

***In vivo*-Tumorbiologie mittels ^{68}Ga -PET: Beurteilung der
p-Glykoprotein-Aktivität in Weichgewebe-Tumoren sowie
Diagnose und Therapie von Knochenmetastasen**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
im Promotionsfach Chemie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Marco Fellner

geb. in Mainz

Mainz, Dezember 2010

Kurzzusammenfassung

Krebs ist eine der häufigsten Krankheiten und stellt eine der wichtigsten medizinischen Herausforderungen des 21. Jahrhunderts dar. Eine frühzeitige Diagnose ist dabei essentiell für eine individuell angepasste Therapie zur Verbesserung der Lebensqualität und -erwartung der Patienten. Hierbei kommen der $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generator und das daraus resultierende PET-Nuklid ^{68}Ga immer stärker in den Fokus von Wissenschaft und Medizin.

Für eine erfolgreiche Therapie stellt die Chemoresistenz (Multi-Drug-Resistance) zahlreicher Tumore eine schwerwiegende Komplikation dar. Für das Therapieversagen ist die Aktivierung des Transportproteins p-Glykoprotein (pGP) maßgeblich mit verantwortlich. Mit Hilfe der Schiff'schen Base [^{68}Ga]MFL6.MZ konnte die Aktivitätsänderung von pGP unter verschiedener Beeinflussung erstmals *in vivo* beobachtet werden. So zeigte sich, dass sich unter azidotischen Bedingungen in Tumoren die Aktivität des pGP erhöht und somit vermehrt auch Zytostatika, die pGP-Substrate sind, aus den Tumoren transportiert werden. Durch Aufklärung der Abhängigkeit der pGP-Aktivität von dessen Signalkaskade konnte gezeigt werden, dass durch eine Blockade der MAP-Kinase p38 eine Erniedrigung der pGP-Aktivität zu verzeichnen ist. Die ebenfalls in der Signalkaskade eingebundene MAP-Kinase ERK1/2 hingegen spielt hier nur eine untergeordnete Rolle.

Neben dem Versagen der Chemotherapie stellt auch die Metastasierung eines Malignoms massive Einschnitte in die Lebensqualität von Erkrankten dar. Befallen die Metastasen das Skelett eines Menschen, wird dies zumeist erst spät registriert. ^{68}Ga -markierte Bisphosphonate bieten nun die Möglichkeit, Patienten quantitativ auf Knochenmetastasen hin untersuchen zu können. So konnten zu Beginn einfache Phosphonate wie EDTMP und DOTP nicht die nötige *in vivo* Stabilität bzw. hohe radiochemische Ausbeuten liefern und sind damit für die Anwendung am Menschen uninteressant. Jedoch die DOTA-basierten Bisphosphonate allen voran der Ligand BPAMD zeigen ein großes Potential. *In vivo*-Versuche an Ratten mit Knochenmetastasen zeigten, dass sich [^{68}Ga]BPAMD an den Metastasen anreichert und einen sehr guten Kontrast zum gesunden Knochen darstellt. Der Tracer konnte erstmals am Menschen angewendet werden und zeigte in ausgewählten Regionen eine höhere Anreicherung als eine zuvor durchgeführte PET-Aufnahme mit [^{18}F]Fluorid. Der Ligand BPAMD bietet außerdem den Vorteil, neben ^{68}Ga auch andere dreiwertige Radionuklide wie das therapeutische ^{177}Lu komplexieren zu können. Durch Studien zur Komplexbildung und Stabilität konnte auch [^{177}Lu]BPAMD in der klinischen Anwendung erprobt werden und zeigte eine Anreicherung an den Knochenmetastasen. So ist es nun möglich, Knochenmetastasen mittels ^{68}Ga -PET zu diagnostizieren, eine entsprechende Dosisberechnung anzustellen und anschließend mit dem gleichen Liganden eine Therapie mit [^{177}Lu]BPAMD durchzuführen.

Abstract

Cancer is one of the most relevant diseases and a major challenge for medicine in the 21. century. An early diagnosis followed by an individual adapted therapy is essential for the enhancement of the patient's quality and expectation of life. From this background the $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generator with the resulting PET-nuclide ^{68}Ga comes into focus of modern research and medicine.

Chemo resistance (multi-drug resistance) is a major complication for a successful therapy. This resistance is mainly caused by the activation of the transport protein p-Glycoprotein (pGP). By use of the Schiff base [^{68}Ga]MFL6.MZ the change in activation of pGP implied by different influences was investigated for the first time *in vivo*. It was shown that the acidic environment in tumours markedly increases the activity of pGP. Therefore many cytostatic drugs, which are substrates of pGP, are transported out of the tumour cells. A closer insight in the signalling cascade of pGP demonstrated the role of two MAP-kinases, namely p38 and ERK1/2. With the tracer [^{68}Ga]MFL6.MZ the blocking of the MAP-kinases revealed that p38 has a higher impact in activation of pGP than the ERK1/2 MAP-kinase.

Beside chemo resistance a second major problem of cancer is metastatic disease especially in bones. As bone metastases are recognized rather late in a tumour disease they are a major drawback in people's quality of life. ^{68}Ga -labelled phosphonates give the opportunity to examine patients suffering from bone metastases. At the beginning simple phosphonates such as EDTMP and DOTP showed limited *in vivo* stability respectively low radiochemical yield. Therefore these are not interesting for human application. However, new DOTA-like bisphosphonates particularly the ligand BPAMD exhibit very high potential. In *in vivo* experiments on tumour bearing rats high uptake of the tracer on bone metastases as well as high contrast to healthy bone was demonstrated. Furthermore in a first human trial [^{68}Ga]BPAMD showed even higher SUV values on selected regions compared to a [^{18}F]fluoride PET image. The ligand BPAMD has a second benefit. By substitution of the diagnostic nuclide ^{68}Ga by ^{177}Lu it can be interesting for radionuclide therapy. After studying the complex formation and stability of [^{177}Lu]BPAMD this therapeutic drug was also investigated in a human experiment and showed high uptake on bone lesions. In conclusion it is now possible to diagnose bone metastases first with [^{68}Ga]BPAMD, secondly have a precise dose calculation and finally use the same ligand for radionuclide therapy with [^{177}Lu]BPAMD.

„Natur ist weder Kern noch Schale, alles ist sie mit einem Male.“

Max Planck (1858-1947)

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	11
1.1	p-Glykoprotein-Aktivität in Organen und Tumoren	13
1.1.1	Aufbau und Funktion von p-Glykoprotein.....	13
1.1.2	Veränderungen der pGP-Aktivität.....	15
1.1.3	Verapamil als Tracer.....	17
1.1.4	Weitere Verbindungen als Tracer	19
1.1.5	Metall-basierte Tracer.....	20
1.1.5.1	^{99m} Tc-Ligand Komplexe.....	20
1.1.5.2	⁶⁸ Ga für die Positronen-Emissions-Tomographie.....	21
1.1.5.3	[^{67/68} Ga]3-ethoxy-ENBDMPI.....	22
1.2	Bildung, Diagnose und Therapie von Knochenmetastasen	24
1.2.1	Aufbau des Knochens.....	24
1.2.2	Knochenmetastasen.....	26
1.2.2.1	Entstehung von Knochenmetastasen.....	26
1.2.2.2	Bedeutung von Knochenmetastasen für den Patienten	27
1.2.3	Diagnostik.....	28
1.2.4	Therapie	32
1.3	Literatur	33
2	Problemstellung	40
3	Manuskripte	42
3.1	Assessing p-Glycoprotein (Pgp) Activity <i>In vivo</i> Utilizing ⁶⁸ Ga-Schiff Base Complexes	43
3.2	Activation of P-glycoprotein (Pgp)-mediated drug efflux by extracellular acidosis: <i>in vivo</i> imaging with ⁶⁸ Ga-labelled PET tracer	66
3.3	Einfluss der Chiralität auf das Transportvermögen von [⁶⁸ Ga]MFL6.MZ durch p-Glykoprotein	85
3.4	Comparison of different phosphorus-containing ligands complexing ⁶⁸ Ga for PET-imaging of bone metabolism	96

3.5	⁶⁸ Ga-BPAMD: PET-imaging of bone metastases with a generator based positron emitter	119
3.6	PET/CT imaging of osteoblastic bone metastases with ⁶⁸ Ga-bisphosphonates: first human study	137
3.7	[¹⁷⁷ Lu]BPAMD: therapy of bone metastases with a highly potent DOTA-conjugated bisphosphonate ligand also usable for quantitative imaging via PET/CT	141
4	Zusammenfassung und Ausblick.....	152
4.1	p-Glykoprotein-Aktivität <i>in vivo</i> im Zusammenhang mit dem Versagen einer Chemotherapie	152
4.2	Diagnose und Therapie von Knochenmetastasen mittels ⁶⁸ Ga und ¹⁷⁷ Lu-markierter Phosphonate	157
4.3	Zusammenfassung.....	164
4.4	Literatur.....	165
5	Anlage.....	167
5.1	Abkürzungsverzeichnis	167
5.2	Abbildungsverzeichnis	168
5.3	Tabellenverzeichnis	169
6	Danksagung Fehler! Textmarke nicht definiert.	
7	Curriculum Vitae Fehler! Textmarke nicht definiert.	

1 Einleitung

Krebs ist eine ernsthafte und komplexe Erkrankung der Menschen mit vielen verschiedenen Ausprägungen und Krankheitsbildern. Durch diesen Tatbestand kann aus keine generelle Aussage über die Lebenserwartung bzw. die Heilungschancen getroffen werden. Nicht in jedem Fall kann die Krankheit erfolgreich therapiert werden. So stellen Malignome die zweithäufigste Todesursache in Deutschland nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen dar. Mit 26 % stirbt demnach - trotz aller Fortschritte der diagnostischen und therapeutischen Medizin der letzten Jahre - noch jeder Vierte an Krebs [1].

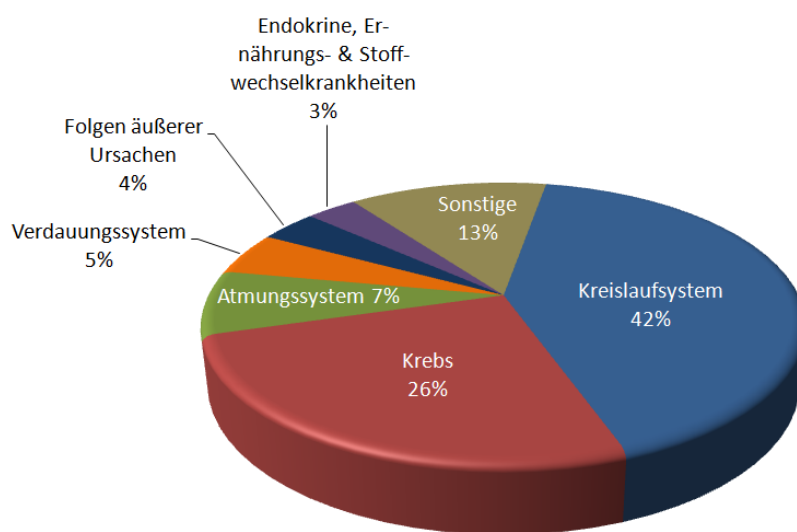


Abb. 1: Prozentualer Anteil der Todesursache verschiedener Erkrankungen in Deutschland; wiedergegeben nach Daten des Statistischen Bundesamtes für das Jahr 2009 [1]

Dies bedeutet, dass im Jahr 2009 in Deutschland 222.153 Menschen an den Folgen eines Malignom starben.

Die Angaben aus Deutschland sind in Einklang mit anderen Ländern hohen Lebensstandards und entsprechend ausgebauten Gesundheitssystemen. Weltweit betrachtet, rangiert Krebs auf Platz 3 der Todesursachen nach Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems sowie Infektionen und parasitären Erkrankungen wie Abb. 2 zeigt [2].

