen of Zurich, Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. P.A. Schubiger, examiner
Prof. Dr. G. Folkers, co-examiner
PD Dr. S.M. Ametamey, co-examiner

2004

SUMMARY

Positron emission tomography (PET) is the only non-invasive imaging technique offering the possibility to visualise and quantify brain receptors *in vivo*. PET is therefore a promising tool for studying neuroreceptors under both physiological and pathophysiological conditions. Although the PET technology is well advanced, the imaging of many neurotransmitter receptors including glutamate receptors is limited by the lack of suitable radiotracers. The metabotropic glutamate receptor subtype 5 (mGluR5) is of special interest since it has been implicated in a variety of diseases in the central nervous system including mood disorders, schizophrenia, Parkinson's disease but also chronic and inflammatory pain. Prompted by the need to develop PET radiotracers for the glutamatergic neurotransmission system, four high-affinity and selective compounds were synthesised, radiolabelled and pharmacologically characterised as prospective agents for imaging mGluR5 by PET.

Recently, MPEP and its methyl analogue M-MPEP were identified as potent and highly selective non-competitive antagonists for mGluR5 and their structural modification led to 2-methyl-6-(3-fluoro-phenylethynyl)-pyridine (M-FPEP). The synthesis, radiolabelling and *in vitro* and *in vivo* evaluation of [^{11}C]-M-FPEP are described in the first part of this thesis. The syntheses of M-FPEP and its desmethyl-precursor were accomplished in a three-step reaction sequence. The radiolabelling of M-FPEP with carbon-11 was successfully achieved by reacting the lithium salt of the desmethyl-precursor with [^{11}C]-MeI in appropriate radiochemical yields (10%) and high specific activities (90-120 GBq/µmol). [^{11}C]-M-FPEP exhibited high *in vitro* affinity for mGluR5 (K_D = 1.4 ± 0.1 nM) determined by Scatchard analysis, adequate lipophilicity (logD = 2.7) for good blood-brain barrier penetration and high *in vitro* plasma stability. Metabolite studies of rat brain homogenates also revealed high stability of the radioligand *in vivo*. Despite these promising properties, classical biodistribution studies as well as PET experiments using the quad-HIDAC small animal tomograph demonstrated a low and homogeneous accumulation of [^{11}C]-M-FPEP in rat brain. Blockade studies indicated that [^{11}C]-M-FPEP binding in rat brain was non-specific. [^{11}C]-M-FPEP thus represents a compound in a series of MPEP derivatives, which failed to exhibit good *in vivo* characteristics for PET imaging of the mGluR5. We

therefore reasoned that for our development work on mGluR5 PET ligands of a different class of compounds might be more suitable.

The second part of this thesis describes one such compound, 3-(6-methyl-pyridin-2-ylethynyl)-cyclohex-2-enone *O*-methyl-oxime (ABP688), obtained in a four-step reaction sequence. ABP688 was radiolabelled with carbon-11 by O-methylation of desmethyl-ABP688 and gave [^{11}C]-ABP688 in good radiochemical yields (30-40%) and high specific activities (100-200 GBq/µmol). *In vitro* saturation assays revealed a high *in vitro* binding affinity of [^{11}C]-ABP688 for mGluR5 (K_D = 1.7 ± 0.2 nM). The lipophilicity (logD = 2.4) and high *in vitro* plasma stability of [^{11}C]-ABP688 were promising properties for a prospective PET ligand. Moreover, *in vivo* radioactive metabolites that might enter the brain and confound the radioactivity signals were not identified in rat brain extraction experiments. PET imaging and classical biodistribution studies in rats demonstrated significant radioactivity accumulation in mGluR5-rich brain regions such as hippocampus and striatum. In the cerebellum, a region known for negligible mGluR5 expression, very little radioactivity uptake was noted. In the receptor-rich regions the co-injection of [^{11}C]-ABP688 and M-MPEP resulted in a blocking effect of up to 80%, whereas in the cerebellum no change in radioactivity uptake was observed. The comparison of mGluR5 wt- and ko-mice elegantly confirmed the specificity of [^{11}C]-ABP688 binding *in vivo*. Furthermore, *ex vivo* autoradiography exhibited high resolution images which clearly revealed high activity uptake in receptor-rich brain regions and subregions such as dentate gyrus and stratum radiatum. As expected, autoradiographic sections of a mGluR5 ko-mouse showed a homogeneous distribution of the tracer throughout the brain. [^{11}C]-ABP688 thus represents the first PET radioligand for imaging mGluR5 *in vivo*.

