

Synthese und In-vivo-Bildgebung eines ¹⁸F-markierten PARP1-Inhibitors mithilfe eines chemisch orthogonalen, Abfangreagens-gestützten Hochdurchsatzverfahrens**

Thomas Reiner, Edmund J. Keliher, Sarah Earley, Brett Marinelli und Ralph Weissleder*

Poly-ADP-Ribose-Polymerasen (PARPs) und Brustkrebsanfälligkeitssproteine (BRCA) sind Enzyme, die DNA-Strangbrüche reparieren, die während eines jeden Zellzyklus auftreten, was für das Überleben der Zelle essenziell ist. PARP repariert Einzelstrangbrüche und BRCA Doppelstrangbrüche. Fehlt funktionales BRCA (z.B. wenn BRCA mutiert ist), übernimmt PARP die Reparatur beider Arten von DNA-Strangbrüchen. Daher rücken PARP-Inhibitoren (PARPis) als nützliche Therapeutika in den Fokus des Interesses (entweder als Einzelwirkstoff oder in Kombination mit zytotoxischen Medikamenten) – vor allem bei BRCA-negativen Tumoren.^[1] Mehrere niedermolekulare PARP1is wurden entwickelt (z.B. olaparib/AZD2281, BSI101, AG014699, MK4827), von denen einige in klinischen Studien getestet werden.^[1-3] Ein Problem bei der Evaluierung der therapeutischen Wirksamkeit besteht in der fehlenden Möglichkeit, PARP1 nichtinvasiv in lebenden Organismen zu testen und die therapeutische Inhibition zu quantifizieren. Solch eine Technologie würde es auch ermöglichen, Patienten in Behandlungsgruppen einzuteilen und aufkommende Resistzenzen zu diagnostizieren.^[4] Die Entwicklung von PARP1-Tracern ist – ähnlich wie bei den meisten anderen interzellulären Tracern – komplex und zeitraubend, und oft sind iterative Ansätze notwendig, um adäquate Verbindungen zu entwickeln.

In Anbetracht der aufkommenden Bedeutung der Positronenemissionstomographie (PET) sowohl in vorklinischen als auch in klinischen Anwendungen^[5-9] und des Belegs, dass fluoreszenzmarkierte PARP1-Inhibitoren zur Bildgebung in Zellkulturen genutzt werden können,^[10] wurde unser Interesse geweckt, ¹⁸F-markierte Tracer zur Ganzkörperbildgebung zu entwickeln. Insbesondere um die Inhibition von therapeutischen Zielen durch potenzielle therapeutische PARP1-Inhibitoren zu messen, könnten sich solche Radio-

tracer als nützlich erweisen. Die Einbau von ¹⁸F in AZD2281 (**4**; Abbildung 1D) an der 2-Fluorbenzamid-Stelle erwies sich aufgrund der Unzugänglichkeit des Fluoratoms als anspruchsvoll. Auch Modifikationen basierend auf der Bildung von Tosylethern und der anschließenden Fluorierung des Piperazinrests waren ineffizient oder resultierten in der Zersetzung der Verbindungen.^[11] Zudem werden nicht alle in Zell-Screens identifizierten markierten hoch affinen Liganden unter pharmakokinetischen Gesichtspunkten (Halbwertszeit im Blut, Verteilung im Gewebe, Ausscheidung) für die PET geeignet sein.

Eine Möglichkeit, brauchbare Tracer zu identifizieren, ist, eine Gruppe von Kandidaten in vivo zu testen. Dieser Ansatz geht jedoch mit beträchtlichen Anforderungen an die Markierung jeder einzelnen Verbindung einher. Zunächst müssen die Fluorierungsbedingungen für jede Verbindung einzeln optimiert werden und die gewünschten Produkte von den nichtmarkierten Ausgangsverbindungen getrennt werden, um eine Inhibition des biologischen Ziels durch Co-Injektion letzterer zu verhindern. Markierung und Abtrennung werden typischerweise in durch Bleischilde abgeschirmten, vollautomatischen Syntheseeinheiten und aufgrund der kurzen Halbwertszeit von ¹⁸F (109.8 min) zeitnah durchgeführt. In Anbetracht der langwierigen sequenziellen Optimierungsprozesse für jede einzelne Verbindung ist eine standardisierte und einfache Plattformtechnologie höchst wünschenswert, um die Entwicklung von Tracern durch Hochdurchsatzverfahren und nachfolgende parallele Evaluierung der Verbindungen in vivo voranzutreiben. Wir beschreiben hier einen solchen auf der [4+2]-Diels-Alder-Cycloaddition mit inversem Elektronenbedarf basierenden Ansatz, und zeigen seine Eignung für die Entwicklung neuartiger PARP1-PET-Tracer.