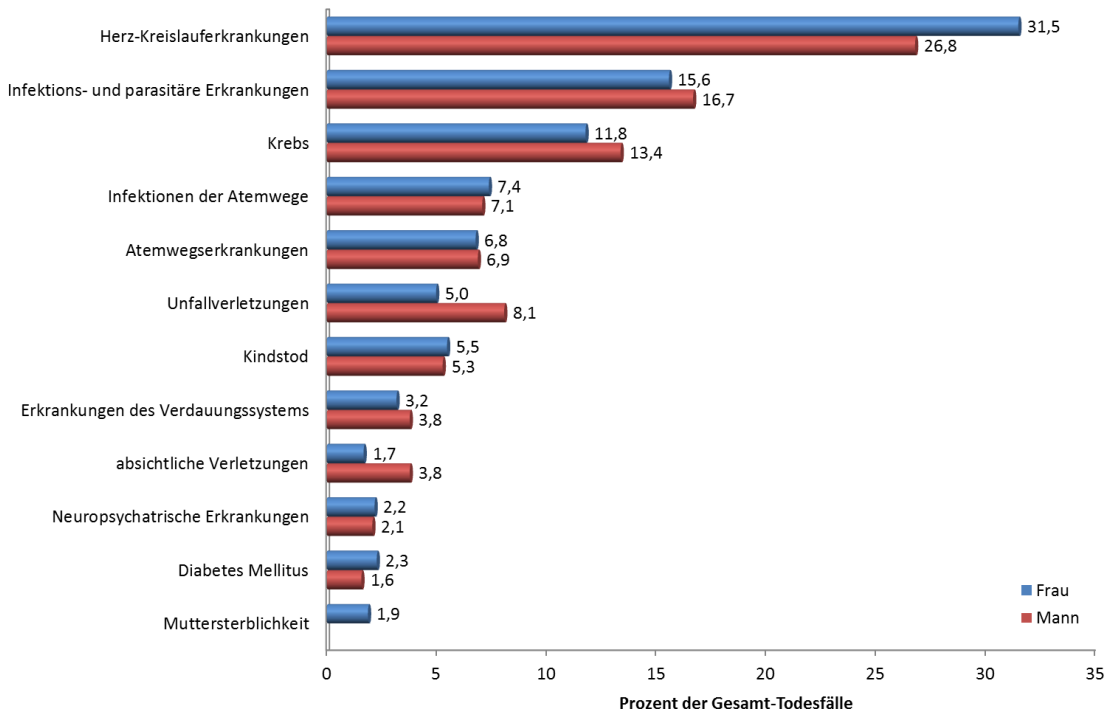


Abb. 2: Prozentualer Anteil der Todesursache verschiedener Erkrankungen weltweit; Wiedergabe aus den Berichten (The Global Burden of Diseases) der WHO [2]

Hochrechnungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) aus dem Jahr 2004 [3] für die Jahre 2008 und 2030 prognostizieren, dass die Zahl der Todesfälle prozentual weltweit in den kommenden 20 Jahren durch die zunehmend bessere medizinische Versorgung leicht sinken wird, dafür steigen jedoch der prozentuale Anteil sowie die absolute Zahl der an Krebs sterbenden Menschen. Es wird davon ausgegangen, dass die Zahl der Todesfälle durch Krebs von 8,1 Mio im Jahr 2008 auf fast 12 Mio in 2030 steigen könnte.

Tab. 1: Hochrechnung der prozentualen Todeshäufigkeit aus 2004 für die Jahre 2008 und 2030; Ausschnitt wiedergegeben aus den Tabellen der WHO [3,4]

	Jahr 2008 [in Tausend]		Jahr 2030 [in Tausend]	
Welt-Bevölkerung	6.700.628		8.110.599	
Todesfälle gesamt	58.766	0,88 %	67.790	0,84 %
davon an Krebs	8.097	13,78 %	11.928	17,60 %
EU-Bevölkerung	878.085		852.974	
Todesfälle gesamt	9.746	1,11 %	9.501	1,11 %
davon an Krebs	1.931	19,81 %	2.111	22,22 %

Die Bekämpfung der Krebserkrankungen stellt damit ein zentrales Ziel der aktuellen wie zukünftigen Forschung und Entwicklung auf dem Pharmasektor dar. Hierbei muss zwischen einer großen Anzahl sehr verschiedener Krebserkrankungen unterschieden werden, sowohl was die Ursache und das ursprünglich betroffene Organ betrifft, als auch den weiteren Krankheitsverlauf. Wissenschaftler des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) Heidelberg gehen davon aus, dass „Krebs in 15 bis 20 Jahren die Todesursache Nummer Eins in Deutschland“ ist, sofern nicht maßgebliche Erfolge auf dem Gebiet der Krebsprävention zu verzeichnen sind [5].

1.1 p-Glykoprotein-Aktivität in Organen und Tumoren

1.1.1 Aufbau und Funktion von p-Glykoprotein

Konventionelle Krebstherapie beinhaltet neben einer operativen Entfernung oder einer externen Bestrahlung oftmals die Anwendung von Chemotherapeutika (Zytostatika) [6]. Jedoch zeigt eine Chemotherapie nicht immer den erhofften Effekt des Zellsterbens der Tumorzellen. Dieses Fehlschlagen der Therapie wird oft in Zusammenhang mit der Multi-Drug Resistance (MDR) von Tumoren gebracht. Hierbei spielen verschiedene Transportproteine eine wichtige Rolle, die die Zytostatika aus den Tumorzellen heraustransportieren und somit deren Wirkung verhindern. Das zur Zeit meist diskutierte unter diesen Transportproteinen ist p-Glykoprotein (pGP).

pGP ist ein Produkt des MDR1-Gens, das beim Menschen auf Chromosom 7 sitzt, und gehört zur Familie der ABC-Transporter (ATP-Binding Cassette). Das Transmembranprotein besteht aus 2 gleichen Hälften, von denen jede 6 Transmembrandomänen und 2 intrazelluläre ATP-Bindungsstellen an den Nukleotid-Bindungs-Domänen (NBD) beinhaltet (Abb. 3) [7].

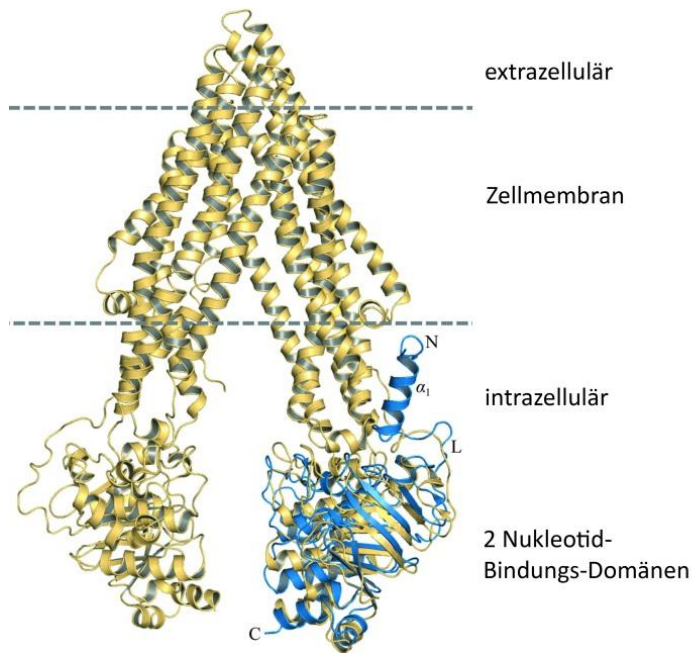


Abb. 3: Molekulares Model von pGP in planarer Ansicht in der Zellmembran mit den beiden Nukleotid-Bindungs-Domänen (NBD) im intrazellulären Raum (unten links gelb, rechts blau) [8]

Unter ATP-Verbrauch transportiert das 170-180 kDa schwere Protein zahlreiche Xenobiotika (z.B. zytotoxische Verbindungen) aus der Zelle (Abb. 4). Zu den Substraten des pGP gehören u.a. zahlreiche Chemotherapeutika wie z.B. Daunorubicin, Paclitaxel, Vincristin. In Tumoren wird hierdurch der intrazelluläre Wirkstoffspiegel der Medikamente vermindert und es entsteht eine Chemoresistenz, sodass die Chemotherapeutika nicht ihre maximale Wirksamkeit entfalten können [9,10,11]. Neben konstitutionellen Unterschieden in der Expression der ABC-Transporter zwischen einzelnen Normalgeweben bzw. Tumorentitäten deuten experimentelle Befunde darauf, dass die Expression oder eventuell die Aktivität dieser Transporter einer funktionellen Regulation unterliegen. So wurde gezeigt, dass Zytokine (INF- γ , IL-1 β , IL-6 und TNF- α) die Expression, aber auch die Transportleistung des pGP beeinflussen [12].

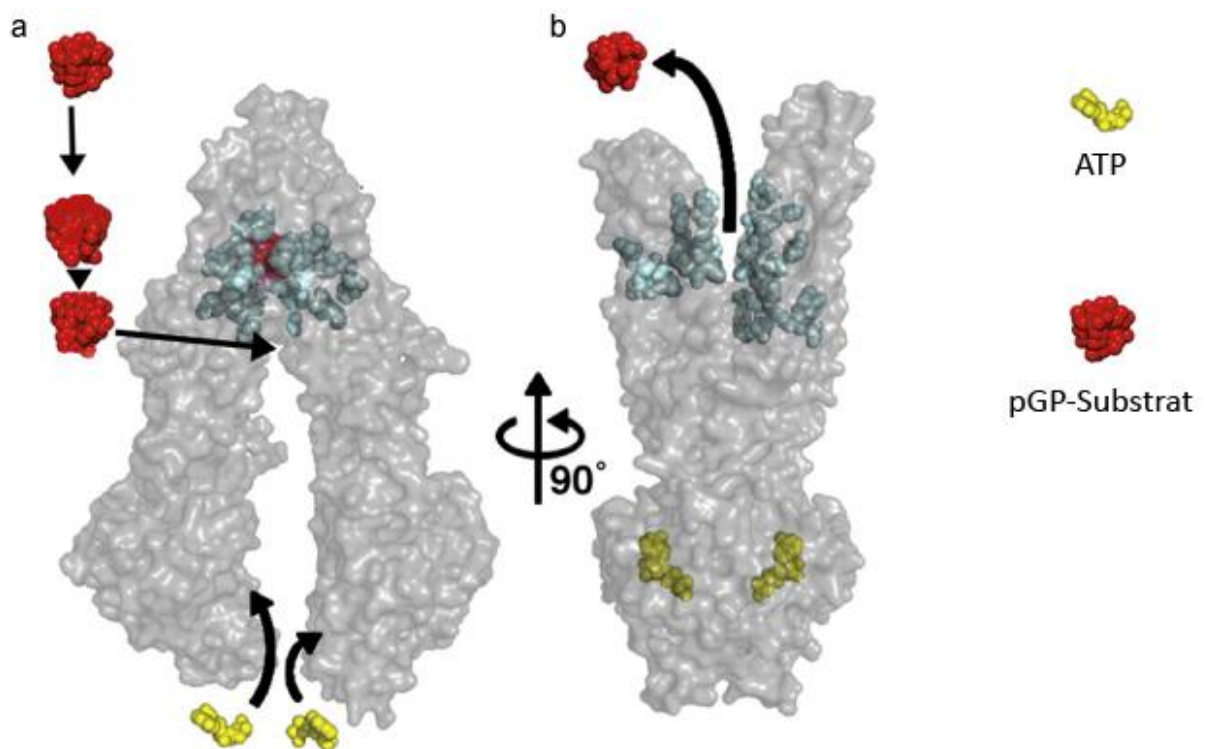


Abb. 4: Schematische Funktion von pGP in der Zellmembran zum Transport von Toxinen aus der Zelle unter ATP-Verbrauch [13]: Substratmoleküle (rot) gelangen in eine Kavität umgeben von Aminosäuren (cyan), die eine große Bandbreite von Molekülen binden. ATP (gelb) bindet an die NBDs und verursacht eine Konformationsänderung, wodurch das Substrat der Außenseite der Zelle exponiert wird.

