

DISS. ETH No. 17173

Evaluation of Technetium-99m/Rhenium Labelled Nucleoside Analogues  
as Potential Radiotracers in Oncology

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of  
Doctor of Sciences

presented by

DOMINIQUE DESBOUIS

Master's Degree in Chemistry, University of Montpellier (France)

born 09.04.1978

French Citizen

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. P.A. Schubiger, examiner

Prof. Dr. R. Schibli, co-examiner

Prof. Dr. L. Scapozza, co-examiner

2007

## Summary

Over the last decade, suicide gene therapy has emerged as a very promising method to treat cancer. This therapy consists of introducing new genetic material into the nucleus of cancer cells so that they express a therapeutic protein. The protein leads to a therapeutic effect upon interaction with a prodrug. The most widely used system is the combination of the enzyme Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase of type 1 (HSV1-TK) with the nontoxic antiviral prodrug ganciclovir. The efficiency of protein expression is crucial for a successful therapy. Several Positron Emission Tomography (PET) tracers such as 9-[4-[ $^{18}\text{F}$ ]fluoro-3-(hydroxymethyl)butyl]guanine ( $^{18}\text{F}$ ]FHBG) or [ $^{124}\text{I}$ ]iodo-2'-fluoro-2'-deoxy-1- $\beta$ -D-arabino-furanosyluracil ( $^{124}\text{I}$ ]FLAU) have been shown to be suitable probes for reporting HSV1-TK expression. One aspect of this work was to develop Single Photon Emission Tomography (SPET) reporter probes based on the inexpensive technetium-99m whose physical properties are well-suited for diagnosis ( $t_{1/2} = 6.02$  h;  $E_{\gamma} = 140$  keV). A series of complexes was prepared by derivatizing the precursor 5'-amino-5'-deoxythymidine at position N5' in order to introduce spacers of various lengths ( $\sim 0\text{-}30$  Å) carrying tridentate metal chelating entities such as iminodiacetic acid and picolylamine-*N*-monoacetic acid. The nucleoside derivatives were reacted with the precursors  $[\text{ReBr}_3(\text{CO})_3]^{2-}$  and  $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$  to form water-stable organometallic thymidine complexes. Unexpectedly, most of the compounds showed no inhibition of HSV1-TK but a mixed inhibition of the human cytosolic thymidine kinase with  $K_{\text{iu}}$  values ranging from 4.4-334  $\mu\text{M}$ . Competitive inhibition of HSV1-TK was only observed for the thymidine analogue in which the base and the metal core were separated by a spacer of approximately 30Å length ( $K_{\text{i}} = 16.3 \pm 4.6$   $\mu\text{M}$ ). This compound also exhibited a mixed inhibition of the hTK1 with  $K_{\text{ic}} = 73 \pm 20$   $\mu\text{M}$ . When tested *in vitro* for cell uptake in transfected cancer cells this technetium thymidine complex revealed a low internalisation of  $0.03 \pm 0.01\%$  ID/(mg/mL). Under the same conditions the [ $^3\text{H}$ ]thymidine exhibited an uptake of  $1.50 \pm 0.02\%$  ID/(mg/mL). In order to gain potency and selectivity for HSV1TK, the corresponding 5'-carboxamide 5-ethyl-2', 5'-dideoxyuridine was synthesized. The synthesis of the ligand was performed in seven steps from 2'-deoxyuridine. This ligand was then successfully labelled with the *fac*- $\text{M}(\text{CO})_3$ -core ( $\text{M} = \text{}^{99\text{m}}\text{Tc}, \text{Re}$ ). The rhenium complex was found to be a selective competitive inhibitor of HSV1-TK ( $K_{\text{i}} = 4.56 \pm 0.11$   $\mu\text{M}$ ). Although the cellular uptake of the technetium 2'-deoxyurine complex ( $0.10 \pm 0.01\%$  ID/(mg/mL)) was better than its corresponding technetium thymidine complex, it is still very low compared to thymidine uptake.