Die [4+2]-Cycloaddition zwischen *trans*-Cycloocten (TCO) und Tetrazin (Tz) ist aus einer Reihe von Gründen eine äußerst nützliche chemisch orthogonale Strategie:^[10-14] Die Reaktion ist schnell ($k > 6000 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$), irreversibel, hoch selektiv, unabhängig von thermischer Aktivierung oder Katalysatoren sowie tolerant gegenüber Blut, Serum und einer Vielzahl organischer Solventien, und es steht eine Vielzahl an aktivierbaren Tetrazinfarbstoffen zur Verfügung.^[14-18] Trotz der Vorteile und potenziellen breiten Anwendbarkeit der [4+2]-Cycloaddition sind derzeit nur wenige Daten über das biologische Verhalten von Dihydropyridazin- und Pyridazin-Verbindungselementen verfügbar, z.B. über ihren Einfluss auf die Affinität niedermolekularer Verbindungen für ihre biologischen Ziele oder auf die Pharmakokinetik der Konjugate in vivo, oder darüber, ob eine solche generische Stra-

[*] Dr. T. Reiner,^[†] Dr. E. J. Keliher,^[‡] Dr. S. Earley, B. Marinelli, Prof. R. Weissleder
Center for Systems Biology, Massachusetts General Hospital
185 Cambridge St., Boston, MA 02114 (USA)
Fax: (+1) 617-643-6133
E-Mail: rweissleder@mgh.harvard.edu

[†] Diese Autoren haben gleichrangig zu dieser Arbeit beigetragen.
[‡] Wir danken Drs. Ralph Mazitschek und Neal Devaraj für hilfreiche Diskussionen. Diese Forschungsarbeit wurde von den NIH (Fördermittel P50 CA86355 und RO1 EB-010011) unterstützt. T.R. wurde von Fördermitteln der Deutschen Akademie der Wissenschaften Leopoldina unterstützt (LPDS 2009-24).

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201006579> zu finden.