1.1.2 Veränderungen der pGP-Aktivität

Darer hinaus gibt es Hinweise dafür, dass auch Parameter des metabolischen Mikromilieus von Tumoren die funktionelle Aktivität des pGP beeinflussen. Solide wachsende Tumoren unterscheiden sich gegenüber dem umgebenden Normalgewebe nicht nur bezüglich morphologischer und histopathologischer Eigenschaften, sondern auch maßgeblich in physiologischen Charakteristika auf zellulärer sowie Gewebeebe. Diese physiologischen Funktionsparameter umfassen Eigenschaften der Mikrozirkulation, des interstitiellen Transports, der Sauerstoff- und Substratversorgung, des Tumor-pH, der Entsorgung von Stoffwechselendprodukten sowie des bioenergetischen Status. Diese Faktoren sind funktionell eng miteinander verknüpft und bilden ein komplexes Netzwerk, das sog. metabolische Mikromilieu. Dieses metabolische Mikromilieu ist in Tumoren zumeist grundlegend verschieden von dem des umgebenden Normalgewebes (für eine Übersicht siehe [14,15]) als Folge morphologischer und funktioneller Besonderheiten der Tumolvaskularisierung. Daneben tragen auch funktionell-metabolische Besonderheiten der einzelnen Tumorzellen zu dem veränderten

Mikromilieu dieser Gewebe bei. So ist seit WARBURG [16] bekannt, dass viele Tumorzelllinien trotz ausreichender O₂-Versorgung auch glykolytischen Stoffwechsel betreiben, sodass in vielen solide wachsenden Tumoren der extrazelluläre pH-Wert deutlich niedriger als im umgebenden Normalgewebe ist [14]. Auch liegt in vielen experimentellen und humanen Tumoren ein stark erniedrigter O₂-Partialdruck (pO₂) vor.

Insbesondere die Tumoroxygenierung schränkt die Wirksamkeit ionisierender Strahlung [17,18], aber auch verschiedener Chemotherapeutika ein [19,20,21]. Als Ursache für die verminderte Chemosensitivität unter Hypoxie-Bedingungen werden sowohl direkte O₂-Effekte (z.B. Hypoxie-bedingter Zellzyklusarrest in der G₁-Phase) [22] als auch indirekte Effekte über die extrazelluläre Tumoralzidose (Beeinflussung der Aufnahme in die Zelle bei Chemotherapeutika, die selbst schwache Säuren oder Basen sind) [23,24], diskutiert.

Aktuelle Zellkultur-Experimente [25,26] konnten eindeutig belegen, dass die Erhöhung der extrazellulären Protonenkonzentration zu einer deutlichen Steigerung der pGP-Aktivität führt, wobei durch eine Absenkung des pH-Wertes von 7,4 auf 6,6 es zu mehr als einer Verdopplung der Transportrate kam. Hieraus resultierte eine deutliche Reduktion der Zytotoxizität von Chemotherapeutika, die ein Substrat für das p-Glykoprotein darstellen [25].

Neben Tumorzellen exprimieren jedoch auch zahlreiche Normalgewebe die ABC-Transporter. So lassen sich verschiedene Vertreter dieser Proteinfamilie in zahlreichen Nierenepithelzellen nachweisen, wo sie eine wichtige Funktion bei der Entgiftung von Xenobiotika spielen. Außerdem sind diese Transporter in der Plazenta sowie in der Blut-Hirn-Schranke (BHS) aktiv. In der BHS transportiert das pGP Neurotoxine aus dem Gehirn. Auf diese Art kommen allerdings auch Medikamente mit positiven Eigenschaften aus dem Blut nicht zu ihrem Ziel. pGP beseitigt Substanzen, die trotz intakter BHS meist über nichtspezifische hydrophobe Wege in das Gehirn gelangen konnten. So wird pGP unter anderem auch für einen Teilprozess der Alzheimer-Demenz verantwortlich gemacht. Ein Kennzeichen der Alzheimer-Demenz ist die Ablagerung von Amyloid- β (A β), einem aus 39 bis 43 bestehenden Aminosäuren langen Peptids, im Gehirn in Form von Plaques. Jüngste Studien haben gezeigt, dass Amyloid- β ein Substrat für pGP ist [27,28,29] und von diesem aus dem Gehirn transportiert wird. Neben der Alzheimer-Demenz wird es auch in Zusammenhang mit der Kreuzfeld-Jakob-Krankheit gebracht [30], bei der eine niedrigere Expression des Transportproteins gefunden wurde.

Diese biologischen Bereiche, in denen die Aktivität des p-Glykoproteins für das Krankheitsgeschehen und die Therapieeffektivität von großer Bedeutung sind, machen die Notwendigkeit der nicht-

invasiven *in vivo*-Messung der pGP-Transportleistung deutlich. So könnten Patienten identifiziert werden, die eine funktionelle Transport-Über- oder Unteraktivität zeigen, wodurch die Prognose der Erkrankung beeinflusst wird. Außerdem können prätherapeutisch Patienten erkannt werden, die beispielsweise einer aggressiveren Chemotherapie bedürfen oder bei denen sogar andere Therapiemodalitäten (z.B. Strahlentherapie) vorzuziehen sind. Die Messung der pGP-Aktivität *in vivo* würde darüber hinaus die Forschung bei der Suche nach wirksamen Inhibitoren des p-Glykoproteins zur Effektivitätssteigerung der Chemotherapie stark verbessern. Außerdem könnte die Erfassung der pGP-Aktivität auf (mikro-)regionaler Ebene eine individuelle Risikoerfassung und Therapiewahl in unterschiedlichen medizinischen Bereichen (Onkologie, Neurologie) ermöglichen. Bisher wurde hierfür eine Zahl verschiedener Verbindungen identifiziert, die pGP-Substrate sind. Gleichzeitig sind dies häufig auch ursprüngliche Chemotherapeutika, die nun zur Bildgebung benutzt werden können.

1.1.3 Verapamil als Tracer

Verapamil, ein Medikament zur Behandlung von Hypertonie, ist ein Substrat für pGP. Markiert mit Tritium wurde es zuerst *in vitro* erforscht [31]. Zur Bildgebung wurde das Molekül an der N-Methyl-Position mit ^{11}C markiert und konnte so in PET-Experimenten genutzt werden.

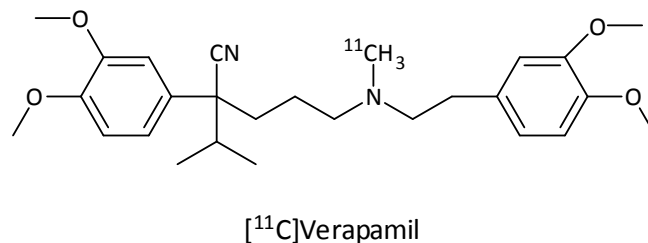


Abb. 5: [^{11}C]Verapamil

[^{11}C]Verapamil zeigte eine zehnfach erhöhte Aktivität im Gehirn von pGP-KO-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. In einer kürzlich erfolgten Studie mit einem racemischen Gemisch von (R)-[^{11}C]Verapamil und (S)-[^{11}C]Verapamil wurde beispielsweise die pGP-Funktion von Luurtsema et al. untersucht [32]. Obwohl beide Isomere transportiert werden, ist das enantiomerenreine (R)-[^{11}C]Verapamil dem (S)-[^{11}C]Verapamil überlegen durch eine geringere Metabolisierungsrate und niedrigere Plasmaproteinbindung bei ähnlicher pGP-Transportrate.

Da [^{11}C]Verapamil aktiv durch pGP auch aus dem Gehirn transportiert wird, kann die Volumenverteilung (V_d) von [^{11}C]Verapamil im Gehirn als Umkehrfunktion für die Aktivität von pGP

verwendet werden. Ein größerer V_d -Wert spiegelt eine verringerte pGP-Funktion an der Blut-Hirn-Schranke wieder [33]. Eine Pilotstudie mit dem reinen Enantiomer (R)- ^{11}C Verapamil zeigte, dass der V_d -Wert für ältere gesunde Menschen höher ist als bei jungen gesunden Menschen.

Ein weiterer bekannter Hemmstoff für pGP ist Cyclosporin A (CsA). Dauer und Grad von CsA-induzierter pGP-Hemmung in der BHS von Ratten wurden mit narkotisierten Ratten mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET) untersucht, denen ^{11}C Verapamil verabreicht wurde. Die Hemmung von pGP wurde als schneller Anstieg der Konzentration von ^{11}C Verapamil im Gehirn beobachtet, mit einem Dosis-abhängigen Maximum nach ungefähr 10 Minuten und einer maximal 4-mal so hohen Konzentration von ^{11}C Verapamil gegenüber der Grundkonzentration. Ein Modell, in dem der Transport von ^{11}C Verapamil aus dem Gehirn durch CsA-gehemmtes pGP verringert war, zeigte die beste Anpassung (Abb. 6 + Abb. 7).

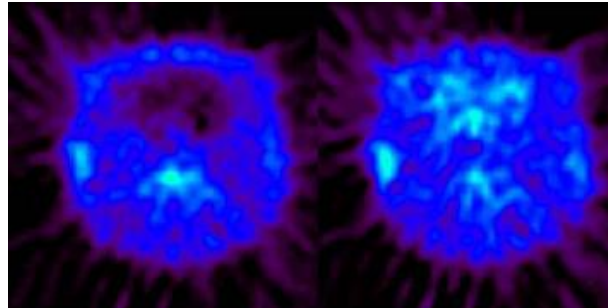


Abb. 6: μPET einer Ratte in transversaler Schnittebene durch den Kopf: Vor (links) und nach (rechts) der Gabe von 25 mg/kg CsA ist zu sehen, dass pGP ^{11}C Verapamil aus dem Gehirn transportiert. Die Konzentration von ^{11}C Verapamil ist im umgebenden Gewebe höher als im Gehirn [34].

Die Hemmung von pGP durch CsA ist ein schneller Prozess. Innerhalb weniger Minuten wird pGP durch CsA blockiert und ^{11}C Verapamil reichert sich im Gehirn an. Aber auch der reversible Prozess ist schnell. Verringert sich die CsA-Konzentration im Gehirn wird auch ^{11}C Verapamil wieder stärker abtransportiert aus dem Gehirn. Es ist nicht die Konzentration von CsA im Blut, die für die pGP-Hemmung verantwortlich ist, sondern die Konzentration in einem bestimmten Bereich, wahrscheinlich den Endothelzellen der BHS. Daher ist es von großer Bedeutung, die Dynamik der Hemmung in der Studie zu berücksichtigen. Studien zu Zell-Transportern sollten daher vorzugsweise mit stationärer Konzentration des Markers in Konkurrenz mit dem Inhibitor durchgeführt werden.

In Ratten erhöhte sich das Verhältnis der Aktivität von ^3H Verapamil von Gehirn zu Blut 20 Minuten nach Gabe von der radioaktiven Verbindung auf 75 % [31], vergleichbar zu den Ergebnissen, die bei

Menschen unter Applikation von [^{11}C]Verapamil festgestellt wurden [35]. Zusätzlich wiesen Ratten einen CsA-Dosis-abhängigen Effekt auf mit einer Steigerung der Gehirn:Blut-Konzentration von [^3H]Verapamil. Dieses Resultat deckt sich mit Ergebnissen bei Mäusen [36]. Verwendet man [^{11}C]Verapamil als pGP-Substrat und CsA als Inhibitor findet man auch bei Menschen eine Erhöhung der Gehirn:Blut-Verhältnisse (AUC: area under the curve) von 88%.

