

<https://doi.org/10.22643/JRMP.2020.6.2.165>

Development of radiolabelled histone deacetylase inhibitors for PET imaging study

Hee-Kwon Kim

Department of Nuclear Medicine, Molecular Imaging & Therapeutic Medicine Research Center, Jeonbuk National University Medical School and Hospital, Jeonju, Jeonbuk 54907, Republic of Korea

ABSTRACT

Histone Deacetylases (HDACs) are enzymes that have control gene expression regulation and cell state. In additions, inhibitions of HDACs are associated with growth arrest, differentiation, or apoptosis of tumor cell. Thus HDAC inhibition is one of the interesting biological targets. A variety of HDAC inhibitors has been developed by many scientists, and some of chemical structures related with HDAC inhibitors were modified to give radiolabeled HDAC inhibitors for positron emission tomography (PET) study. In this highlight review, the development of radiolabeled HDAC inhibitors for PET study are described.

Key Word: Histone deacetylase, HDAC inhibitor, Positron emission tomography (PET)

Introduction

유방암, 폐암, 대장암, 난소암, 및 림프종 등 여러 가지 질병들이 후성유전적 기전(epigenetic mechanisms)과 연관되어 있고 보고되었다 (1-2). 후성유전적 현상(Epigenetic phenomena)들은 일반적으로 DNA 메틸화, RNA 변형, 유전체 각인(genomic imprinting) 등에 의해 영향을 받는다 (3). 특히 아세틸화나 메틸화 등 히스톤 변화(histone modification)는 유전자 전사(gene transcription)를 조절하며 유전적인 질병과 관련이 되어 있다 (4-5).

히스톤 탈아세틸화효소(Histone deacetylases, HDACs)는 히스톤 단백질 구성물의 N-말단위치에 있는 라이신(lysine)아미노산으로부터 아세틸기를 제거하는 역할을 하여 아세틸화의 상태를 변화시킨다. 히스톤 단백질에서 아세틸기가 없어지게 되는 탈아세틸화(acetylation)가 되

면, 염색질 응집 (chromatin condensation) 과 전사 억제 (transcriptional repression)가 일어나게 되고, DNA에 위치하는 유전자의 발현이 억제된다 (6-7).

히스톤 탈아세틸화효소는 18가지가 발견되어 분류되었는데, Class I (HDAC 1,2,3,8), class II (class IIa HDAC 4,5,7,9와 class IIb HDAC 6,10), 와 class IV (HDAC 11)은 Zn^{2+} -dependent HDACs 이고, class III (SIRT 1-7)은 NAD^+ -dependent HDACs 로 분류되었다 (8). 이런 히스톤 탈아세틸화효소의 작용을 억제하면 여러 암세포에서 세포사멸(cell apoptosis) 과 세포분화(cell differentiation)가 이루어 지는 것이 알려졌고 (9-10), 여러 종류의 히스톤 탈아세틸화 억제제 (histone deacetylase inhibitor, HDAC inhibitor)가 개발되었다.

대부분의 히스톤 탈아세틸화 억제제는 Cap, 아연 결합 부위 (zinc binding group, ZBG) 및 링커(linker) 부분으로 구

Received: December 15, 2020 / Revised: December 27, 2020 / Accepted: December 29, 2020

Corresponding Author : Hee-Kwon Kim, Department of Nuclear Medicine, Jeonbuk National University Medical School and Hospital, Jeonju, Jeonbuk 54907, Republic of Korea. Tel: +82 63 250 2768, Fax: +82 63 255 1172, E-Mail address: hkkim717@jbnu.ac.kr

Copyright©2020 The Korean Society of Radiopharmaceuticals and Molecular Probes

성되어 있으며, 이 세 부분을 적절하게 변화시켜서 새로운 히스톤 탈아세틸화 억제제가 개발되어 의학적으로 중요한 치료제로 사용되어 오고 있다. 본 하이라이트 미니 리뷰에서는 지난 기간 히스톤 탈아세틸화 억제제를 양전자 방출촬영술(positron emission tomography, PET) 연구에 이용하기 위해서 방사성동위원소가 표지된 히스톤 탈아세틸화 억제제 개발에 대한 연구내용을 소개하고자 한다.