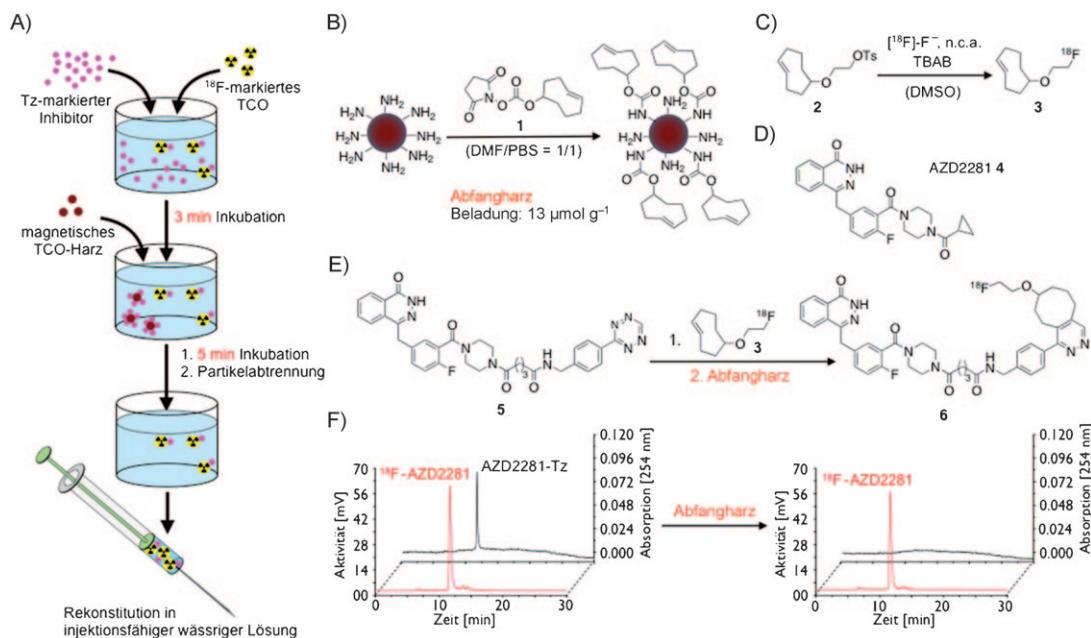


Abbildung 1. A) Schematische Synthese von ¹⁸F-AZD2281 (**6**); ¹⁸F-markiertes TCO **3** und AZD2281-Tz (**5**) wurden kombiniert und 3 min inkubiert; magnetisches TCO-Harz wurde zugegeben, 5 min inkubiert und entfernt; gereinigtes ¹⁸F-AZD2281 wurde rekonstituiert und in ein injektionsfähiges Volumen überführt; B) Synthese des magnetischen TCO-Abfangharzes aus einem aminfunktionalisierten Harz und dem NHS-aktivierten TCO **1**; C) Synthese von ¹⁸F-markiertem TCO **3**; D) Struktur von AZD2281 (**4**); E) Synthese und Struktur von ¹⁸F-AZD2281 (**6**; nur ein Isomer dargestellt); F) Radioaktivitäts- und Absorptionsspektren der ¹⁸F-AZD2281-Reaktionsmischung vor und nach der Reinigung mit dem magnetischen TCO-Harz. PBS: phosphatgepufferte gesättigte Kochsalzlösung.

tegrie zur In-vivo-PET-Bildgebung genutzt werden kann. Wir stellen hier die Entwicklung einer generischen Plattform zur Radiofluorierung niedermolekularer Inhibitoren vor und zeigen, wie markierte Reaktionsprodukte schnell für nachfolgende In-vivo-Tests abgetrennt werden können, bevor ¹⁸F zerfällt. Wir charakterisieren durch TCO/Tz-Reaktionen generierte ¹⁸F-AZD2281-Konjugate, beschreiben sowohl biologische als auch In-vivo-Experimente und zeigen außerdem, dass eine der Leitstrukturen die Bildgebung von PARP1 ermöglicht und zur Quantifizierung der PARP1-Inhibition in vivo verwendet werden kann. Diese Resultate sollten den Weg ebnen für die intensivere Nutzung der [4+2]-Cycloadition in der Entwicklung von PET-Tracern.

Die radiomarkierten AZD2281-Derivate wurden auf der Basis von Tetrazinen entwickelt, die mit radiomarkierten trans-Cyclooctenen reagieren und die über einen Linker kovalent an die Piperazinposition von AZD2281 gebunden wurden. Wir hatten bereits gezeigt, dass die Anbindung von Substituenten an dieser Position die Fähigkeit von AZD2281-Derivaten, an PARP1 zu binden, nur minimal einschränkt.^[10,11] Ein Problem bei der Synthese von ¹⁸F-radioaktiven Verbindungen ist, dass zumeist große Mengen an Ausgangsverbindung benötigt werden, um effizient mit kleinen Mengen ¹⁸F abzureagieren. Da die nicht umgesetzte Ausgangsverbindung meist mit der radiomarkierten Sonde um die Ziel-Bindungsstellen konkurriert, müssen die resultierenden Mischungen HPLC-chromatographisch gereinigt werden. Um langwierige HPLC-Reinigungen zu vermeiden, haben wir ein trans-Cycloocten-Harz zum Binden des Überschusses an tetrazinkonjugiertem AZD2281-Derivat entwi-

ckelt (Abbildung 1 A). Das Harz wurde aus kommerziell erhältlichen magnetischen, aminfunktionalisierten Kugelchen in DMF/PBS und einer 75 mM Lösung von NHS-aktiviertem *trans*-Cycloocten **1** erhalten (Abbildung 1 B; NHS: *N*-Hydroxysuccinimid). Die Beladung der resultierenden TCO-funktionalisierten Partikel von 13 µmol g⁻¹ wurde mithilfe von tetrazinkonjugiertem Oregon-Green-Tz^[16] bestimmt, dessen Absorption bei 504 nm genutzt wurde, um mit den Kugelchen abreaktierten Farbstoff zu quantifizieren (für eine detaillierte Beschreibung siehe die Hintergrundinformationen).