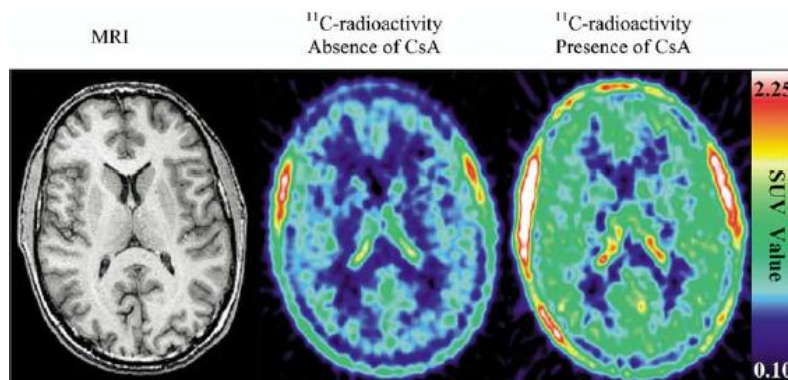


Abb. 7: PET-Aufnahmen eines gesunden menschlichen Gehirns nach [^{11}C]Verapamil-Gabe in Abwesenheit bzw. Anwesenheit von CsA zeigen eine erhöhte lokale Aufnahme (grüne zu roten Gebieten) von ^{11}C -Radioaktivität bei Anwesenheit von CsA. Die Aufnahmen sind als SUV-Werte (Standard Uptake Value) über eine Zeit von 5 bis 25 Minuten summiert. [35]

1.1.4 Weitere Verbindungen als Tracer

Basierend auf Strukturen bekannter pGP-Substrate wurden verschiedene ^{11}C -markierte PET-Verbindungen wie [^{11}C]Colchicin, [^{11}C]Daunorubicin und [^{11}C]Paclitaxel berichtet [37,38,39].

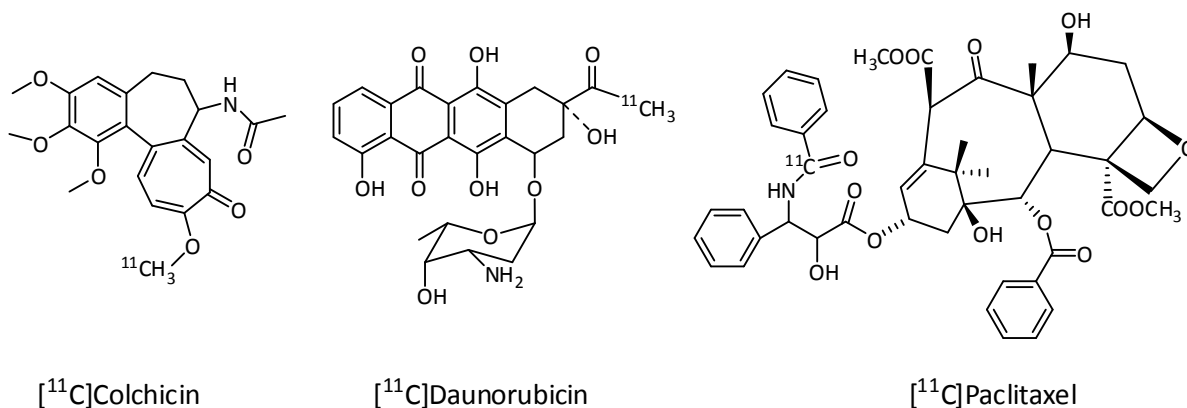


Abb. 8: [^{11}C]Colchicin, [^{11}C]Daunorubicin und [^{11}C]Paclitaxel

1.1.5 Metall-basierte Tracer

Neben den ^{11}C -markierten Verbindungen wurden allerdings auch metallbasierte Moleküle als pGP-Substrate identifiziert. Hierzu gehören verschiedene SPECT-Radiopharmaka, die mit $^{99\text{m}}\text{Tc}$ markiert sind. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ besitzt eine Halbwertszeit von 6 h, die für die meisten biologischen Fragestellungen geeignet ist. Unter Gammaemission ($E_\gamma = 140 \text{ keV}$) geht das $^{99\text{m}}\text{Tc}$ in seinen Grundzustand ^{99}Tc über [40]. Es eignet sich daher sehr gut zur Einzel-Photonen-Emissions-Tomographie (SPECT). Mit Hilfe eines Generatorsystems, bei dem das Mutternuklid ^{99}Mo ($T_{1/2} = 2,75 \text{ d}$) auf einer festen Phase aufgebracht wird, die die Elution des reinen Zerfallsproduktes $^{99\text{m}}\text{Tc}$ in Form von $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$ in einer geeigneten Lösung erlaubt, lässt sich $^{99\text{m}}\text{Tc}$ leicht verfügbar halten und vor Ort für regelmäßige Untersuchungen anwenden.

1.1.5.1 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Ligand Komplexe

Verschiedene SPECT Radiopharmaka, beispielsweise $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Sestamibi}$, $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tetrofosmin}$, $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Furifosmin}$, $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Q12}$ und $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{COMIBI}$ ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tricarbonyl-tris(2-methoxyisobutyl-isonitril)) [41,42] konnten als Transportsubstrate für pGP nachgewiesen werden und bieten so den Ansatz einer nichtinvasiven Bildgebung pGP-vermittelter Transporte.

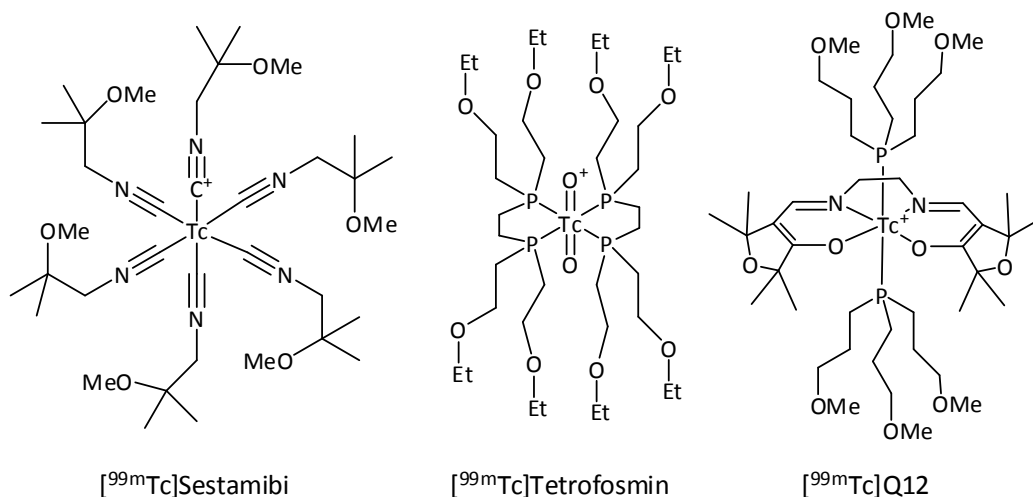


Abb. 9: $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Sestamibi}$, $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tetrofosmin}$ und $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Q12}$

Diese Verbindungen können die Transportaktivität von pGP in normalem menschlichem Gewebe bildlich darstellen [43, 44, 45, 46, 47]. Sie können als Marker für die Wirksamkeit von Chemotherapeutika bei Brustkrebs, Lungenkrebs, Lymphoma und Osteosarkoma dienen [48,49,50,51].

1.1.5.2 ^{68}Ga für die Positronen-Emissions-Tomographie

In den letzten Jahren kam es immer wieder zu weltweiten Versorgungsengpässen mit $^{99\text{m}}\text{Tc}$, so dass nicht mehr jede Untersuchung zeitnah durchgeführt werden konnte. So kommt der $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generatorsystem stärker in den Fokus der diagnostischen Medizin. Dieser Generator stellt ein hervorragendes Gegenstück zum etablierten $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Generator dar, um damit die Vorteile der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) gegenüber der SPECT nutzbar zu machen. Hierbei bietet die PET – im Unterschied zur SPECT - eine höhere räumliche sowie zeitliche Auflösung und erlaubt darüber hinaus die Quantifizierung der gefundenen Aktivitätsverteilung.

Die Halbwertszeit des Mutternuklids ^{68}Ge beträgt 270,8 Tage, die der Tochter 67,7 Minuten. Ein Generator kann praktisch für mehr als ein Jahr eingesetzt werden, wodurch sich die Kosten pro Untersuchung drastisch verringern. Die Halbwertszeit der Tochter ermöglicht mehrere Elutionsvorgänge mit vergleichbar hoher Aktivität pro Tag, so dass ohne großen Planungsaufwand regelmäßig über den Tag verteilte Untersuchungen durchgeführt werden können.

Das Tochternuklid ^{68}Ga besitzt herausragende Zerfallseigenschaften (89 % β^+ , $E_{\beta\text{max}} = 1,9 \text{ MeV}$) und eine Halbwertszeit, die mit 67,7 min günstig zwischen der des ^{11}C (20,4 min) und des ^{18}F (110 min) liegt. In der klinischen Anwendung hat sich beispielsweise das [^{68}Ga]DOTATOC (Abb. 10), ein mit Gallium markierter, DOTA-konjugierter peptidischer Somatostatin-Rezeptorligand zur Diagnostik neuroendokriner Tumore bestens bewährt (Abb. 11). Für diese Anwendung wird ^{68}Ga bereits an mehreren Standorten weltweit eingesetzt.

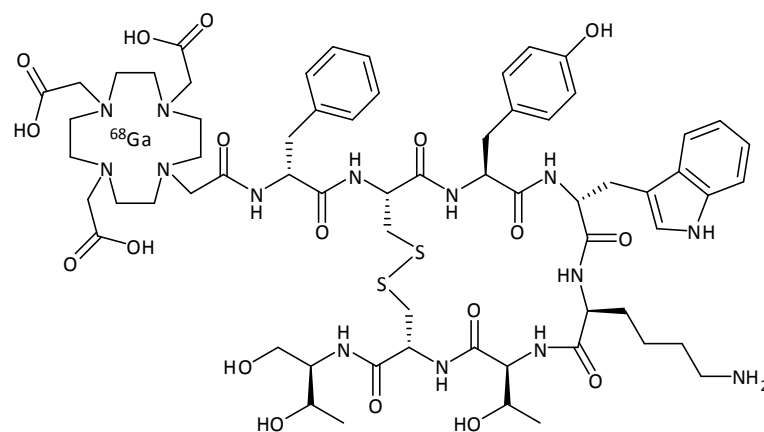


Abb. 10: [^{68}Ga]DOTATOC

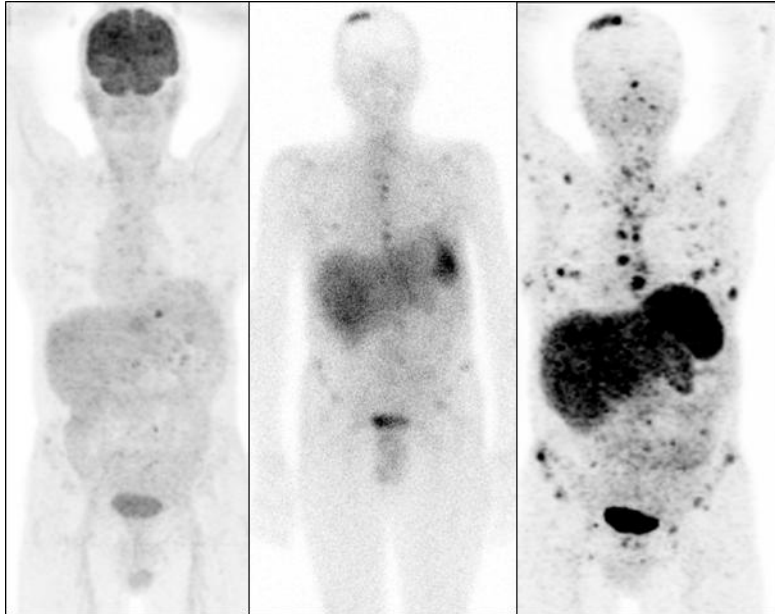


Abb. 11: Visualisierung neuroendokriner Tumore mit [^{18}F]FDG (links), [^{111}In]Octreoscan und [^{68}Ga]DOTATOC (rechts) (Katharinenhospital Stuttgart, Bihl et al.)

