

DISS. ETH NO. 17632

**DEVELOPMENT OF NEW NUCLEOSIDE
ANALOGUES AS PET IMAGING AGENTS FOR
MONITORING GENE EXPRESSION**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

MILJEN MARTIĆ

Dipl. Ing. Kemije, University of Zagreb, Croatia

born on January 14th, 1979

citizen of Zagreb, Croatia

accepted on the recommendation of

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

2008

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. Several pyrimidine and purine analogues labeled with F-18 or I-124 have been synthesized and evaluated as potential imaging agents for the HSV1 TK expression *in vivo*. These two classes of substrates are selectively phosphorylated by HSV1 TK to their monophosphates and thereby 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 such as cytotoxicity, unfavorable pharmacokinetics, and by-stander effect. The major advantage of pyrimidine analogues over the purine ones is that pyrimidine analogues do not show any or a very low by-stander effect.

The first chapter of this thesis gives a brief introduction on PET, HSV1 TK and its substrate acceptance properties, comparison of HSV1 TK to human TK, and basic approaches to gene therapy monitoring. Finally, a short introduction on molecular modeling, especially docking procedure concludes the first chapter.

Chapter 2 describes the synthetic attempts made to prepare FHBT, a fluoro analogue of the lead compound, 6-(1,3-dihydroxy-isobutyl)thymine (DHBT). Several synthetic strategies that were designed to prepare FHBT starting from DHBT or its two intermediates were not successful. In most cases, the anticipated reaction products were not formed, either because the intermediates or the starting material decomposed, or underwent intramolecular cyclization. The use of different protecting groups such as PMB, Cbz and Boc did not lead to the expected results. In one case, by protecting a hydroxyl group in DHBT with MTr and reacting with DAST, traces of the target compound, FHBT, were detected. An attempt was

made to prepare the [^{18}F]FHBT starting from a tosyl precursor. Although the F-18 labeled MTr-protected intermediate was synthesized, no traces of [^{18}F]FHBT could be found after the deprotection step since the radiolabeled intermediate decomposed or underwent intramolecular cyclization.

In Chapter 3 the focus is on the preparation of a novel C-6 substituted radiolabeled HSV1 TK substrate. In order to prevent intramolecular cyclization and undesired side reactions described in Chapter 2, a methyl group at the N-1 position of the pyrimidine ring was introduced. Molecular modeling studies were employed to explore the outcome of the substitution in the N-1 position. It was found that the introduction of a methyl group in the N-1 position of the pyrimidine ring should not have any detrimental effects on the binding properties of the methylated non-fluorinated ligand, N-Me DHBT.

The total synthesis of the novel non-fluorinated key intermediate, N-Me DHBT, was accomplished in a 10-step reaction sequence in 13 % overall yield. Enzymatic tests confirmed that N-Me DHBT is indeed a substrate for HSV1 TK. Additionally, cytotoxicity experiments on B16F1 cell lines showed that N-Me DHBT is not cytotoxic up to a concentration of 1 mM. Encouraged by these promising *in vitro* results, the fluoro analogue, N-Me FHBT was prepared. The introduction of a methyl group in the N-1 position of pyrimidine ring effectively prevented intramolecular cyclization and undesired side reactions, making the synthesis of the “cold” reference N-Me FHBT possible.

A suitable precursor for the radiosynthesis of [^{18}F]N-Me FHBT was prepared in 30 % yield. The radiolabeling was carried out under classical conditions with potassium [^{18}F]fluoride and kryptofix 2.2.2 in acetonitrile at 90°C and the fluorinated intermediate was produced in 35 % conversion. The cleavage of the MTr protecting group was accomplished by using 5% HCl in methanol. Radiochemically pure [^{18}F]N-Me FHBT (>99 %) was obtained in 25 % RCY (decay corrected) after the HPLC purification.

Further *in vitro* validation (cell uptake studies) as well as *in vivo* studies are necessary to fully assess the applicability of [^{18}F]N-Me FHBT for the monitoring of HSV1 TK expression *in vivo*. Although only N-Me DHBT was validated *in vitro*, the literature suggests that the binding affinities of N-Me DHBT and N-Me FHBT should be in the same range. Therefore, it can be concluded that [^{18}F]N-Me FHBT is a promising candidate for monitoring HSV1 TK expression *in vivo*.

Zusammenfassung

Die Gentherapie ist eine vielversprechende neue Behandlungsmethode für eine Vielzahl von vererbten und erworbenen Erkrankungen. Alle Ansätze zur Gentherapie basieren auf der gemeinsamen Strategie, genetisches Material in Zellen einzuschleusen, um die Herstellung eines therapeutischen Proteins im betroffenen Gewebe auszulösen. Für die Anwendung am Menschen und auch für Forschungszwecke ist es entscheidend, über ein nicht-invasives bildgebendes Verfahren wie die Positronen-Emissions-Tomography zu verfügen, dass die Möglichkeit bietet, Ort, Ausmass und Dauer der Expression der eingeschleusten Gene zu überwachen. Einer der vielversprechendsten Ansätze für die bildliche Darstellung der Genexpression nutzt das Gen für die Thymidinkinase des Herpes Simplex Virus (HSV1 *tk*) als Reporter gen in Kombination mit einem geeigneten Reportersubstrat. Diverse F-18 oder I-124 markierte Pyrimidin- und Purin-Analoga wurden bereits synthetisiert und als potentielle Radiodiagnostika für die Expression des Enzyms HSV1 TK *in vivo* getestet. Diese zwei Substratklassen werden durch HSV1 TK selektiv zu Monophosphaten phosphoryliert und dadurch in den transfizierten Zellen metabolisch angereichert.