Das chemisch orthogonal reaktive radiomarkierte ¹⁸F-TCO **3** wurde durch nucleophile Substitution des Tosylat-substituenten im *trans*-Cycloocten **2** durch ¹⁸F⁻ (n.c.a.) in Gegenwart von Tetrabutylammoniumbicarbonat (TBAB) erhalten (Abbildung 1 C).^[11] AZD2281-Tz (**5**) wurde wie kürzlich in Lit. [11] beschrieben synthetisiert. Zur Synthese von ¹⁸F-AZD2281 (**6**) wurden **3** und **5** in H₂O/DMSO (3: 1000 µCi; **5**: 130 nmol) kombiniert, und die Mischung wurde 3 min stark gerührt. Dabei wurde das ¹⁸F-TCO **3** quantitativ umgesetzt und eine Mischung aus ¹⁸F-AZD2281 (**6**) und dem Überschuss an AZD2281-Tz (**5**) erhalten (Abbildung 1 E). Durch 5 min Behandlung dieser Lösung mit dem TCO-funktionalisierten Abfangharz (4 Moläquiv. TCO) wurde **5** unter minimalem Verlust an **6** (etwa 4 %) aus der Mischung entfernt. Nach dem Entfernen der Harzkugelchen mithilfe eines Magneten wurde Verbindung **6** mit (92.1 ± 0.4) % dcRCY in einem injizierbaren Medium rekonstituiert erhalten (Abbildung 1 A). HPLC-Analyse der Reaktionsmischung vor und nach der Behandlung mit dem TCO-funktionalisier-

ten Abfangharz ergab, dass das Absorptionssignal von AZD2281-Tz komplett verschwindet, während das Aktivitätssignal, das auf ^{18}F -AZD2281 zurückgeht, bestehen bleibt (Abbildung 1 F).

Der IC_{50} -Wert von ^{18}F -AZD2281 bezüglich PARP1 wurde in biochemischen Assays mit dem isolierten Enzym zu (17.9 ± 1.1) nM bestimmt (der IC_{50} -Wert von AZD2281 selbst ist 5 nM).^[11,19,20] Dies macht PARP1 zu einem idealen Ziel beim Hochdurchsatz-Screening von ^{18}F -markierten Inhibitoren, da das Enzym relativ große prosthetische Gruppen toleriert, ohne dass die Bindungsaffinität beeinflusst wird. Um die Wirksamkeit des Inhibitors in zellbasierten In-vitro-Assays zu bestimmen, wurden MDA-MB-436- und MDA-MB-231-Zellen platziert (5×10^5 Zellen pro Vertiefung) und bei 37°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden beide Zelllinien entweder mit 5 μCi ^{18}F -AZD2281 oder einer Mischung aus 5 μCi ^{18}F -AZD2281 und AZD2281 (Endkonzentration AZD2281: 10 μM –0.01 nM) inkubiert. Die zelluläre Aufnahme von ^{18}F -AZD2281 wurde durch Quantifizierung der Restaktivität nach Inkubieren und Waschen der anhaftenden Zellen bestimmt. ^{18}F -AZD2281 erwies sich als zellgängig, und seine Aufnahme konnte durch Zugabe von nichtradioaktivem AZD2281 im Überschuss inhibiert werden (Abbildung 2).

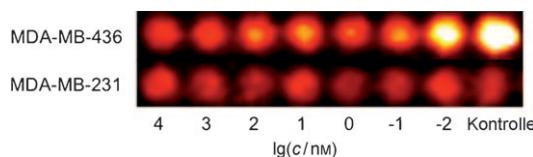


Abbildung 2. Kompetitiver In-vitro-Inhibierungsassays mit ^{18}F -AZD2281. Zellen mit einem hohen (MDA-MB-436) und Zellen mit einem niedrigen Gehalt an PARP1 (MDA-MB-231) wurden mit 5 μCi ^{18}F -AZD2281 AZD2281 (10 μM –0.01 nM) behandelt. Nach dem Waschen wurde die zellassoziierte Aktivität durch Messung der γ -Strahlung bestimmt. Bei der Kontrollmessung wurde kein nichtradioaktives AZD2281 zugefügt.

Die Aufnahme von ^{18}F -AZD2281 in die MDA-MB-231-Zellen war niedriger als die in die MDA-MB-436-Zellen, was mit der Proteinexpression von PARP1 in den entsprechenden Zelllinien übereinstimmt (Details sind in den Hintergrundinformationen zu finden).