1.1.5.3 [$^{67/68}\text{Ga}$]3-ethoxy-ENBDMPI

Ausgehend von dem Konzept, dass radioaktive $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Komplexe als pGP- bzw. MDR-Sonden funktionieren, untersuchten SHARMA et al. 2000 [52] verschiedene Ga(III)-Komplexe. Sie berichten, dass monokationische, hydrophobe Ga(III)-Verbindungen mit oktaedrischer Koordination durch einen N_4O_2 -Donor in den intrazellulären Bereich diffundieren können und sich, in Abwesenheit von pGP, dort durch elektrochemische Antriebskräfte anreichern. Hydrophobizität und pharmakologische Aktivität können durch Variation von Substituenten an der Peripherie des Moleküls kontrolliert werden, ohne dabei den koordinierenden N_4O_2 -Kern zu beeinflussen. Sie beschreiben die Synthese und Struktur von Ga-(3-ethoxy-ENBDMPI) [53] (siehe Abb. 12) und zeigten, dass dieser durch pGP als eine Substrat für den Transport aus dem Gehirn mit hoher Sensitivität erkannt wird.

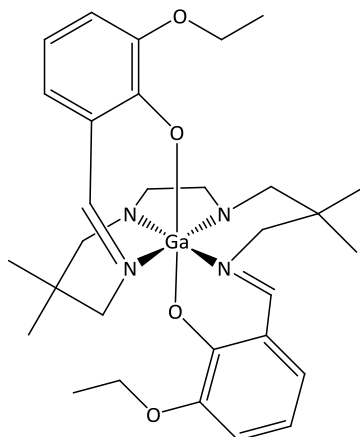


Abb. 12: [$^{67/68}\text{Ga}$]3-ethoxy-ENBDMPI

Eine hohe stationäre zelluläre Nicht-Target zu Target-Anreicherung verglichen mit [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]Sestamibi und [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]Tetrofosmin demonstriert die überlegene Erkennung von *Ga-(3-ethoxy-ENBDMPI) und zeigte damit die Transportaktivität von pGP. Interessanterweise scheinen diese *Ga-Komplexe (* = 67/68) auch die pGP-zugehörigen Transporte im Gehirn widerzuspiegeln. In pGP 1a/1b(-/-) genmanipulierten Mäusen zeigte der ^{67}Ga -Komplex eine 17-fach höhere Gehirnaufnahme und Retention im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (Abb. 13). Dies ist in Übereinstimmung mit dem Transport *in vivo* durch pGP an der BHS. Es konnte bereits mit einem ^{68}Ga -Komplex mittels μPET gezeigt werden.

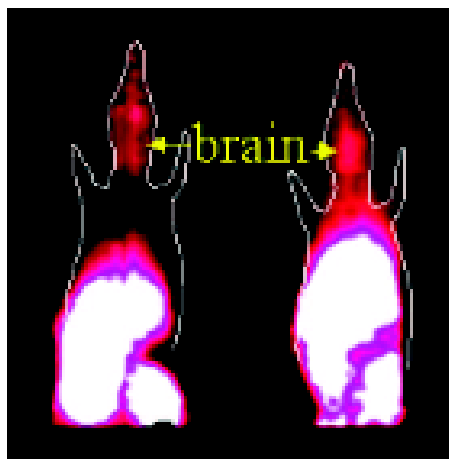


Abb. 13: Kleintier-PET von [^{68}Ga]3-ethoxy-ENBDMPI von FVB-Wildtypmäusen (links) und pGP 1a/1b (-/-)-Mäusen (rechts) 5 Minuten p.i. [53]

Die Evaluierung potentieller pGP-Substrate und -Inhibitoren erfordert u. a. die Erstellung eines Modellsystems ohne den Einsatz von Tieren, d.h. entweder ein zelluläres oder gar zellfreies System.

Vorübergehend wird die Transfektion großer Mengen Zellen durch Routinemethoden wie der Calciumphosphat-Methode eingesetzt. Die pGP-Isoformen wurden geklont und können in Zelllinien exprimiert und analysiert werden. Somit lässt sich eine größere Anzahl an Molekülen auf ihre Eigenschaft als pGP-Substrat hin untersuchen. Auch die Implantation von pGP-exprimierenden Tumorzellen in einem Tiermodell stellt in der Folge eine geeignete Möglichkeit dar, die Funktionsweise des Transportproteins näher zu untersuchen. Durch solche Experimente soll geklärt werden, unter welchen Bedingungen pGP Zytostatika aus der Zelle transportiert, wie dieser Transport verringert oder sogar verhindert werden kann. Dies könnte der Multi-Drug-Resistance entgegenwirken und zu einer Verbesserung der Chemotherapie führen. Die Verbesserung der Patientenversorgung steht hier im Vordergrund der Forschung.

Allerdings ist das Fehlschlagen einer Chemotherapie nur eine mögliche Komplikation in der Krebstherapie. So können auch andere Einflüsse und Veränderungen zu einer massiven Einschränkung der Gesundheit und des Wohlbefindens von Patienten führen. Ein deutlicher Einschnitt in die Lebenserwartung eines Patienten sowie Qualität seines Lebens stellt das Auftreten von Metastasen aus einem Primärtumor dar. Hier sind insbesondere Knochenmetastasen eine schwere Komplikation und mit erheblichen Einschränkungen verbunden.

1.2 Bildung, Diagnose und Therapie von Knochenmetastasen

1.2.1 Aufbau des Knochens

Knochenmetastasen sind eine schwere Komplikation für die zahlreiche an Krebs erkrankten Patienten [54]. Es ist nicht nur eine Ursache für Schmerzen oder andere klinische Probleme wie pathologische Frakturen nach trivialen Verletzungen, Wirbelsäulenkompression und Hyperkalzämie, es ist auch ein Zeichen für einen nicht mehr einfach behandelbaren malignen Fortschritt der Erkrankung. Nach Einnistung eines Tumors in das Skelett ist oftmals lediglich eine palliative Therapie möglich.

Der Knochen besteht zu zwei Drittel aus Hydroxylapatit und zu einem Drittel aus einer organischen Matrix (Abb. 14). Diese wiederum ist zu 90 % aus Kollagen Typ I und 10 % aus nicht-kollagenen Proteinen aufgebaut [55,56]. Die organische Matrix wird aus Osteoblasten (Knochenbildner) synthetisiert, die dicht aneinander liegend die Knochenoberfläche bedecken. Nicht aktive Osteoblasten werden als „lining cells“ bezeichnet. Sowohl ruhende als auch aktive Osteoblasten bilden die Oberfläche der Knochen, die eine Art „Blut-Knochen-Schranke“ darstellt.

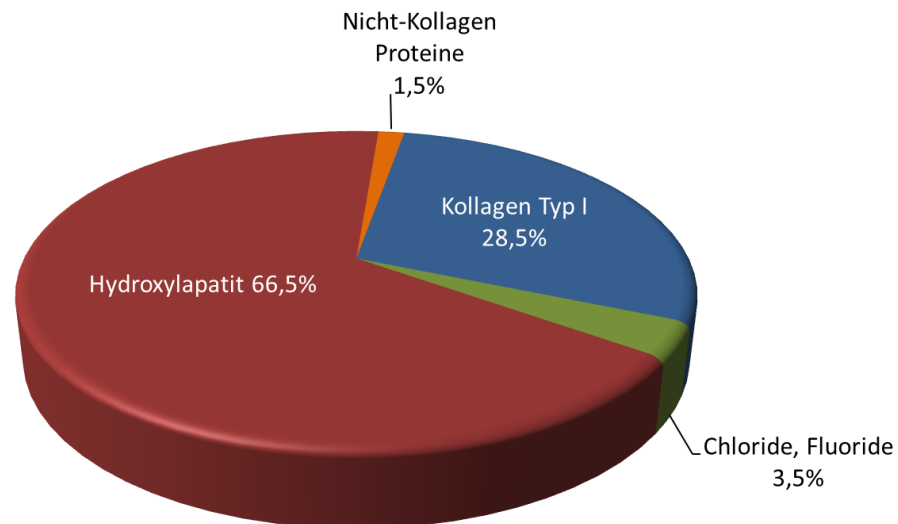


Abb. 14: Prozentuale Zusammensetzung des Knochens

Mit zunehmendem Knochenanbau werden Osteoblasten in das Innere der Knochen eingelagert; dabei wandeln sich 20 % in Osteozyten um. Die Osteozyten sind in der Matrix eingelagert und sind über Kanäle untereinander sowie mit der Knochenoberfläche verbunden. Über diese Strukturen funktionieren der Stoffwechsel und die Kommunikation. Sie dürften eine große Rolle in der Umsetzung mechanischer Reize in knochenauf- wie -abbauenden Mechanismen spielen.

Osteoklasten sind spezifische, hochspezialisierte und mobile Zellen, die in Gebieten starker Knochenresorption wie in den Metaphysen des wachsenden Knochens aber auch in Nachbarschaft zu metastatischen Tumorzellen angetroffen werden. Osteoklasten sind große mehrkernige Zellen, was auf eine hohe Stoffwechselaktivität schließen lässt.

Dies lässt bereits erkennen, dass Knochen keine leblose Substanz sind, sondern sich in einem ständigen Erneuerungsprozess befindet (Abb. 15). Der gesamte Prozess des Knochenab- und -aufbaus dauert 3 - 4 Monate. Auf diese Art werden jährlich 2 - 10 % der gesamten Knochensubstanz umgesetzt. Hierbei sind der Abbau und Aufbau aneinander gekoppelt. Bei Knochenerkrankungen wie Osteoporose, der rheumatoiden Arthritis aber auch bei malignen Knochenerkrankungen oder bei Knochenmetastasen kommt es hingegen zur Entkopplung von Knochenresorption und -bildung.

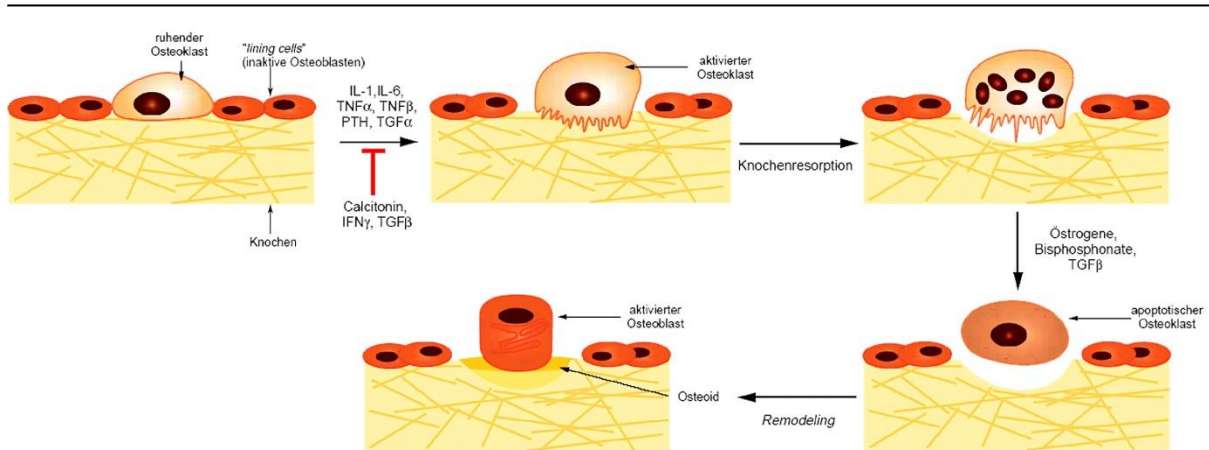


Abb. 15: Phasen der Knochenbildung

1.2.2 Knochenmetastasen

Neben Lunge und Leber ist der menschliche Knochen am häufigsten von Metastasen betroffen. Ursache der Metastasen sind zu 60 - 80 % Karzinome der Mamma und der Prostata, solche der Lunge und Niere verursachen zu 30 - 50 % Knochenmetastasen, Tumore des Magen-Darm-Traktes dagegen nur zu 5 % [57,58]. Knochenmetastasen entwickeln sich bereits sehr früh im Stadium einer Tumorerkrankung, Symptome werden jedoch erst verhältnismäßig spät bemerkt. Zudem sind Knochenmetastasen um ein Vielfaches häufiger als primäre maligne Knochtumore [59].