The excellent *in vivo* results obtained with [^{11}C]-ABP688 encouraged us to prepare fluoro-derivatives of ABP688 as fluorine-18 possesses better imaging characteristics and a longer half-life. Since ABP688 is not directly amenable to fluorination, fluoroethyl-ABP688 and fluoromethyl-ABP688 were generated. These two fluoro-derivatives were prepared from desmethyl-ABP688. The radiolabelling of fluoroethyl-ABP688 with fluorine-18 was accomplished in a two-step reaction sequence whereas for fluoromethyl-ABP688 a three-step reaction sequence was used. Both derivatives were obtained in 5-10% radiochemical yield and specific activities ranged from 35 to

55 GBq/µmol. Both derivatives revealed high *in vitro* binding affinity, adequate lipophilicity and high plasma stability. Despite these promising *in vitro* characteristics both radioligand failed *in vivo*, partly due to low brain uptake and partly due to high non-specific binding.

In conclusion, of all four compounds synthesised and pharmacologically characterised, only [^{11}C]-ABP688 exhibited excellent *in vivo* properties suitable for further evaluation in humans. This new ligand represents the first ever selective PET ligand that has been developed for the imaging of mGluR5 and will soon be tested in healthy volunteers. If [^{11}C]-ABP688 shows *in vivo* specificity in humans, it will represent an invaluable tool to elucidate the function of mGluR5 in various physiological, pathophysiological or pharmacological conditions.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) erlaubt als einziges nicht-invasives bildgebendes Verfahren die Möglichkeit, Hirnrezeptoren *in vivo* darzustellen, zu quantifizieren und ihre Physiologie und Pathophysiologie zu analysieren. Obwohl die PET-Technologie schon weit fortgeschritten ist, existieren noch keine PET-Liganden für Neurotransmitter-Rezeptoren wie zum Beispiel die glutamatergen Rezeptoren. Der Subtyp 5 der metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluR5) ist von besonderem Interesse, da er an der Pathophysiologie verschiedener Krankheiten des Zentralen Nervensystems beteiligt ist. Dazu gehören depressive Erkrankungen, Schizophrenie, Morbus Parkinson, aber auch chronische und entzündliche Schmerzen. Diese Arbeit umfasst die Synthese und pharmakologische Charakterisierung von hochaffinen und selektiven PET-Liganden für eine Visualisierung und Analyse des mGluR5 *in vivo*.

Mit MPEP und seinem Methyl-Analogon M-MPEP wurden unlängst die ersten selektiven, nicht-kompetitiven Antagonisten für den mGluR5 entwickelt. Strukturelle Derivatisierung führte zu 2-Methyl-6-(3-Fluoro-Phenylethynyl)-Pyridin (M-FPEP). Die Synthese, Radiomarkierung und Charakterisierung *in vitro* und *in vivo* von M-FPEP sind im ersten Teil dieser Arbeit beschrieben. M-FPEP und der entsprechende Desmethyl-Vorläufer wurden mittels einer dreistufigen Synthese erhalten. Die Radiomarkierung von M-FPEP erfolgte durch Reaktion von [^{11}C]-MeI mit dem Lithiumsalz des Desmethyl-Vorläufers. Dabei wurden eine radiochemische Ausbeute von 10% und eine hohe spezifische Aktivität (90-120 GBq/µmol) erreicht. Sättigungsstudien ergaben eine hohe *in vitro* Affinität von [^{11}C]-M-FPEP für mGluR5 (K_D = 1.4 ± 0.1 nM). Ebenso konnte eine ausreichende Lipophilie (logD = 2.7) für ein Passieren der Bluthirnschranke sowie eine hohe *in vitro* Plasmastabilität von [^{11}C]-M-FPEP nachgewiesen werden. Metaboliten-Analysen von Rattenhirnextrakten ergaben eine hohe Stabilität des Radioliganden *in vivo.* Entgegen dieser vielverspechenden Resultate zeigten klassische Biodistributions-Studien und PET-Experimente mit dem Kleintier-Tomographen quad-HIDAC nur eine geringe Aufnahme und homogene Verteilung des Radioliganden im Hirn. Zudem zeigte [^{11}C]-M-FPEP in Blockade-Studien mit co-injiziertem M-MPEP keine spezifische Bindung. M-FPEP ist somit ein weiteres MPEP-Derivat, welches keine geeigneten *in vivo*