Anschließend wurden für In-vivo-Experimente 30 μCi ^{18}F -AZD2281 in Nu/Nu-Mäuse injiziert und seine Verteilung mithilfe von PET/CT über 2 h optisch abgebildet. An der Verteilung des PET-Tracers als Funktion der Zeit in Abbildung 3 A wird deutlich, dass – in Einklang mit einer hepato-biliären Ausscheidung – der Tracer zunächst eindeutig in der Leber, der Gallenblase und den Eingeweiden lokalisiert ist. Nach 50 min hatte der Großteil des Tracers die Blutbahn verlassen ($t_{1/2} = 6$ min) und war über den Dickdarm ausgeschieden worden.

Tumortragende Mäuse wurden durch Injektion von MDA-MB-436-Zellen (5×10^6 Zellen in Matrigel) in die Flanken von Nu/Nu-Mäusen erhalten. Danach wurde 7 Tage gewartet, damit die Tumoren wachsen und Blutgefäße bilden konnten. Abbildung 3 B zeigt die dreidimensionale Rekonstruktion einer tumortragenden Maus, der 30 μCi ^{18}F -

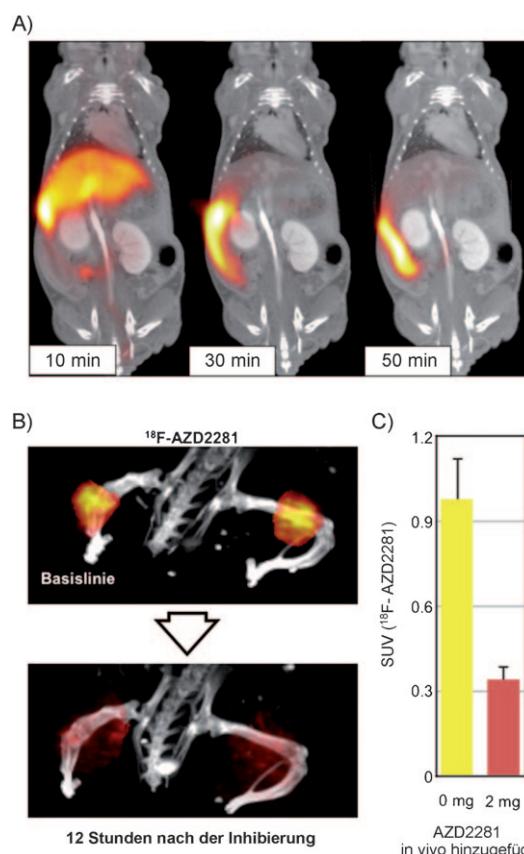


Abbildung 3. In-vivo-Evaluierung von ^{18}F -AZD2281. A) Kombinierte PET/CT einer tumorfreien Maus 10, 30 und 50 min nach Injektion von ^{18}F -AZD2281; B) dreidimensionale Rekonstruktion einer tumortragenden Maus, der mit und ohne vorhergehende Injektion von nichtradioaktivem AZD2281 ^{18}F -AZD2281 injiziert wurde (die Blase wurde aus Gründen der Übersicht aus dem Bild herausgeschnitten); C) Quantifizierung der Aufnahme durch den Tumor in den Flanken mit und ohne vorhergehende Injektion von nichtradioaktivem AZD2281 in die Bauchhöhle; SUV: standardisierter Aufnahmewert.

AZD2281 injiziert wurden. Dessen Aufnahme in die Tumoren ist klar erkennbar. Direkt nach der Aufnahme wurden die Mäuse zweimal am Tag mit 1 mg AZD2281 behandelt. Erneute Injektion von 30 μCi ^{18}F -AZD2281 bestätigte die Inhibition der Aufnahme des PET-Tracers in die Tumoren (Abbildung 3 B und C). Daher kann, wegen der kurzen Halbwertszeit von ^{18}F , jede Maus an aufeinanderfolgenden Tagen als ihre eigene Kontrolle dienen, was den direkten Vergleich von SUVs ermöglicht.