1.2.2.1 Entstehung von Knochenmetastasen

Zur Metastasierung in Knochen durchlaufen maligne Tumore eine phänotypische Umwandlung. Aus dem Malignom entstehen mobile Tumorzellen, die über die Blutbahn zum Skelett gelangen und sich dort einnisten können. Über diesen Prozess gibt es zwei Theorien der Entstehung von Knochtumoren, zum einen die hämodynamischen Theorie von EWING 1928 und der „seed and soil“-Theorie von PAGET [60]. Die Theorie von Ewing beschreibt die Entwicklung der Metastasen im jeweiligen Gewebe in Abhängigkeit des Blutvolumens des Gewebes. Da dieses jedoch im Knochen sehr gering ist im Vergleich zu Leber oder Lunge, kann die Spezifität von Mamma- und Prostatakarzinomzellen, in den Knochenraum einzuwandern, nicht erklärt werden [61]. Dies legt die Vermutung nahe, dass Tumorzellen hier noch weitere spezifische Eigenschaften aufweisen, um sich in den Knochen einzunisten. Hingegen scheint die Theorie nach Paget hier besser zu greifen. Der Knochen unterscheidet sich von anderem Gewebe vor allem durch seine Morphologie und die

zelluläre Struktur. Wie bereits beschrieben, enthält die Knochenmatrix eine Reihe von Wachstumsfaktoren, die nach erfolgter osteoklastärer Resorption einwandernde Krebszellen stimulieren können [62]. Diese Umgebung begünstigt das Festsetzen metastasierender Krebszellen, besonders der Mamma und Prostata. Dabei ist die eigentliche Metastasierung in das Knochengewebe ein Mehrstufenprozess, der Interaktionen zwischen den Tumorzellen und den normalen Gewebezellen beinhaltet [63]. Einige Tumore, vor allem Mamma- und Prostatakarzinome, wachsen stark im Knochengewebe, da diese Umgebung eine geeignete Struktur darstellt. Im Fall der Mammakarzinome wird der finale Schritt der Knochenmetastasen durch Osteoklasten vermittelt, die durch die lokale Produktion eines Tumorpeptids stimuliert werden. Hingegen werden durch Prostatakarzinome Osteoblasten angeregt, neues Knochengewebe zu bilden [64]. Gerade die hohe Wahrscheinlichkeit, für Mamma- und Prostatakarzinome Knochenmetastasen auszubilden, legt die Vermutung nahe, dass bestimmte intrinsische Faktoren die Einnistung begünstigen.

Der Mehrstufenprozess der Metastasierung in das Knochengewebe besteht aus fünf Schritten, nach dem Wachstum des Primärtumors.

Stufe I: Erhöhte Produktion proteolytischer Enzyme sorgt für die Auslösung der Krebszellen aus dem Zellverband, Invasion in das umgebende Gewebe und anschließend der Eintritt in die Blutbahn. Zur Auslösung der Zelle aus dem Verband wird eine Verringerung der Zahl zellulärer Adhäsionsmoleküle (CAMs) angenommen.

Stufe II: Zur Passage durch Zellbarrieren muss eine erhöhte Migrationsfähigkeit der Zellen gewährleistet sein und die Zellen dürfen nicht vom körpereigenen Immunsystem erkannt werden. In der Blutbahn überlebt nur etwa 1 % der zirkulierenden Zellen.

Stufe III: Um sich wieder aus der Blutbahn an Zellen der Zielregion anheften zu können, muss die Expression der CAMs wieder erhöht werden.

Stufe IV: Die Tumorzellen treten im Bereich der Sinusoide des Knochenmarks aus der Blutbahn wieder aus. Sie adhären an der Basalmembran, lösen diese durch proteolytische Enzyme auf und passieren sie. Durch Interaktion der Tumorzellen mit dem Knochengewebe kommt es zur Störung des Gleichgewichts von Knochenaufbau und -abbau.

Stufe V: Der letzte Schritt der Kaskade ist die Zerstörung der Knochenmatrix.

1.2.2.2 Bedeutung von Knochenmetastasen für den Patienten

Die frühzeitige Diagnostik von Knochenmetastasen und anschließende rechtzeitig greifende Behandlung kann die Schmerzen lindern, die Ausbreitung des Tumors eindämmen und damit die

Lebensqualität der Patienten deutlich erhöhen. Nachfolgend werden daher die wichtigsten Komplikationen aus der Folge von Knochenmetastasen beschrieben [54].

Knochenschmerzen: Häufiges Schmerzen der Knochen ist üblich bei Patienten mit osteolytischer bzw. osteoblastischer Läsion. Der Mechanismus der Schmerzen ist unklar, der Schmerz kann dabei fluktuieren ohne sichtbare Veränderung der Knochenstruktur. Solche Schmerzen sind daher ein ernstes Problem der unter Knochenmetastasen leidenden Patienten.

Frakturen: Frakturen können spontan auftreten oder als Folge einer kleinen Verletzung und sind ebenfalls häufig bei diesen Patienten. Meistens treten diese Frakturen in Wirbelkörpern oder an den Enden langer Knochen auf.

Wirbelsäulenkompression: Diese kann auftreten, wenn ein Tumor direkt in die Wirbelsäule metastasiert. Häufiger hingegen ist die osteolytische Verletzung der Wirbelkörper, die zu Zerbrechlichkeit und Frakturen der Wirbel führt. In diesem Fall kommt es zur Kompression der Nerven und des Rückenmarks, was zu Lähmungserscheinungen und Empfindungsstörungen führen kann.

Hyperkalzämie: Hyperkalzämie tritt häufig bei Patienten mit osteolytischen Knochenmetastasen auf. Dabei wird im Bereich der Metastasen Knochensubstanz abgebaut und Calcium freigesetzt. Der erhöhte Calciumspiegel im Blut kann Kalkablagerungen in verschiedenen Organen wie der Niere oder auch der Hornhaut des Auges hervorrufen. Weiterhin können Herzrhythmusstörungen, Entzündungen der Bauchspeicheldrüse und andere Störungen des Verdauungstraktes, Psychosen und Komazustände auftreten.

1.2.3 Diagnostik

Knochenmetastasen entwickeln sich bereits früh zeitlichen Verlauf einer Tumorerkrankung, doch Symptome treten in der Regel erst verhältnismäßig spät auf. Daher ist eine frühe Diagnostik und damit verbunden eine rechtzeitig einsetzende Therapie unabdingbar. Die bildgebenden Verfahren zur Diagnostik von Knochenmetastasen mittels Röntgen, MRT und Szintigraphie stehen daher als ein zentraler Punkt der Verbesserung der Behandlungsmöglichkeiten während des Krankheitsverlaufs.

Röntgen: Die konventionellen Röntgenaufnahmen können tumoröse oder tumorähnliche Knochenprozesse durch Änderung in der Dichtestruktur des Knochens diagnostizieren, die durch Änderung in den Ab- und Aufbauprozessen des Knochens hervorgerufen werden. Überwiegt der

Knochenabbau, spricht man von Osteolyse, dominiert hingegen der Knochenaufbau, handelt es sich um Osteosklerose. An der Wirbelsäule ist eine solche Diagnose schwieriger als an den Extremitäten. So sind Läsionen an den Wirbelkörpern erst erkennbar, wenn bereits 50 % der Gesamtdicke des Knochens verloren gegangen ist.

Magnetresonanztomographie (MRT): Mit der Kernspintomographie ist vor allem eine bessere Darstellung der weichgewebigen Tumoranteile möglich, gerade wenn der Knochentumor nicht mehr gut begrenzt ist, sondern sich in das umgebende Weichteilgewebe ausbreitet. Besonders im Bereich der Wirbelsäule ist dies hilfreich.

Szintigraphie: Gegenüber Röntgenaufnahmen sind Szintigraphien sensitiver in der Darstellung von Knochenmetastasen. Hierzu gibt es zwei Möglichkeiten der Bildgebung, entweder PET oder SPECT. Die Untersuchung des Knochenstoffwechsels und damit der Auf- und Abbau von Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) steht dabei im Mittelpunkt. Im Hydroxylapatit selbst gibt es mehrere Möglichkeiten für szintigraphische Diagnostik. So ist bekannt, dass Ca^{2+} gegen Sr^{2+} und Mg^{2+} , PO_4^{3-} gegen CO_3^{2-} und HPO_4^{2-} und OH^- gegen F^- , Cl^- und CO_3^{2-} ausgetauscht werden können. Diese Substitutionsreaktionen bieten zusammen mit entsprechenden Tracern die Möglichkeit, Knochenmetastasen zu diagnostizieren und zu therapieren.

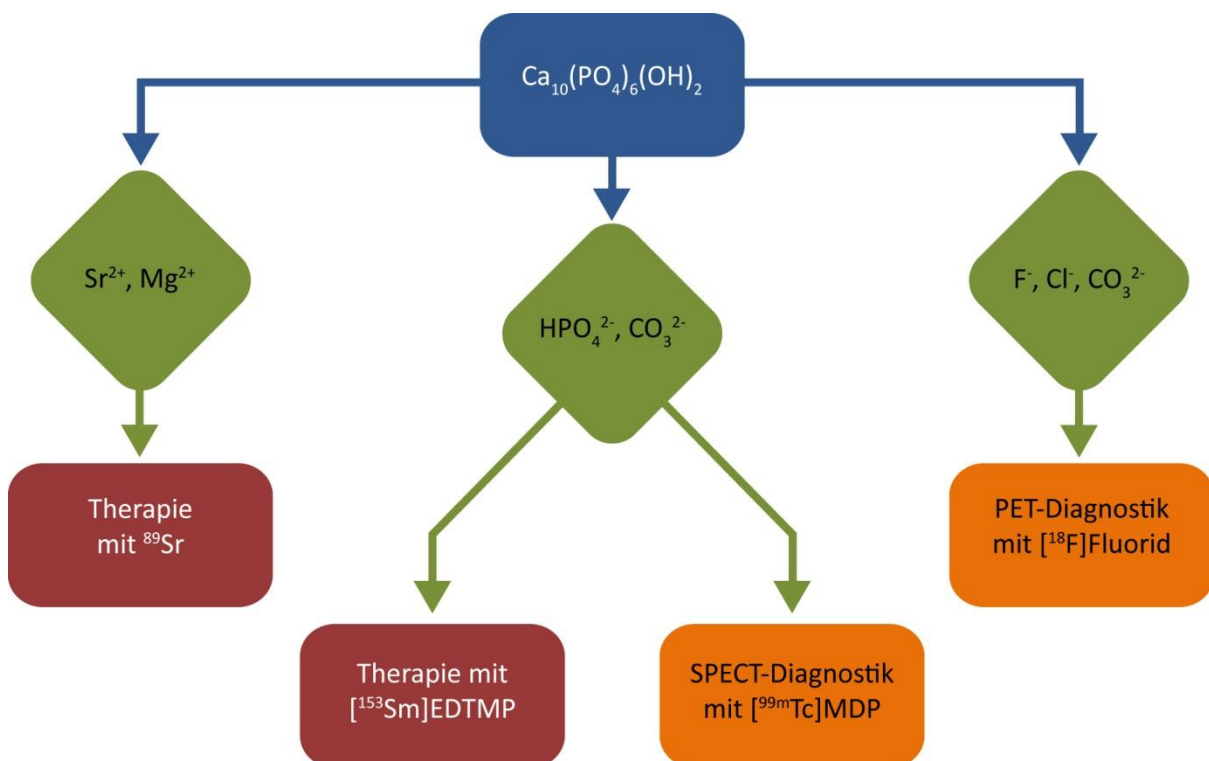


Abb. 16: Schematische Übersicht über die derzeitige Diagnose und Therapie von Knochenmetastasen

Als etablierter PET-Tracer wird [^{18}F]Fluorid verwendet, das sich *in vivo* an den Knochen anlagert und dabei Fluorapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6[^{18}\text{F}]\text{F}_2$) bildet, wobei Zonen des vermehrten Knochenumbaus (z.B. Metastasen) vorrangig markiert werden. Zusammen mit modernen PET- oder PET/CT-Geräten ist der Nuklearmedizin die Möglichkeit gegeben, mit hoher Ortsauflösung Knochenmetastasen zu detektieren. Gerade sehr kleine oder einzeln auftretende Metastasen gilt es so zu erkennen und somit die Behandlung des Patienten einzuleiten. Allerdings ist Fluorid kein spezifischer Tracer und reichert sich in jedem vitalen Knochen an. Wie bereits bei der Diagnose der Chemosensitivität von Tumoren spielen auch hier $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Verbindungen eine wichtige Rolle in der Diagnostik von Knochenmetastasen. Die etablierten $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Diphosphonate, deren Ziel die Substitution der Phosphatgruppen der Hydroxylapatitstruktur ist, sind die affinen Strukturen, die sich vermehrt in Regionen starken Knochenumbaus anreichern. Die dabei eingesetzten Phosphonate sind MDP (Methylen-Diphosphonat), DPD (Diphosphon-Propan-Dicarbonsäure) oder HDP (Hydroxy-Ethylen-Diphosphonat). Alle drei sind knochenaffin und besitzen ähnliche pharmakologische Eigenschaften.