첫번째로 언급하고 싶은 물질은 히스톤 탈아세틸화 억제제 (HDAC inhibitor)중 널리 알려진 물질인 hydroxamic acid type 의 suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA, Vorinostat)이다 (Figure 1). 이것은 T 세포림프종 (T-cell lymphoma)치료제로 미국 FDA(The United States Food and Drug Administration) 의 승인을 받아서 사용되고 있으며, 다양한 암치료 에도 적용되고 있다 (11). 미국에 위치한 MD Anderson cancer center 에 있는 Mian M. Alauddin 와 공동연구자들은 SAHA의 아연 결합 부위에 동위원소 (^{18}F)을 도입하는 K^{18}F /kryptofix 및 $\text{Bu}_4\text{N}^{18}\text{F}$ 를 사용하여 전구체로부터 radiofluorination 반응을 진행하여 6-(^{18}F fluoroacetamido)-1-hexanoicanilide (^{18}F FAHA)를 제조하였다 (방사화확효율= 9-13%, specific activity >2 Ci/ μM) (Figure 2)(12),

이후 ^{18}F FAHA 는 유방암 동물모델(쥐)에 꼬리정맥으로 주입되어 종양흡수 (tumor uptake) 가 30 분만에 0.43% ID/g 가 되는 것을 확인되었다. 특히, 종양 대 근육 (tumor-to-muscle) 비율이 ^{18}F FAHA주입 이후 30-60분 정도에 2.2-2.4 가 되는 등 높은 HDAC activity를 보여주는 것이 밝혀졌다 (13). 또한 SAHA를 pre-treatment할 경우 tumor uptake와 tumor-to-muscle 이 감소한 것을 확인되었다.

이후 같은 연구팀에서 ^{18}F FAHA 을 이용하여 rat brain에 서의 HDAC activity를 조사하는 데, 사용되었다 (14). 이 경우 5-60 분에 0.44% ID/g 가 되는 것을 확인되었고, 뇌 대 근육 (brain-to-muscle) 비율이 5-60 분 정도에 2.5-2.1 가 되는 것을 확인하였다.

이 후 Alicia E. Reida와 공동연구자들은 ^{18}F FAHA을 원숭이의 뇌 연구에 이용하여 ^{18}F FAHA가 빠르게 ^{18}F fluoroacetate (^{18}F FAC)로 변화되어지며 뇌에 들어간다는 것을 확인하였다 (15).

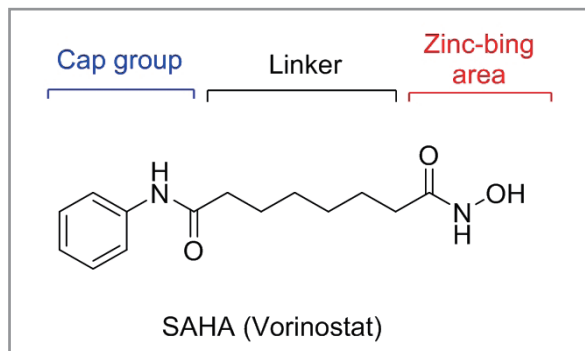


Figure 1. Structure of SAHA

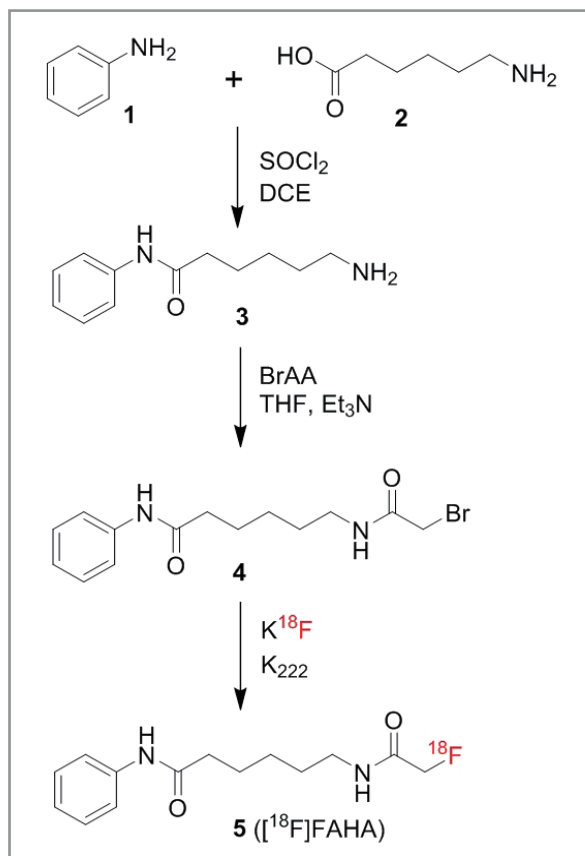


Figure 2. Synthesis of ^{18}F FAHA

두 번째 물질은 SAHA의 Cap 부근에 있는 phenyl 기의 para 위치에 fluoro ethyl기를 도입한 FESAHA이다. 미국 뉴욕에 있는 Memorial Sloan Cancer Center 에 있는 Jason S. Lewis와 공동연구자들은 먼저 SAHA의 Cap 부근에 있는 phenyl 기의 para 위치에 ethanol기를 도입한 후, Tosylation 반응을 진행 한 후 동위원소(^{18}F)을 도입하는 radiofluorination 반응을 진행하여 방사화확효