The second aspect of this work was to develop nucleoside derivatives labelled with technetium-99m/rhenium tricarbonyl core capable of acting as substrates for human cytosolic thymidine kinase (hTK1). hTK1 is a target of choice to evaluate cell proliferation due to its overexpression in a variety of cancer cells. [<sup>18</sup>F]Fluorothymidine ([<sup>18</sup>F]FLT), which acts as a hTK1 substrate, has emerged as a very efficient PET tracer for the monitoring of cell proliferation. Our aim was to develop a SPET tracer with the same mode of action as [<sup>18</sup>F]FLT. We prepared a set of technetium-99m/rhenium complexes of N3 thymidine derivatives with different overall charges (+1, 0 and -1) and variable spacer lengths. The complexes with different overall charges had the same spacer length between chelating system and thymidine moiety (two carbons spacer) while the complexes with different spacer lengths (2, 3, 5 and 10) were all neutral. These compounds were tested for their substrate activity with respect to recombinant hTK1. The phosphorylation rates of neutral and negative complexes were found to be similar, ranging between 15-16% with respect to thymidine (100%) whereas the phosphorylation rate of the positive complex was found to be significantly lower with  $9.5 \pm 1.8\%$ . Neutral compounds with three, five and ten carbons spacers were all found to be more potent than the neutral complex with two carbons spacers. The best rate was observed for the compound with the five carbons spacer with  $21.5 \pm 1.1\%$ . Molecular dynamics (MD) calculations were performed with a homology model based on hTK1 and *Clostridium acetobutylicum* thymidine kinase. MD have shown that the contact between Glu98, the amino acid responsible for deprotonation, and H5' is conserved for all spacer lengths. The different activity can be explained by the fact that the tricarbonyl moiety docks to different part of the protein in function of the spacer length. Since it was likely that these complexes would enter the cells via passive diffusion, they were characterized by the physicochemical parameter log P to give insight into their lipophilicity. The three complexes with the short spacer displayed negative log P values ranging from  $-1.67 \pm 0.02$  (positively charged complex) to  $-0.42 \pm 0.01$  (neutral complex). It was then reasoned to increase the spacer length of the neutral complex to reach more favourable physicochemical properties for passive diffusion. Interestingly, the log P value of the complex with the ten carbon spacer was found to be  $1.1 \pm 0.1$ , which indicates a gain in lipophilicity. Only this complex was internalised in two cancer cell lines *in vitro* ( $4.8 \pm 0.5$  and  $3.3 \pm 0.2\%ID/(mg/mL)$ ). Finally, this technetium-99m complex was tested *in vivo* in nude mice bearing HT-29 xenografts. The results suggest that the compound was rapidly metabolized and excreted via the hepatobiliary route. Consequently, the tumour uptake was low, which precludes the use of this technetium complex as a proliferation marker.

## Zusammenfassung

In den vergangenen Jahren hat sich die Suizidgentherapie zu einer viel versprechenden Methode zur Krebsbehandlung entwickelt. Dabei wird verändertes genetisches Material zur Expression therapeutischer Proteine in die DNA der Krebszelle eingefügt. Die nachfolgende Interaktion des Proteins mit einem Prodrug führt zum therapeutischen Effekt. Die am häufigsten verwendete Kombination besteht aus dem Enzym Herpes Simplex Thymidinkinase Typ 1 (HSV1-TK) und dem Antimetaboliten Ganciclovir als Prodrug. Die Effizienz der Proteinexpression ist ein entscheidender Punkt für eine erfolgreiche Gentherapie. Mit den Radiotraceren 9-[4-[<sup>18</sup>F]fluoro-3-(hydroxy-methyl)butyl]guanin ([<sup>18</sup>F]FHBG) und [<sup>124</sup>I]iodo-2'-fluoro-2'-deoxy-1-β-D-arabino-furanosyl-uracil ([<sup>124</sup>I]FIAU) kann die HSV1-TK-Expression mittels Positronen-Emissionstomographie (PET) verfolgt werden.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung von Radiotraceren mit Technetium-99m (<sup>99m</sup>Tc) für Single-Photon-Emissionstomographie (SPET). <sup>99m</sup>Tc eignet sich aufgrund seiner physikalischen Eigenschaften ( $t_{1/2} = 6.02$  h;  $E = 140$  keV) für die Diagnose. Durch Derivatisierung des Vorläufermoleküls 5'-amino-5'-deoxythymidin an der Position N5' mit Spacern unterschiedlicher Länge (~ 0 - 30 Å, 2 bis 10 C-Atome) wurde eine Reihe von Verbindungen erhalten. Die Spacer tragen tridentate Metallchelatoren (z. B. iminodiacetic acid und picolylamine-*N*-monoacetic acid). Die Thymidinderivate wurden mit  $[\text{ReBr}_3(\text{CO})_3]^{2-}$  und  $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$  zu stabilen organometallischen Komplexen umgesetzt. Die meisten Verbindungen zeigten keine Inhibition der HSV1-TK, aber eine Hemmung der humanen cytosolischen Thymidinkinase (hTK1 ;  $K_{iu} = 4.4 - 334$  μM). Eine kompetitive Inhibition der HSV1-TK konnte nur für das Thymidinanalogon mit einer Spacerlänge von 30 Å beobachtet werden ( $K_i$  (HSV1-TK) = 16.3 μM), wobei die Verbindung eine gemischte Inhibition der hTK1 zeigte ( $K_{ic}$  (hTK1) = 73 μM). Das genannte <sup>99m</sup>Tc-Thymidinanalogon wurde von transfektierten Krebszellen *in vitro* im Vergleich zu [<sup>3</sup>H]-Thymidin ( $1.50 \pm 0.02\%$ ID/(mg/mL)) nur in geringem Masse internalisiert ( $0.03 \pm 0.01\%$ ID/(mg/mL)). Um die Affinität und Selektivität der Verbindung für die HSV1-TK zu erhöhen, wurde das entsprechende 5'-carboxamide 5-ethyl-2',5'-dideoxyuridin-Derivat synthetisiert. Die Synthese des Liganden erfolgte in sieben Schritten ausgehend von 2'-deoxyuridin. Die Verbindung wurde anschliessend erfolgreich mit  $[\text{ReBr}_3(\text{CO})_3]^{2-}$  und  $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$  markiert. Der Rheniumkomplex inhibierte die HSV1-TK selektiv und kompetitiv ( $K_i = 4.56$  μM). Die Zellinternalisierungsrate des <sup>99m</sup>Tc-2'-deoxyuridin-Komplexes ( $0.10 \pm 0.01\%$ ID/(mg/mL)) war höher als diejenige des entsprechenden <sup>99m</sup>Tc-Thymidin-Komplexes, verglichen mit Thymidin jedoch immer noch sehr tief.