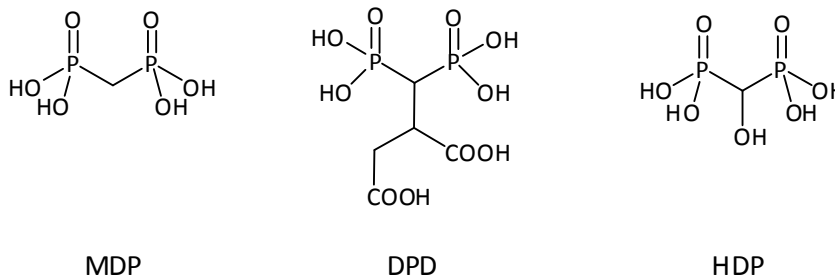


Abb. 17: $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Liganden MDP, DPD und HDP

Bei der so genannten Drei-Phasen-Szintigraphie wird dem Patienten ein solches Technetiumradiopharmakon intravenös verabreicht. Dabei wird der zeitliche Verlauf der Anreicherung des markierten Tracers gemessen. Der Einbau des Tracers ist abhängig vom Blutfluss, von Permeabilitätsstörungen und der von osteoblastischen Aktivität.

1. Phase: In den ersten 60 Sekunden nach Applikation kann die arterielle Durchblutung bestimmt werden und so als Nachweis einer lokalen Hyperämie der betreffenden Region dienen.
2. Phase: Diese Phase umfasst etwa die fünfte bis zehnte Minute nach der Injektion. Bei Weichteilentzündungen kommt es zu einer gesteigerten Anreicherung des Tracers durch eine erhöhte Gefäßpermeabilität.
3. Phase: Ab der zehnten Minute kommt es zur Anreicherung des Tracers an den Knochen. Drei Stunden nach der Applikation wird die Anreicherung durch eine Spätaufnahme visualisiert. Sie repräsentiert damit den regionalen osteoblastischen Umbau.



Abb. 18: SPECT-Aufnahme mit ^{99m}Tc -MDP [65]

Die Strategie der Substitution der Phosphatgruppen im Hydroxylapatit ist nicht nur durch die ^{99m}Tc -Diphosphonate bekannt, auch wird bereits seit einigen Jahren [^{153}Sm]EDTMP zur Therapie von malignen Knochenerkrankungen eingesetzt. Neben dem offenkettigen EDTMP wurden auch makrozyklische Liganden entwickelt und beispielsweise mit therapeutischen Radionukliden wie ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{166}Ho [66] oder $^{205/212}\text{Bi}$ markiert und evaluiert. Diese Liganden auch für die PET zu benutzen, lag daher sehr nah.

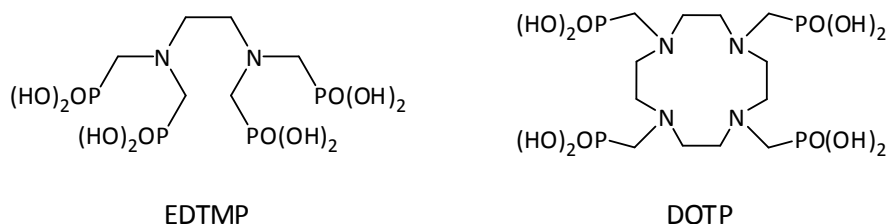


Abb. 19: offenkettige und makrozyklische polyamino-Phosphonatliganden EDTMP und DOTP

Der Ga-EDTMP-Komplex wurde bereits von MINGMING Su et al. für inaktives Ga-EDTMP dargestellt und ein Effekt auf das Wachstum eines Knochentumors berichtet [67]. Dazu wurden Ratten, die einen malignen Tumor und metastatische Knochenverwundungen durch das Walker Carcinom

256 (WCS 256) besaßen, mit Ga-EDTMP behandelt und das Wachstum des Tumors beobachtet und mit einer Kontrollgruppe verglichen. Dabei wurde ein inhibitorischer Faktor auf das Wachstum des Tumors gefunden.

LI QING-NUAN et al. synthetisierten [^{67}Ga]EDTMP aus $^{67}\text{GaCl}_3$ und EDTMP [68]. Eine Biodistributions-Untersuchung an Kunming-Mäusen zeigte eine Bindung des Komplexes an das Skelett von 13,25 % 30 min p.i. ^{68}Ga -EDTMP sollte daher ein interessantes Analogon für die PET darstellen.

MITTERHAUSER et al. verglichen 2008 [69] [^{68}Ga]EDTMP-Komplexe mit und ohne zugesetzten Träger und kommt dabei zum Schluss, dass die Bindung an Hydroxylapatit zu der von [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]EDTMP vergleichbar ist. ^{68}Ga -Phosphonate scheinen eine Möglichkeit zu sein, Knochenerkrankungen mittels PET darzustellen.

1.2.4 Therapie

Die Therapie von Knochenmetastasen gestaltet sich schwierig. Die Diagnostik von Metastasen ist meist erst im bereits fortgeschrittenen Stadium möglich und schränkt so die Therapie stark ein. Diese beschränkt sich daher meist nur auf die palliative Verringerung der Knochenschmerzen für den Patienten und ein vermindertes Risiko von Frakturen und Hyperkalzämie.

Klassische Therapie: Nicht-opiathaltige Arzneimittel (z.B. Corticoide) können schmerz- und fiebersenkend und/oder entzündungshemmend wirken [70]. Sie stellen die Basistherapie der Schmerzlinderung dar, auf die bei stärkeren Schmerzen mit opiathaltigen Medikamenten aufgebaut wird (z.B. Morphin). Zusätzlich zu Opiaten werden in vielen Fällen Begleitmedikamente verordnet um die schmerzlindernde Wirkung zu steigern oder um Nebenwirkungen der Opiate gegenzusteuern.

Strahlentherapie: Neben der klassischen medikamentösen Behandlung werden auch verschiedene Strahlen- bzw. Partikelemitter eingesetzt. Erste Therapieansätze wurden mit ^{32}P (100 % β^- -Umwandlung, mittlere Energie = 0,69 MeV, $T_{1/2} = 14,26$ d) durchgeführt [71]. Aufgrund der starken Nebenwirkungen und immensen Verschlechterung des Blutbildes der Patienten wurden diese Versuche aber schnell wieder eingestellt. Der nächste Ansatz erfolgte mit ^{89}Sr (100 % β^- -Umwandlung, mittlere Energie = 0,58 MeV, $T_{1/2} = 50,53$ d). Hierbei wird allerdings eine hohe Aktivität benötigt, um einen Erfolg zu erzielen.

Die therapeutisch einsetzbaren Metallkomplexverbindungen wurden vor etwa zehn Jahren hergestellt. Dazu zählen [^{90}Y]citrat und [^{153}Sm]EDTMP, die seitdem zu den Standards der Therapie

von Knochenmetastasen geworden sind. Dabei besitzen Yttrium-90 und Samarium-153 relativ kurze Halbwertszeiten ($T_{1/2}({}^{90}\text{Y}) = 64,05 \text{ h}$, $T_{1/2}({}^{153}\text{Sm}) = 46,28 \text{ h}$). Auch Rhenium-186 findet durch seine geringere β -Energie und damit verbundenen geringeren Eindringtiefe Anwendung als Therapeutikum in Form von $[{}^{186}\text{Re}]\text{HEDP}$. Neben den β -Emittlern werden in den letzten Jahren auch α -Emitter wie Bismuth-212 untersucht, z.B. als $[{}^{212}\text{Bi}]\text{DOTP}$ [72,73]. Der Nachteil dieser Behandlungsform liegt in der Strahlenbelastung des gesunden Gewebes im Randbereich von Metastasen.

Somit stellt die Diagnose und Therapie von Knochenmetastasen ein wichtiges Ziel der palliativen Therapie von Patienten dar, um so deren Lebensqualität zu erhöhen. ${}^{68}\text{Ga}$ bietet hier einen hervorragendes PET-Nuklid, das mit geeigneten Phosphonaten einen praktisch überall verfügbaren Tracer zur prä-therapeutischen Diagnose und anschließender Dosisabschätzung wie auch zur Beurteilung des Therapieverlaufes ermöglichen könnte.

1.3 Literatur

- [1] Statistisches Bundesamt. <http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Content/Statistiken/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/Content75/GestorbeneAnzahl,templated=renderPrint.psm>
- [2] World Health Organization. *The Global Burden of Disease, 2004 Update*
- [3] World Health Organization. *Projections of mortality and burden of disease, Mortality Baseline Scenario 2008*. http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/projections/en/index.html
- [4] World Health Organization. *Projections of mortality and burden of disease, Mortality Baseline Scenario 2030*. http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/projections/en/index.html
- [5] <http://www.dkfz.de/de/krebsatlas/gesamt/ende.html>
- [6] <http://www.krebsinformation.de/themen/behandlung/chemotherapie.php>
Herausgeber: DKFZ Heidelberg

- [7] Hendrikse NH, Franssen EJF, van der Graaf WTA, Vaalburg W, de Vries EGE. *Visualization of multidrug resistance in vivo*. Eur.J.Nuc.Med. (1999), 26, 283-293
- [8] <http://journals.iucr.org/d/issues/2010/09/00/be5152/be5152fig6.html>;
doi:10.1107/S0907444910028593
- [9] Chang G. *Multidrug resistance ABC transporters*. FEBS Lett. (2003), 555, 102-105
- [10] Higgins CF. *ABC transporters: physiology, structure and mechanism - an overview*. Res.Microbiol. (2001), 152, 205-210
- [11] Schinkel AH, Jonker JW. *Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview*. Adv Drug Deliv.Rev. (2003), 55, 3-29
- [12] Lee G, Piquette-Miller M. *Cytokines alter the expression and activity of the multidrug resistance transporters in human hepatoma cell lines; analysis using RT-PCR and cDNA microarrays*. J.Pharm.Sci. (2003), 92, 2152-2163
- [13] http://www.als.lbl.gov/als/science/sci_archive/186Pgp.html
- [14] Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. *Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review*. Cancer Res. (1989), 49, 6449-6465
- [15] Vaupel PW. *Blood Flow, Oxygenation, Tissue pH Distribution and Bioenergetic Status of Tumors*. Ernst Schering Research Foundation, Lecture 23, Berlin (1994)
- [16] Warburg O. *Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle*. Klin.Wschr. (1925), 4, 534-536
- [17] Bush RS, Jenkin RD, Allt WE, Beale FA, Bean H, Dembo AJ, Pringle JF. *Definitive evidence for hypoxic cells influencing cure in cancer therapy*. Br.J.Cancer (Suppl.) (1978), 37, 302-306
- [18] Gray LH, Conger AD, Ebert M, Hornsey S, Scott OCA. *The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy*. Br.J.Radiol. (1953), 26, 638-648
- [19] Liang BC. *Effects of hypoxia on drug resistance phenotype and genotype in human glioma cell lines*. J.Neurooncol. (1996), 29, 149-155
- [20] Sanna K, Rofstad EK. *Hypoxia-induced resistance to doxorubicin and methotrexate in human melanoma cell lines in vitro*. Int.J.Cancer (1994), 58, 258-262