을 19%로 N^1 -(4-(2-[^{18}F]-fluoroethyl)phenyl)- N^6 -hydroxyoctanediamide([^{18}F]-FESAHA)를 제조하였다 (specific activity = 6.2 mCi/ μmol) (Figure 3)(16). 개발된 [^{18}F]-FESAHA는 logP값이 1.01로서 SAHA와 비슷하였다. (참고로 SAHA log P값은 1.04, [^{18}F]-FAHA의 logP 값은 1.39). 이후 [^{18}F]-FESAHA는 전립선암 세포 (LNCap 세포와 PC-3세포)에서 tumor inhibitory effect 측정에 사용되었고, SAHA와 비슷한 수준의 inhibitory 효과가 있는 것을 확인하였다. 또한 HDAC inhibition assay 에서 11가지 HDAC subtype에서 IC_{50} 값이 3 nM (HDAC6) - 1.7 μM (HDAC4)보여주어서 SAHA와 비슷하다는 것을 밝혀내었다. Cell proliferation 연구에서 LNCaP 세포와 PC-3 세포에서 FESAHA의 cytostatic properties는 SAHA와 비슷하였다. 이후 LNCap 동물모델 (마우스)를 이용한 PET 연구에서 [^{18}F]-FESAHA의 종양흡수(tumor uptake) 근육 등 여러 조직보다 높게 나왔으나, 신장, 간, 뼈에도 높은 uptake를 보이는 것을 확인하였다.

세 번째로 중요한 동위원소(^{18}F)가 표지된 SAHA 유도체가([^{18}F]-SAHA)이다. Ralph Mazitschek와 공동연구자들

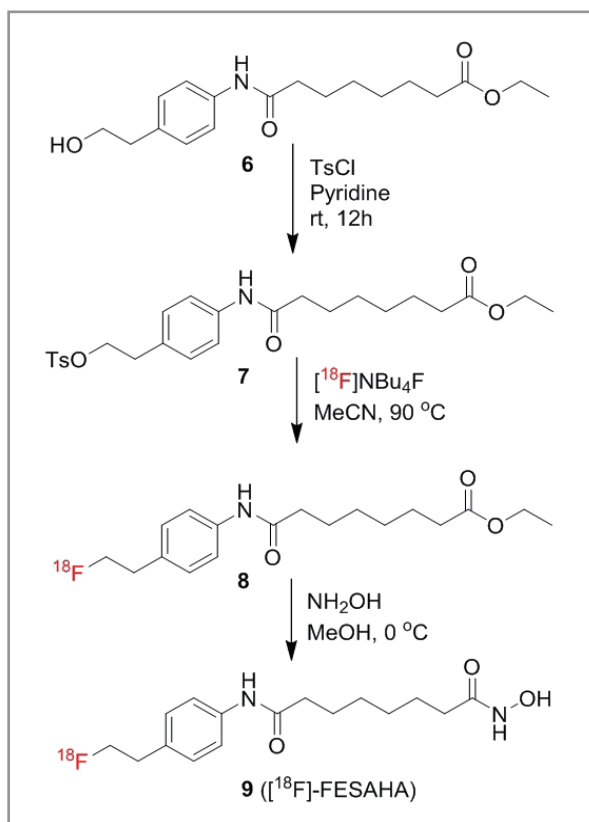


Figure 3. Synthesis of [^{18}F]-FESAHA

은 SAHA의 Cap 부근에 있는 phenyl 기에 직접적으로 동위원소(^{18}F)를 도입하는 radiofluorination 반응을 진행하여 방사화효율 40%로 ^{18}F -suberoylanilide hydroxamic acid ([^{18}F]-SAHA)를 합성하였다 (Figure 4)(17). HDAC inhibition assay 에서 nanomolar potency보여 주었고, SAHA와 비슷한 약리학적 성질을 갖는 다는 것을 보여 주었다. 난소암동물모델에서 ([^{18}F]-SAHA)은 난소암에 잘 축적되는 것을 확인하였다.