Wir haben hier gezeigt, dass a) ^{18}F -AZD2281 sich in PARP1 überexprimierenden Krebszellen (z.B. MDA-MB-436) anreichert, b) die Anreicherung in Zellen durch die Zugabe von nichtradioaktivem AZD2281 inhibiert werden kann, c) ^{18}F -AZD2281 sich in vivo in Tumoren von PARP1-Mausmodellen anreichert und d) die PARP1-Inhibition mithilfe von PET-gestützter Bildgebung in vivo quantifiziert werden kann. Der PET-Tracer wurde in relativ kurzer Zeit mithilfe der oben beschriebenen chemisch orthogonalen, Abfangreagens-gestützten Hochdurchsatzmethode entwickelt. Festphasenharze für alternative Konjugationsmethoden könnten auf ähnliche Art entwickelt und angewendet

werden. Dennoch glauben wir, dass die hier beschriebene Methode für die Entwicklung von PET-Tracern wegen der extrem schnellen, von Katalysatoren unabhängigen und hoch selektiven Diels-Alder-Reaktion zwischen Tetrazin und *trans*-Cycloocten bei Raumtemperatur besonders attraktiv ist. Das beschriebene Verfahren kann leicht auf andere Wirkstoffe, Biomoleküle und molekulare Ziele erweitert werden und sollte die Entwicklung von PET-Tracern für Wirkstofftests erleichtern.

Eingegangen am 20. Oktober 2010
Online veröffentlicht am 21. Januar 2011

Stichwörter: Abfangharz · Chemisch orthogonale Konjugation · In-vivo-Bildgebung · Krebsdiagnose · Positronenemissionstomographie

-
- [1] M. Rouleau, A. Patel, M. J. Hendzel, S. H. Kaufmann, G. G. Poirier, *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 293–301.
 - [2] K. Ratnam, J. A. Low, *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 1383–1388.
 - [3] E. A. Comen, M. Robson, *Oncology* **2010**, *24*, 55–62.
 - [4] R. Weissleder, M. J. Pittet, *Nature* **2008**, *452*, 580–589.
 - [5] N. Avril, C. A. Rosé, M. Schelling, J. Dose, W. Kuhn, S. Bense, W. Weber, S. Ziegler, H. Graeff, M. Schwaiger, *J. Clin. Oncol.* **2000**, *18*, 3495–3502.
 - [6] H. D. Burns et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 9800–9805.
 - [7] S. S. Gambhir, *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 683–693.
 - [8] J. K. Willmann, N. van Bruggen, L. M. Dinkelborg, S. S. Gambhir, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2008**, *7*, 591–607.
 - [9] M. T. Klimas, *Mol. Imaging Biol.* **2002**, *4*, 311–337.
 - [10] T. Reiner, S. Earley, A. Turetsky, R. Weissleder, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 2374–2377.
 - [11] E. J. Keliher, T. Reiner, A. Turetsky, R. Weissleder, *ChemMed-Chem* **2010**, DOI: 10.1002/cmde.201000426.
 - [12] P. V. Chang, J. A. Prescher, E. M. Sletten, J. M. Baskin, I. A. Miller, N. J. Agard, A. Lo, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 1821–1826.
 - [13] M. L. Blackman, M. Royzen, J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13518–13519.
 - [14] N. K. Devaraj, R. Upadhyay, J. B. Haun, S. A. Hilderbrand, R. Weissleder, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7147–7150; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7013–7016.
 - [15] N. K. Devaraj, S. Hilderbrand, R. Upadhyay, R. Mazitschek, R. Weissleder, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 2931–2934; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2869–2872.
 - [16] N. K. Devaraj, E. J. Keliher, G. M. Thurber, M. Nahrendorf, R. Weissleder, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 397–401.
 - [17] N. K. Devaraj, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2297–2299.
 - [18] J. B. Haun, N. K. Devaraj, S. A. Hilderbrand, H. Lee, R. Weissleder, *Nat. Nanotechnol.* **2010**, *5*, 660–665.
 - [19] D. V. Ferraris, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 4561–4584.
 - [20] K. A. Menear, C. Adcock, R. Boulter, X.-l. Cockcroft, L. Copsey, A. Cranston, K. J. Dillon, J. Drzewiecki, S. Garman, S. Gomez, H. Javaid, F. Kerrigan, C. Knights, A. Lau, V. M. Loh, Jr., I. T. W. Matthews, S. Moore, M. J. O'Connor, G. C. M. Smith, N. M. B. Martin, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 6581–6591.