Die Motivation unserer Untersuchungen ist der Bedarf an PET-Reportersubstanzen ohne die Nachteile bisheriger Reportersubstrate wie Zytotoxizität, ungünstige Pharmakokinetik und den sogenannten Bystander-Effekt. Der Vorteil der Pyrimidin- gegenüber den Purin-Analoga ist hierbei der nicht vorhandene oder allenfalls sehr geringe Bystander-Effekt.

Das erste Kapitel dieser Arbeit enthält eine kurze Einführung in PET, HSV1 TK und seine Substratspezifität, einen Vergleich von HSV TK1 mit der humanen TK, und grundlegende Ansätze der Gentherapieüberwachung. Eine kurze Einführung ins Molecular Modeling mit Schwerpunkt auf die Docking-Methode beschliesst das erste Kapitel.

Kapitel 2 beschreibt die synthetischen Ansätze zur Herstellung von FHBT, des Fluor-Analogs der Leitstruktur 6-(1,3-Dihydroxy-isobutyl)thymine (DHBT). Keine der etlichen synthetischen Strategien, die zur Darstellung von FHBT aus dem Ausgangsstoff DHBT oder einer seiner zwei Vorstufen führen sollten, war erfolgreich. Im Allgemeinen wurden die erwarteten Reaktionsprodukte nicht gebildet, entweder aufgrund Zersetzung der Zwischenstufen oder des Ausgangsmaterials, oder ihrer intramolekularen Zyklisierung. Die Verwendung verschiedener

Schutzgruppen wie zum Beispiel PMB, Cbz oder Boc führte nicht zu den erwarteten Resultaten. In einem Fall, in welchem MTr-geschütztes DHBT mit DAST umgesetzt wurde, war es möglich, Spuren der Zielstruktur FHBT zu detektieren. Es wurde der Versuch unternommen, [^{18}F]FHBT ausgehend vom Tosyl-Vorläufer herzustellen. Obwohl die F-18 markierte, MTr-geschützte Zwischenstufe synthetisiert werden konnte, war es nicht möglich, nach dem Entschützungs-schritt [^{18}F]FHBT nachzuweisen, da währenddessen die Zersetzung oder intramolekulare Zyklisierung der radiomarkierten Zwischenstufen auftrat.

Im Kapitel 3 liegt der Schwerpunkt auf der Herstellung eines neuartigen C-6 substituierten radiomarkierten HSV1 TK Substrates. Um die intramolekulare Zyklisierung und die unerwünschten Nebenreaktionen, welche im Kapitel 2 beschrieben wurden, zu umgehen, wurde eine Methylgruppe an der N-1 Position des Pyrimidinrings eingeführt. Molecular-Modeling-Studien wurden durchgeführt, um die Auswirkungen der Substitution der N-1 Position zu untersuchen. Es wurde festgestellt, dass die Einführung einer Methylgruppe in der N-1 Position des Pyrimidinrings keine nachteiligen Auswirkungen auf die Bindungseigenschaften des methylierten nicht-fluorierten Liganden, N-Me DHBT, haben sollte.

Die Totalsynthese der neuartigen nicht-fluorierten zentralen Zwischenstufe N-Me DHBT wurde in einer zehnstufigen Reaktionssequenz mit einer Gesamtausbeute von 13% erreicht. Enzymatische Tests bestätigten, dass N-Me DHBT tatsächlich ein Substrat für HSV1 TK ist. Zytotoxizitätstests mit B16F1 Zelllinien zeigten, dass N-Me DHBT in Konzentration bis zu 1 mM nicht zytotoxisch wirkt.

Aufgrund der vielversprechenden *in vitro* Resultate mit N-Me DHBT wurde das Fluoranalogue, N-Me FHBT, synthetisiert. Die Einführung einer Methylgruppe an der N-1 Position des Pyrimidinrings verhinderte wirksam die intramolekulare Zyklisierung und unerwünschte Nebenreaktionen und ermöglichte dadurch die Synthese der „kalten“ Referenzverbindung N-Me FHBT. Ein geeigneter Präkursor für die Radiosynthese von [^{18}F]N-Me FHBT wurde in 30% Ausbeute hergestellt. Die Radiomarkierung wurde unter klassischen Bedingungen mit [^{18}F]Kaliumfluorid und Kryptofix 2.2.2. in Acetonitril bei 90°C durchgeführt und die [^{18}F]fluorierte Zwischenstufe mit 35% Umsetzung produziert. Die Abspaltung der MTr-Schutzgruppe wurde mit 5% HCl in Methanol erreicht. Nach HPLC-Reinigung wurde radiochemisch-reines (> 99%) [^{18}F]N-Me FHBT in 25% radiochemischer Ausbeute (zerfallskorrigiert) erhalten.

Eine weitere *in vitro* Evaluation (Zellaufnahmestudien) sowie *in vivo* Studien sind notwendig, um die Eignung von [¹⁸F]N-Me FHBT zur Überwachung der HSV1 TK Expression *in vivo* vollständig abzuschätzen. Obwohl lediglich N-Me DHBT *in vitro* validiert wurde, gibt es Hinweise in der Literatur, dass die Bindungsaffinitäten von N-Me DHBT und N-Me FHBT im selben Bereich liegen sollten. Deshalb kann geschlussfolgert werden, dass [¹⁸F]N-Me FHBT ein vielversprechender Kandidat für die Kontrolle der HSV1 TK Expression *in vivo* ist.