또한, benzamide type 히스톤 탈아세틸화 억제제 (HDAC inhibitor)도 동위원소 표지에 이용되었다. benzamide type 히스톤 탈아세틸화 억제제 중, MS-275 (eninostat)은 개발된 이후에 유방암, 폐암, 대장암, 난소암, 신경모세포종 등 여러 다양한 암치료에 사용되고 있다 (Figure 5)(18-22).

Joanna S. Foler와 공동연구자들은 MS-275에 방사성동위원소 (^{11}C)를 표지한 [^{11}C]MS-275를 합성하였다 (Figure 6) (23). [^{11}C]MS-275는 원숭이의 뇌 연구에 사용되었는데, PET 연구 결과 brain tissue에 낮은 uptake를 보였다. 이 연구 결과는 MS-275가 낮은 brain 투과율을 보이는 것을 영상으로 확인하여 주었고, MS-275가 중추신경계 (central nervous system, CNS)에는 좋은 치료제로 사용하는 데, 한계가 있다는 것을 보여주었다.

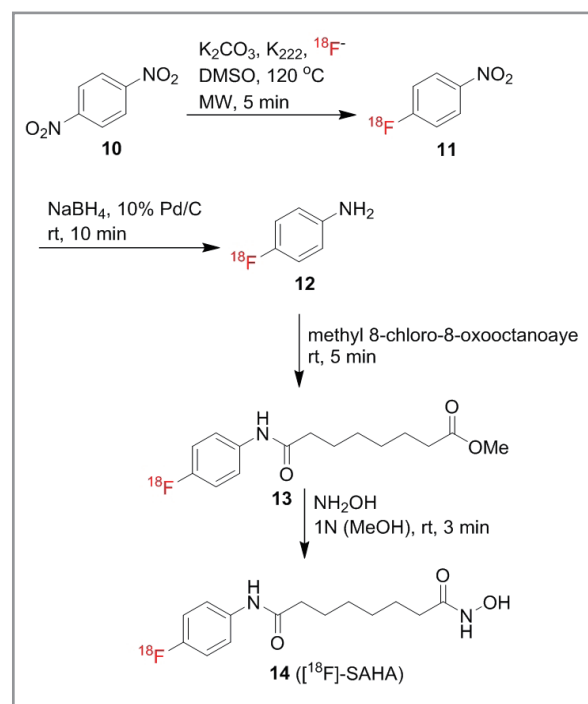


Figure 4. Synthesis of [^{18}F]-SAHA

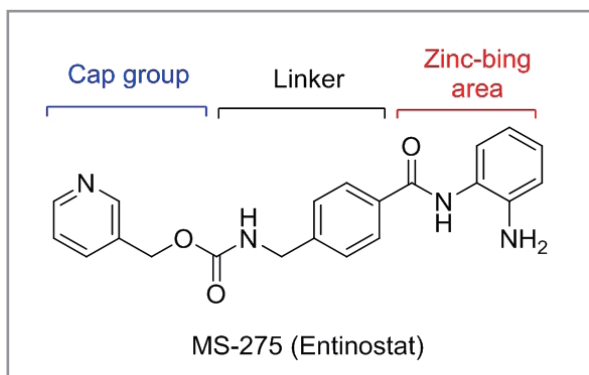


Figure 5. Structure of MS-275

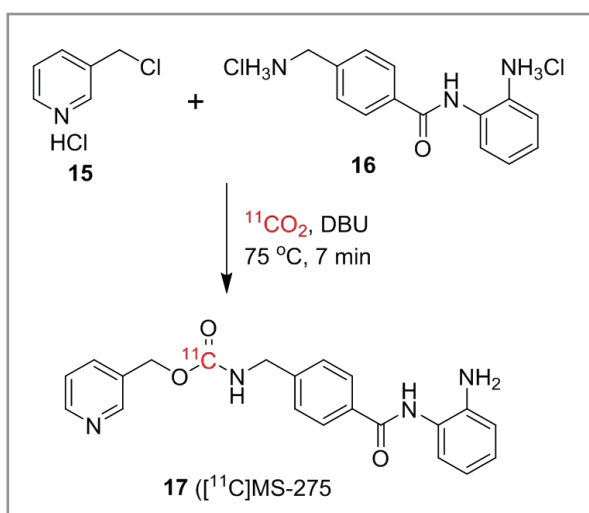


Figure 6. Synthesis of [¹¹C] MS-275

이후, Sung Won Kim와 공동연구자들은 중추신경계 (CNS)에 적용할 목적으로, 높은 잠재력이 있으며, 뇌혈관장벽 (blood brain barrier)을 통과할 수 있는 다양한 히스톤 탈아세틸화 억제제 (HDAC inhibitor)개발을 시도하였다 (24). 이 연구에서는 여러 종류의 benzamide type의 유도체(총17개)를 합성하고 방사성동위원소 (¹¹C)를 표지한 후 PET 영상 연구를 진행하였다. 