

# VU Research Portal

## Development of PET tracers for in vivo imaging of active tissue transglutaminase

van der Wildt, B.

2017

### **document version**

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

### **citation for published version (APA)**

van der Wildt, B. (2017). *Development of PET tracers for in vivo imaging of active tissue transglutaminase*.

### **General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

### **Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

### **E-mail address:**

[vuresearchportal.ub@vu.nl](mailto:vuresearchportal.ub@vu.nl)

# Chapter 7

**Nederlands samenvatting**

---

## Nederlands samenvatting

Transglutaminases zijn enzymen die bekend staan om hun calcium afhankelijke intermoleculaire crosslinking van eiwit substraten. De nieuw gevormde isopeptide of epsilon-(gamma-glutamyl)lysine binding tussen de voormalige glutamine en lysine residuen van de respectievelijke substraten is zeer bestendig tegen proteolyse. De resulterende oligomerische eiwitstructuren introduceren starheid in weefsel en weerbaarheid tegen mechanische stress, wat een belangrijke rol speelt in huid en bloedkorst vorming.

Transglutaminase type 2, TG2, speelt een rol gedurende cellulaire zelfdoding, waarbij crosslinking van intracellulaire componenten lekkage van deze componenten uit de cel tijdens het opruimingsproces voorkomt en dus onstekingsreacties verhindert. Het crosslinken door TG2 is strikt gereguleerd. Hoge guanosine difosfaat en trifosfaat concentraties houden het enzym in zijn gesloten inactieve conformatie. Hoge calcium concentraties, in de millimolaire schaal, staan het enzym toe om zijn open conformatie aan te nemen, waarbij de actieve plaats toegankelijk wordt en crosslinking gefaciliteerd kan worden. Verdere transglutaminase activiteit wordt gereguleerd door een intramoleculaire disulfide brug, welke gereduceerd dient te zijn alvorens transglutaminase activiteit mogelijk is.

Ondanks de strikte regulering van TG2 crosslinkingactiviteit wordt overmatige crosslinking activiteit van TG2 in verband gebracht met ogenschijnlijk niet gerelateerde aandoeningen, zoals neurodegeneratieve ziekten, fibrotische ziekten, kanker en coeliakie. Als gevolg hiervan zijn er verscheidene remmers van TG2 ontwikkeld, variërend van substraten, reversibele en niet-reversibele klein-moleculaire remmers van de actieve plaats, allosterie klein-moleculaire remmers tot TG2 remmende antilichamen. Hoewel enkele van deze stoffen veelbelovend lijken *in vitro*, blijft de daadwerkelijke onderschepping van hun doel in levende systemen,

zoals proefdieren of –personen, veelal onbekend. Daarbij is de daadwerkelijke rol van TG2 in ziektebeelden onderwerp van discussie, omdat de extrapolatie van *in vitro* bevindingen naar zoogdierenbiologie voor dit enzym niet triviaal is. Een duidelijke reden hiervoor is de beperkte beschikbaarheid van chemische hulpmiddelen om de mate van TG2 remming *in vivo* te bestuderen. Het doel van de studies beschreven in dit proefschrift is dan ook om een PET tracer te ontwikkelen voor het in beeld brengen van actief TG2 *in vivo*. Om dit doel te behalen zijn er veelbelovende TG2 remmers geselecteerd uit de literatuur en gebruikt als uitgangsverbindingen om tot het in beeld brengen van actief TG2 in een geschikt diermodel te komen.

**Hoofdstuk 1** levert een algemene introductie betreffende de onderwerpen die worden bestudeerd in dit proefschrift. De familie van transglutaminasen en hun rol tijdens fysiologische processen wordt geïntroduceerd. De relatie tussen TG2 en ziekte wordt belicht en de basisprincipes van PET onderzoek worden beschreven.

**Hoofdstuk 2** biedt een overzicht van mogelijke strategieën richting de ontwikkeling van een geschikte PET TG2 tracer. Omdat er toentertijd nog geen gevalideerde PET tracers waren beschreven, is de inhoud ietwat voorspellend. Als eerste wordt het gebruik van irreversibele en reversibele remmers als uitgangsverbinding bediscussieerd. Het wordt opgemerkt dat zowel orthostere als allosterische reversibele remmers met een hoge affiniteit voor TG2, een vereiste voor een succesvolle PET tracer, op dit moment niet beschikbaar zijn. Daarentegen zijn verscheidene peptidische en niet peptidische irreversibele remmers beschreven en farmacologisch gekarakteriseerd. Daarbij, omdat het enzymatische crosslinkingsproces in een tweestaps mechanisme plaatsvindt waarbij zowel glutamine donor substraten als amine acceptor substraten zijn betrokken, lijkt het gebruik van radioactief gemerkte specifieke TG2 substraten een veelbelovende strategie. Vooral het gebruik van TG2 specifieke donor substraten biedt een interessant gebied van onderzoek, omdat de eerste stap in het ‘ping-pong’ mechanisme substraat specifiek is. Als laatste worden antilichamen bediscussieerd, welke mogelijk toegang bieden tot, afhankelijk van hun

---

eigenschappen, bestudering van mate van extracellulaire expressie of actieve conformatie. Concluderend wordt, de huidige farmaceutische mogelijkheden in acht nemend, het gebruik van potente irreversibele remmers, specifieke acyl-donor substraten of antilichamen aanbevolen.