Eigenschaften für einen PET-Liganden aufweist. Daher haben wir uns entschieden, die Entwicklung neuer mGluR5 PET-Liganden mit einer neuen Gruppe von MPEP-Derivaten fortzusetzen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde ein solches Derivat untersucht. 3-(6-Methyl-Pyridin-2-ylethynyl)-Cyclohex-2-enon *O*-Methyl-Oxim (ABP688) wie auch sein Desmethyl-Vorläufer wurden in einer vierstufigen Synthese hergestellt. Ausgehend von Desmethyl-APB688 erfolgte die Radiomarkierung von ABP688 mit Kohlenstoff-11 via O-Methylierung, was eine sehr gute radiochemische Ausbeute (30-40%) sowie eine hohe spezifische Aktivität (100-200 GBq/µmol) lieferte. *In vitro* Sättigungsstudien zeigten eine hohe Affinität von [^{11}C]-ABP688 für mGluR5 (K_D = 1.7 ± 0.2 nM). Die Bestimmung der Lipophilie und Plasmastabilität von [^{11}C]-ABP688 ergaben günstige Voraussetzungen für eine Eignung dieser Substanz als PET-Tracer. Durch Metabolitenanalysen von Rattenhirnextrakten konnte ausgeschlossen werden, dass die Bestimmung der Radioaktivitätskonzentration im Hirn durch die Bildung von radioaktiven Metaboliten verfälscht wird. PET-Aufnahmen und Biodistributions-Studien in Ratten zeigten eine deutliche Radioaktivitätsaufnahme in Hirnregionen mit einer hohen mGluR5-Dichte, z.B. Hippocampus und Striatum. Co-Injektion des Radioliganden mit M-MPEP reduzierte die Radioaktivitätsaufnahme in diesen Regionen um bis zu 80%, während für das Cerebellum, einer Region mit kleiner mGluR5-Dichte, keine Blockade nachgewiesen werden konnte. Ein Vergleich von mGluR5-Wildtyp und –Knockout Mäusen lieferte einen weiteren Nachweis, dass [^{11}C]-APB688 *in vivo* spezifisch an die mGluR5 bindet. Ebenso konnte in *ex vivo* Autoradiographien eine Radioaktivitätsanreicherung in den mGluR5-reichen Regionen und Subregionen, wie z.B. Gyrus dentatus und Stratum radiatum, visualisiert werden. Wie erwartet, zeigte [^{11}C]-ABP688 in der Autoradiographie einer mGluR5 Knockout Maus eine homogene Verteilung. [^{11}C]-ABP688 bietet somit als erster Radioligand geeignete Eigenschaften, um mGluR5 mittels PET darzustellen.

Der erfolgreiche Einsatz von [^{11}C]-ABP688 gab Anlass, Fluor-18-Derivate von ABP688 zu entwickeln, da Fluor-18 bessere bildgebende Eigenschaften und eine deutlich längere Halbwertszeit besitzt. Da ABP688 jedoch keine direkte Fluorierung erlaubt, wurden zunächst die beiden Derivate Fluoroethyl-ABP688 und Fluoromethyl-ABP688 entwickelt. Diese konnten ausgehend von Desmethyl-ABP688 hergestellt werden. Bei

der Radiomarkierung mit Fluor-18 wurde in einer zweistufige Synthesesequenz [^{18}F]-Fluoroethyl-ABP688, in einer dreistufigen Synthesesequenz [^{18}F]-Fluoromethyl-ABP688 erhalten. Beide Radiomarkierungen lieferten angemessene radioaktive Ausbeuten (5-10%) und spezifische Aktivitäten (35-55 GBq/µmol). *In vitro* zeigten diese beiden Derivate viel versprechende Eigenschaften wie nanomlare Affinität für mGluR5, angemessene Lipophilie, sowie eine gute *in vitro* Plasmastabilität. Hingegen zeigten beide Radioliganden *in vivo* keine geeigneten Eigenschaften, teils aufgrund zu geringer Aufnahme im Hirn, teils aufgrund hoher unspezifischer Bindung.

Von diesen vier PET-Tracern, die synthetisiert und pharmakologisch charakterisiert wurden, bewies nur [^{11}C]-ABP688 hervorragende *in vivo* Eigenschaften für eine Weiterentwicklung im Menschen. Diese Verbindung stellt den allerersten selektiven PET-Tracer für mGluR5 dar und wird demnächst in gesunden Probanden getestet. Sollte [^{11}C]-ABP688 gute Eigenschaften im Menschen zeigen, bietet sich dieser PET-Tracer für die Analyse der Physiologie, Pathophysiologie und Pharmakologie dieses Rezeptors an.