Der zweite Teil dieser Arbeit befasste sich mit der Entwicklung von Nucleosidderivaten, die für  $^{99m}\text{Tc}$ - und Re-Tricarbonyl-Markierungen geeignet sind und von der hTK1 als Substrate erkannt werden. Da hTK1 in verschiedenen Krebszellen überexprimiert wird, ist sie ein wichtiger Indikator der Zellproliferation. Ein erfolgreiches Beispiel für ein solches hTK1-Substrat ist der PET-Tracer [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorothymidin ([ $^{18}\text{F}$ ]FLT). Unser Ziel war es, analoge SPET-Tracer zu entwickeln. Es wurden verschiedene  $^{99m}\text{Tc}$ - und Rheniumkomplexe der N3-Thymidinderivate mit unterschiedlichen Gesamtladungen (+1, -1 und 0) und Spacerlängen hergestellt. Die Komplexe mit unterschiedlichen Gesamtladungen wiesen die gleiche Spacerlänge ( $\text{C}_2$ ) auf. Die Komplexe mit unterschiedlichen Spacerlängen ( $\text{C}_2$ ,  $\text{C}_3$ ,  $\text{C}_5$  und  $\text{C}_{10}$ ) waren alle ungeladen. Durch Ermittlung der Phosphorylierungsraten wurde die Affinität der Verbindungen für die rekombinante hTK1 getestet. Die Phosphorylierungsraten der neutralen und negativ geladenen Komplexe betragen 15 - 16% im Vergleich zu Thymidin (100%), für die positiv geladenen Komplexe lag sie mit  $9.5 \pm 1.8\%$  signifikant tiefer. Sämtliche mit  $\text{C}_3$ -,  $\text{C}_5$ - und  $\text{C}_{10}$ -Spacern funktionalisierten Verbindungen waren durchwegs potentere Substrate als diejenigen mit dem  $\text{C}_2$ -Spacer. Die beste Rate wurde für die Verbindung mit dem  $\text{C}_5$ -Spacer gefunden ( $21.5 \pm 1.1\%$ ). Mit einem auf der hTK1 und der Thymidinkinase von *Clostridium acetobutylicum* basierenden Homologiemodell wurden Moleküldynamik (MD)-Berechnungen durchgeführt. Diese haben gezeigt, dass der Kontakt zwischen der für die Deprotonierung zuständigen Aminosäure Glu98 des Enzyms und der Position H5' des Nucleosidanalogs für alle Verbindungen konserviert ist. Die verschiedenen Aktivitäten der Substrate könnten dadurch erklärt werden, dass die Chelatereinheit eine unterschiedliche Anzahl von Kontakten mit dem Protein ausbildet. Da angenommen wird, dass die Komplexe durch passive Diffusion in die Zellen gelangen, wurde ihre Lipophilie durch Ermittlung des physikochemischen Parameters  $\log P$  abgeschätzt. Die Komplexe mit kurzen Spacerlängen wiesen negative  $\log P$ -Werte von  $-1.67 \pm 0.02$  (positiv geladener Komplex) bis  $-0.42 \pm 0.01$  (neutraler Komplex) auf. Erwartungsgemäss konnte mit einer Verlängerung des Spacers die Lipophilie der Komplexe erhöht werden ( $\log P = 1.108 \pm 0.080$  für  $\text{C}_{10}$ -Spacer), was die Membranpermeation erleichterte. Die Internalisierungsrate in zwei Krebszelllinien *in vitro* betrug  $4.8 \pm 0.5$  und  $3.3 \pm 0.2\% \text{ID}/(\text{mg}/\text{mL})$ . Eine *in vivo* Studie mit Nacktmäusen mit HT-29 Xenografts zeigte für den  $^{99m}\text{Tc}$ -Komplex eine schnelle Metabolisierung und eine Exkretion über den hepatobiliären Weg. Durch die geringe Aufnahme in den Tumor, scheint die Verbindung allerdings nicht als Proliferationsmarker geeignet zu sein.