In **hoofdstuk 3** wordt de radiosynthese en *in vitro* evaluatie van een drietal koolstof-11 gelabelde TG2 remmers beschreven. Deze remmers, recentelijk beschreven door de Cure Huntington's Disease Initiative, dragen een acrylamide reactieve groep en zijn dus toegankelijk voor koolstof-11 labeling volgens een palladium gemedieerde aminocarbonyleringsreactie. Eerst zijn de niet-gelabelde verbindingen gesynthetiseerd en hun remmende potentie geëvalueerd. Verbinding 1 bleek 200 keer minder potent dan de opgegeven literatuurwaarde, terwijl de gevonden waarden voor de andere verbindingen ruwweg overeenkwamen. Gebruik makend van bovengenoemde methode werden alle drie de koolstof-11 gelabelde verbindingen verkregen in opbrengsten tussen de 42-49% (gecorrigeerd voor verval en gebaseerd op koolstof-11 koolstofmonoxide). Van deze stoffen, die waren verkregen in een oplossing van 10% ethanol in saline, werd de weefsel verdeling en het metabolisme bepaald na toediening in gezonde ratten. Gebaseerd op de superieure metabole stabiliteit van verbinding [<sup>11</sup>C]**3** werd deze stof verder bekeken *in vitro* door middel van een TG2 bindingsassay en middels autoradiografie op MDA-MB-231 tumor secties, afgeleid van hoog metastatisch borstkanker. De uitmuntende selectiviteit voor de open conformatie van TG2 in het bindingsassay en de hoge specifieke en selectieve binding in de autoradiografie experimenten rechtvaardigen de toekomstige evaluatie van [<sup>11</sup>C]**3** in diermodellen van TG2 overactiviteit.

In **hoofdstuk 4** wordt de ontwikkeling van een TG2 PET tracer gebaseerd op de bekende TG2 remmer **Z006** beschreven. **Z006** is een peptidair irreversibele remmer van TG2 die als reactieve groep een diazoketon functionaliteit bevat. In eerste instantie zijn er pogingen ondernomen om **Z006** zelf te labelen met koolstof-11 op de carbonyl positie van het diazoketon, gebruikmakend van koolstof-11 diazomethaan.

Dit is de gebruikelijke manier voor de introductie van diazoketonen in organische chemie. Echter, in de radiochemie, waar een grote stoichiometrische overmaat van het precursor molecuul ten opzichte van het radioactieve synthon wordt gebruikt, bleek deze methode niet succesvol. Daarom werden er, door het vervangen van de N-terminale Z-beschermgroep, acht analoga van **2006** gesynthetiseerd die geschikt zijn voor labeling met fluor-18. Gebaseerd op hun remmende eigenschappen op verscheidene transglutaminases werden er twee remmers, **6f** en **6g**, geselecteerd voor radioactieve labeling. Radiolabeling van **6f** was uitgevoerd in drie opeenvolgende stappen volgens 1) fluorering van het tosyl derivaat van (*S*)-melkzuur methylester gevolgd door distillatie van het gelabelde intermediair naar een tweede reactievat, 2) ontscherming van de methylester en 3) BOP koppeling met het geschikte precursor amine, resulterende in [<sup>18</sup>F]**6f** in een gemiddelde voor verval gecorrigeerde opbrengst van 20%. De radiolabeling van **6g** was uitgevoerd uitgevoerd in 4 stappen in een één-pots reactie volgens 1) fluorering van de trimethylammonium benzaldehyde precursor, 2) oxime vorming tussen het aldehyde en de peptidair aminoxy-precursor, 3) conversie van het vrije carbonzuur naar het gemengde isobutyl anhydride en 4) reactie van dit anhydride met diazomethaan tot het diazoketon, resulterende in [<sup>18</sup>F]**6g** in een gemiddelde voor verval gecorrigeerde opbrengst van 9%. Van beide verbindingen werd de weefsel verdeling en het metabolisme bepaald na toediening in gezonde ratten. Terwijl verbinding [<sup>18</sup>F]**6f** omgezet werd in meerdere metabolieten, werd verbinding [<sup>18</sup>F]**6g** slechts omgezet tot een enkel niet-polair metaboliet. Gebruikmakende van LC-MS/MS analyse werd dit metaboliet geïdentificeerd als de op de C-terminus gedemethyleerde 'parent' verbinding. Omdat dit metaboliet een net zo sterke remmer van TG2 bleek, werd [<sup>18</sup>F]**6g** verder *in vitro* bestudeerd. Gelijk aan de experimenten beschreven in Hoofdstuk 3 voor verbinding [<sup>11</sup>C]**3**, liet *in vitro* binding van [<sup>18</sup>F]**6g** aan geïsoleerd TG2 en autoradiografie op MDA-MB-231 tumor secties specifieke en selectieve binding aan de actieve conformatie van TG2 zien. Gebaseerd op deze resultaten zal verbinding [<sup>18</sup>F]**6g** verder bestudeerd worden in een geschikt diermodel van TG2 overactiviteit.