새로 개발된 히스톤 탈아세틸화 억제제들은 HDAC 1과 HDAC 2에 1-100 nM의 inhibitory activity를 보여 주었고, 이 중에 유도체 (compound 19)는 현재 임상에서 사용되고 있는 MS-275나 CI-994 (Ticedinaline)보다 높은 HDAC inhibitory 효과를 보여 주었고 (Figure 7), 특히 방사성동위원소 (¹¹C)로 표지된 유도체(compound 19)를 이용하여 PET 연구를 진행한 결과, 높은 혈액-뇌 장벽 (Blood-Brain-Barrier, BBB) 통과율 (~0.015%ID/cc)을 보이며 뇌조직과 좋은 결합을 하는 것을 확인하였다. 이 연구

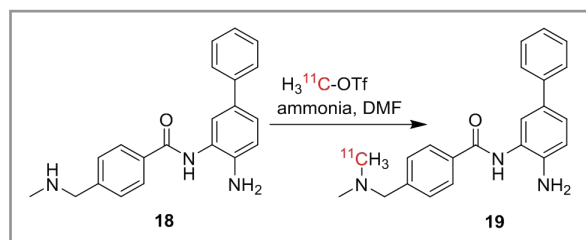


Figure 7. Synthesis of compound 19

의 결과는 혈액-뇌 장벽을 통과하여 중추신경계(CNS)에 적용할 수 있는 유용한 히스톤 탈아세틸화 억제제 개발에 효과적인 접근방법을 제시하였고, 소분자 물질에 동위원소를 사용하고 PET을 이용하는 방법이 새로운 신약 개발에 적용될 수 있음을 보여 주었다.

전체적으로 정리하면, 히스톤 탈아세틸화 억제제는 현재 여러 질병들에서 치료제로서 많이 사용되고 있다. 특히 여러 연구팀에서는 방사성동위원소가 포함된 히스톤 탈아세틸화 억제제는 합성하여, 세포실험 및 동물실험에서 그 가능성을 보여 주었다. 이러한 결과들을 종합해 보았을 때, 방사성 동위원소 (¹⁸F)이나 ¹¹C)의 표지는 여러 질병의 치료제 개발 연구에 유용하게 쓰일 수 있으며, PET 를 이용한 영상연구는 새로운 의약품 개발에 효과적으로 크게 이바지 될 수 있다. 또한 이런 방법은 멀지 않아서 환자의 진단과 치료에 보다 성공적으로 적용 될 수 있으리라 기대된다.

Acknowledgements

This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education (2018R1D1A1B07047572).

References

1. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature* 2000;403:41-45.
2. Lao VV, Grady WM. Epigenetics and colorectal cancer.

- Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011;8:686-700.
- Berger SL, Kouzarides T, Shiekhattar R, Shilatifard A. An operational definition of epigenetics. *Genes Dev* 2009;23:781-783.
 - Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone modification maps. *Nature Rev Genet* 2007;8:286-298.
 - Kornberg RD, Lorch Y. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* 1999;98:285-294.
 - Struhl K. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev* 1998;12:599-606.
 - Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 1997;389:349-352.
 - de Ruijter AJ, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg AB. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* 2003;370:737-749.
 - Richon VM, Webb Y, Merger R, Sheppard T, Jursic B, Ngo L, Civoli F, Breslow R, Rifkind RA, Marks PA. Second generation hybrid polar compounds are potent inducers of transformed cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:5705-5708.
 - Shao Y, Gao Z, Marks PA, Jiang X. Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:18030-18035.
 - Glaser KB. HDAC inhibitors: clinical update and mechanism-based potential. *Biochem Pharmacol* 2007;74:659-671.
 - Mukhopadhyay U, Tong W, Gelovani J, Alauddin M. Radiosynthesis of 6-([¹⁸F]fluoroacetamido)-1-hexanoicanilide ([¹⁸F]FAHA) for PET imaging of histone deacetylase (HDAC). *J Label Comp Radiopharm* 2006;49:997-1006.
 - Nishii R, Mukhopadhyay U, Yeh H, Sohomonyan S, Volgin A, Alauddin M, et al. Non-invasive imaging of histone deacetylase activity in human breast carcinoma xenografts in rats using positron emission tomography (PET) with [¹⁸F]FAHA. *J Nucl Med* 2007;48S2:34.
 - Nishii R, Mukhopadhyay U, Yeh H, Sohomonyan S, Volgin A, Alauddin M, et al. PET imaging of histone deacetylase activity in rat brain using 6-([¹⁸F]fluoroacetamido)-1-hexanoicanilide ([¹⁸F]FAHA). *J Nucl Med* 2007;48S2:336.
 - Reid AE, Hooker J, Shumay E, Logan J, Shea C, Kim SW, Collins S, Xu Y, Volkov N, Fowler JS. Evaluation of 6-([¹⁸F]fluoroacetamido)-1-hexanoicanilide for PET imaging of histone deacetylase in the baboon brain. *Nucl Med Biol* 2009;36:247-258.
 - Zeglis BM, Pillarsetty NVK, Divilov V, Blasberg RA, Lewis JS. The synthesis and evaluation of N¹-(4-(2-[¹⁸F]-fluoroethyl)phenyl)-N⁸-hydroxyoctanediamide ([¹⁸F]-FESAHA), A PET radiotracer designed for the delineation of histone deacetylase expression in cancer. *Nucl Med Biol* 2011;36:683-696.
 - Hendricks JA, Keliher EJ, Marinelli B, Reiner T, Weissleder R, Mazitschek R. In vivo PET imaging of histone deacetylases by ¹⁸F-suberoylanilide hydroxamic acid (¹⁸F-SAHA). *J Med Chem* 2011;54:5576-5582.
 - Yardley DA, Ismail-Khan RR, Melichar B, Lichinitser M, Munster PN, Klein PM, Cruickshank S, Miller KD, Lee MJ, Trepel JB. Randomized phase II, double-blind, placebo-controlled study of exemestane with or without entinostat in postmenopausal women with locally recurrent or metastatic estrogen receptor-positive breast cancer progressing on treatment with a nonsteroidal aromatase inhibitor. *J Clin Oncol* 2013;31:2128-2135.
 - Kiany S, Huang G, Kleinerman ES. Effect of entinostat on NK cell-mediated cytotoxicity against osteosarcoma cells and osteosarcoma lung metastasis. *Oncimmunology* 2017;6:e1333214-e1333214.
 - Jespersen H, Bagge RO, Ullenhag G, Carneiro A,

- Helgadottir H, Ljuslinder I, Levin M, All-Eriksson C, Andersson B, Stierner U, Nilsson LM, Nilsson JA, Ny L. Concomitant use of pembrolizumab and entinostat in adult patients with metastatic uveal melanoma (PEMDAC study): protocol for a multicenter phase II open label study. *BMC Cancer* 2019;19:415.
21. Azad NS, Shirai K, McRee AJ, Opyrchal M, Johnson DB, Ordentlich P, Brouwer S, Sankoh S, Schmidt EV, Meyers ML, Johnson ML, ENCORE 601: A phase 2 study of entinostat in combination with pembrolizumab in patients with microsatellite stable metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2018;36:3557-3557.
22. Mokhtari RB, Baluch N, Tsui MKH, Kumar S, Homayouni TS, Aitken K, Das B, Baruchel S, Yeger H. Acetazolamide potentiates the anti-tumor potential of HDACi, MS-275, in neuroblastoma. *BMC cancer* 2017;17:156-156.
23. Hooker JM, Kim SW, Alexoff D, Xu Y, Shea C, Reid A, Volkow N, Fowler JS. Histone deacetylase inhibitor MS-275 exhibits poor brain penetration: pharmacokinetic studies of [¹¹C]MS-275 using positron emission tomography. *ACS Chem Neurosci* 2010;1:65–73.
24. Seo YJ, Kang Y, Muench L, Reid A, Caesar S, Jean L, Wagner F, Holson E, Haggarty SJ, Weiss P, King P, Carter P, Volkow ND, Fowler JS, Hooker JM, Kim SW. Image-guided synthesis reveals potent blood-brain barrier permeable histone deacetylase inhibitors. *ACS Chem Neurosci* 2014;5:588–596.