---

**Hoofdstuk 5** beschrijft de evaluatie van twee veelbelovende TG2 PET radiotracers, waarvan de initiële ontwikkeling beschreven staat in **hoofdstukken 3** en **4**, gebruikmakende van een orthotopisch MDA-MB-231 tumor xenograft model in SCID muizen, omdat eerdere *in vitro* experimenten op MDA-MB-231 tumor secties hier hoge hoeveelheden TG2 hadden aangetoond. Een vergelijkbaar metabolisme van beide tracers, [<sup>11</sup>C]**3** en [<sup>18</sup>F]**6g** genoemd, tussen SCID muizen en eerder gebruikte ratten werd gevonden. Belangrijk, een zelfde metabolisme van [<sup>18</sup>F]**6g** naar het equipotente metaboliet [<sup>18</sup>F]**M1** werd bevonden. Tumoren werden geïnduceerd in het vetkussen van de tweede thoracale borst, op afstand van organen die mogelijkwjs PET analyse verstoren. PET scannen werd uitgevoerd met beide tracers op basisniveau en onder geblokkeerde condities, waarbij de TG2 remmer **ERW1041E** werd gebruikt, een stof waarvan eerder TG2 remming *in vivo* in verschillende diermodellen was aangetoond. Bovendien werd er samen met [<sup>18</sup>F]**6g** ook niet-gelabelde verbinding **6g** toegediend voor de bestudering van [<sup>18</sup>F]**6g** opname. Verbinding [<sup>11</sup>C]**3** liet een lage tumoropname zien van rond de 0.2 %ID/g in het 40-60 minuten tijdsframe, wat gelijk was aan de achtergrondwaarde, gemeten in de bovenbeenspier van de achterpoot. Er werd geen toename van de activiteitsconcentratie waargenomen over de tijd, wat suggereert dat er geen sprake is van irreversibele binding van de tracer. Bovendien leidde voorbehandeling van de muizen met de TG2 remmer **ERW1041E** niet tot afname, maar tot een onverwachte verhoging van de activiteitsconcentraties in zowel de tumoren als het achtergrondweefsel. Verbinding [<sup>18</sup>F]**6g** liet wel een tijdsafhankelijke toename in tumor activiteitsconcentratie zien tot 1.7 %ID/g in het 40-60 minuten tijdsframe, vergeleken met 0.8 %ID/g in achtergrondweefsel. Voorbehandeling met **ERW1041E** resulteerde in een afname in tumor activiteitsconcentraties tot 1.4 %ID/g, hoewel dit niet statistisch niet als significant beschouwd kon worden ( $p = 0.06$ ). De TG2 blokkering had geen effect op de achtergrondopname. Co-administratie van niet-gelabeld **6g** resulteerde in duidelijkere afname van tumor activiteitsconcentraties tot

1.0 %ID/g op 40-60 minuten ( $p = 0.007$ ). Post-mortem analyse van de tumorweefsels middels histology, immunohistochemie, histochemie en autoradiografie liet zien dat TG2 expressie en activiteit in meer of mindere mate gelimiteerd was tot de randen van het tumorweefsel. Deze bevinding overlapte met de PET data, waar de activiteitsconcentraties lager waren richting de kern van de tumoren. In deze kern van de tumoren bleken minder celkernen aanwezig wat zou duiden op centraal necrotisch tumorweefsel. Over het algemeen zouden tumoren waarvan grote delen van de kern bestaan uit niet-viabel weefsel de daadwerkelijke potentie van [ $^{18}\text{F}$ ]**6g** uitvlakken. Desalniettemin blijkt [ $^{18}\text{F}$ ]**6g** uit de huidige resultaten een geschikte TG2 PET tracer te zijn voor het in beeld brengen van TG2 activiteit *in vivo*.