-
- [21] Teicher BA. *Hypoxia and drug resistance*. *Cancer Metastasis Rev.* (1994), 13, 139-168
- [22] Fujii T, Otsuki T, Moriya T, Sakaguchi H, Kurebayashi J, Yata K, Uno M, Kobayashi T, Kimura T, Jo Y, Kinugawa K, Furukawa Y, Morioka M, Ueki A, Tanaka H. *Effect of hypoxia on human seminoma cells*. *Int.J.Oncol.* (2002), 20, 955-962
- [23] Chaplin DJ, Horsman MR, Trotter MJ, Siemann DW. *Therapeutic significance of microenvironmental factors*. In: M. Molls and P. Vaupel (eds.), *Blood Perfusion and Microenvironment of Human Tumors*, (1998), Springer: Berlin, 131-143
- [24] Parkins CS, Chadwick JA, Chaplin DJ. *Inhibition of intracellular pH control and relationship to cytotoxicity of chlorambucil and vinblastine*. *Br.J.Cancer (Suppl.)* (1996), 27, S75-S77
- [25] Thews O, Gassner B, Kelleher DK, Schwerdt G, Gekle M. *Impact of extracellular acidity on the activity of P-glycoprotein and the cytotoxicity of chemotherapeutic drugs*. *Neoplasia* (2006), 8, 143-152
- [26] Lotz C, Kelleher DK, Gassner B, Gekle M, Vaupel P, Thews O. *Role of the tumor microenvironment in the activity and expression of the p-glycoprotein in human colon carcinoma cells*. *Oncol.Rep.* (2007), 17, 239-244
- [27] Vogelgesang S, Warzok RW, Cascorbi I, Kunert-Keil C, Schroeder E, Kroemer HK, Siegmund W, Walker LC, Pahnke J. *The role of P-glycoprotein in cerebral amyloid angiopathy; Implications for the early pathogenesis of Alzheimer's disease*. *Curr.Alzheimer Res.* (2004), 1, 121-125
- [28] Cirrito JR, Deane R, Fagan AM, Spinner ML, Parsadanian M, Finn MB, Jiang Hong, Prior JL, Sagare A, Bales KR, Paul SM, Zlokovic BV, Piwnica-Worms D, Holtzman DM. *P-glycoprotein deficiency at the blood-brain barrier increases amyloid- β deposition in an Alzheimer disease mouse model*. *J.Clin.Invest.* (2005), 115, 3285-3290
- [29] Golde TE. *Disease modifying therapy for AD?* *J.Neurochem.* (2006), 99, 689-707
- [30] Vogelgesang S, Glatzel M, Walker LC, Kroemer HK, Aguzzi A, Warzok RW. *Cerebrovascular P-glycoprotein expression is decreased in Creutzfeldt-Jakob disease*. *Acta Neuropathol.* (2006) 111, 436-443
- [31] Hsiao P, Sasongko L, Link JM, Mankoff DA, Muzi M, Collier AC, Unadkat JD. *Verapamil p-glycoprotein transport across the rat blood-brain barrier: cyclosporine, a concentration*
-

- inhibition analysis, and comparison with human data.* J.Pharmacol.Exp.Ther. (2006), 317, 704-710
- [32] Luurtsema G, Molthoff CF, Windhorst AD, Smit JW, Keizer H, Boellaard R, Lammertsma AA, Franssen EJ. *(R)- and (S)-[¹¹C]verapamil as PET-tracers for measuring P-glycoprotein function: in vitro and in vivo evaluation.* Nucl.Med.Biol. (2003), 30(7), 747-51.
- [33] Bart J, Willemsen ATM, Groen HJM, van der Graaf WTA, Wegman TD, Vaalburg W, de Vries EGE, Hendrikse NH. *Quantitative assessment of P-glycoprotein function in the rat blood-brain barrier by distribution volume of [¹¹C]verapamil measured with PET.* Neuroimage. (2003), 20, 1775-82
- [34] Syvanen S, Blomquist G, Sprycha M, Hoglund AU, Roman M, Eriksson O, Hammarlund-Udenaes M, Langstrom B, Bergstrom M. *Duration and degree of cyclosporin induced P-glycoprotein inhibition in the rat blood-brain barrier can be studied with PET.* Neuroimage. (2006), 32, 1134-41
- [35] Sasongko L, Link JM, Muzi M, Mankoff DA, Yang X, Collier AC, Shoner SC, Unadkat JD. *Imaging P-glycoprotein transport activity at the human blood-brain barrier with positron emission tomography.* Clin.Pharmacol.Ther. (2005), 77, 503-514
- [36] Hendrikse NH, Schinkel AH, De Vries EGE, Fluks E, Van Der Graaf WTA, Willemsen ATM, Vaalburg W, Franssen EJJ. *Complete in vivo reversal of P-glycoprotein pump function in the blood-brain barrier visualized with positron emission tomography.* Brit.J.Pharmacol. (1998), 124, 1413-1418
- [37] Elsinga PH, Franssen EJJ, Hendrikse NH, Fluks L, Weemaes AMA, Van der Graaf WTA, De Vries EGE, Visser GM, Vaalburg W. *Carbon-11-labeled daunorubicin and verapamil for probing P-glycoprotein in tumors with PET.* J.Nucl.Med. (1996), 37, 1571-1575
- [38] Hendrikse NH, Franssen EJJ, van der Graaf WTA, Vaalburg W, de Vries EGE. *Visualization of multidrug resistance in vivo.* Eur.J.Nucl.Med. (1999), 26, 283-293
- [39] Levchenko A, Mehta BM, Lee JB, Humm JL, Augensen F, Squire O, Kothari PJ, Finn RD, Leonard EF, Larson SM. *Evaluation of ¹¹C-colchicine for PET imaging of multiple drug resistance.* J.Nucl.Med. (2000), 41, 493-501
-

-
- [40] G. Zettinig, T. Leitha, R. Dudczak. *Nuklearmedizinische Diagnostik der Osteomyelitis*, J. Miner Stoffwechsel, 10(2), (2003), 20-3
- [41] Sharma V, Piwnica-Worms D. *Metal Complexes for Therapy and Diagnosis of Drug Resistance*. Chem.Rev. (1999), 99, 2545-2560
- [42] Dyszlewski M, Blake HM, Dahlheimer JL, Pica CM, Piwnica-Worms D. *Characterization of a novel ^{99m}Tc-carbonyl complex as a functional probe of MDR1 P-glycoprotein transport activity*. Mol.Imag. (2002), 1, 24-35
- [43] Luker GD, Fracasso PM, Dobkin J, Piwnica-Worms D. *Modulation of the multidrug resistance P-glycoprotein: detection with technetium-99m-sestamibi in vivo*. J.Nucl.Med. (1997), 38, 369-372
- [44] Vecchio SD, Ciarmiello A, Potena MI, Carriero MV, Mainolfi C, Botti G, Thomas R, Cerra M, D'Aiuto G, Tsuruo T, Salvatore M. *In vivo detection of multidrug-resistant (MDR1) phenotype by technetium-99m sestamibi scan in untreated breast cancer patients*. Eur.J.Nucl.Med. (1997), 24, 150-9
- [45] Sharma V, Luker GD, Piwnica-Worms D. *Molecular imaging of gene expression and protein function in vivo with PET and SPECT*. J.Magn.Reson.Imaging. (2002), 16, 336-51
- [46] Chen CC, Meadows B, Regis J, Kalafsky G, Fojo T, Carrasquillo JA, Bates SE. *Detection of in vivo P-glycoprotein inhibition by PSC 833 using Tc-99m sestamibi*. Clin.Cancer Res. (1997), 3, 545-552
- [47] Agrawal M, Abraham J, Balis FM, Edgerly M, Stein WD, Bates S, Fojo T, Chen CC. *Increased ^{99m}Tc-sestamibi accumulation in normal liver and drug-resistant tumors after the administration of the glycoprotein inhibitor, XR9576*. Clin.Cancer Res. (2003), 9, 650-656
- [48] Del Vecchio S, Ciarmiello A, Salvatore M. *Scintigraphic detection of multidrug resistance in cancer*. Cancer Biother.Radiopharm. (2000), 15, 327-337
- [49] Burak Z, Moretti JL, Ersoy O, Sanli U, Kantar M, Tamgac F, Basdemir G. *^{99m}Tc-MIBI imaging as a predictor of therapy response in osteosarcoma compared with multidrug resistance-associated protein and P-glycoprotein expression*. J.Nucl.Med. (2003), 44, 1394-1401
-

- [50] Shih CM, Shiao YC, Wang JJ, Ho ST, Kao A. *Using technetium-99m tetrofosmin chest imaging to predict taxol-based chemotherapy response in non-small cell lung cancer but not related to lung resistance protein expression.* Lung. (2003), 181, 103-111
- [51] Song HC, Lee JJ, Bom HS, Chung IJ, Kim HJ, Park YK, Kim EE. *Double-phase Tc-99m MIBI scintigraphy as a therapeutic predictor in patients with non-Hodgkin's lymphoma.* Clin.Nucl.Med. (2003), 28, 457-62
- [52] Sharma V, Beatty A, Wey SP, Dahlheimer J, Pica CM, Crankshaw CL, Bass L, Green MA, Welch MJ, Piwnica-Worms D. *Novel gallium(III) complexes transported by MDR1 P-glycoprotein: potential PET imaging agents for probing P-glycoprotein-mediated transport activity in vivo.* Chem.Biol., (2000), 7, 335-343
- [53] Sharma V, Prior JL, Belinsky MG, Kruh GD, Piwnica-Worms D. *Characterization of a $^{67}\text{Ga}/^{68}\text{Ga}$ radiopharmaceutical for SPECT and PET of MDR1 P-glycoprotein transport activity in vivo: validation in multidrug-resistant tumors and at the blood-brain barrier.* J.Nucl.Med. (2005), 46, 354-364
- [54] Wippermann B, Mössinger E, Schratt HE, Bastian L, Krettek C. *Diagnostik und Therapie von Knochenmetastasen.* Der Chirurg. (2001), 72, 638-53
- [55] Felsenberg D. *Stützwerk aus Kollagen und Hydroxylapatit - Struktur und Funktion des Knochens.* Pharmazie in unserer Zeit. (2001), 30(6), 488-93
- [56] Keck AV, Pecherstorfer M. *Knochenstoffwechsel bei malignen Erkrankungen.* J.Miner. Stoffwechsel. (2003), 10(2), 6-11
- [57] Greenlee RT, Hill Harmon MB, Murray T, Thun M. *Cancer statistics 2001.* CA Cancer. J.Clin. (2001), 51, 15-36
- [58] Rubens RD. *Bone metastases – the clinical problem.* Eur.J.Cancer. (1998), 34, 210-3
- [59] Hoffmann O. *Zelluläre und molekulare Mechanismen der Tumormetastasierung in den Knochen.* J.Miner.Stoffwechsel. (2003), 10(2), 12-5
- [60] Paget S. *The distribution of secondary growths in cancer of the breast.* Lancet. (1889), 1, 571-3
-

-
- [61] Weiss L, Haydock K, Pickren J, Lane W. *Organ vascularity and metastatic frequency*. Am.J.Pathol. (1980), 101 (1), 101–14
- [62] Hauschka PV, Mavrakos AE, Lafrati MD, Doleman SE, Klagsbrun M. *Growth factors in bone matrix. Isolation of multiple types by affinity chromatography on heparin-sepharose*. J.Biol.Chem. (1986), 261, 12665–74
- [63] Mundy GR. *Mechanisms of bone metastasis*. Cancer. (1997), 80(suppl), 1546–56
- [64] Yoneda T, Williams P, Myoi A, Michigami T, Mbalaviele G. *Cellular and molecular mechanisms of development of skeletal metastases*. Body JJ (ed). Tumor Bone Diseases and Osteoporosis in Cancer Patients. Marcel Dekker Inc., New York (1999), 41-69
- [65] Presstext Schweiz; Copyright: Schulthess Klinik Zürich,
http://presstext.ch/show_attach.mc?pte=030711001
- [66] Logan KW, Volkert WA, Holmes RA. *Radiation Dose Calculations in Persons Receiving Injection of Samarium-153 EDTMP*. J.Nucl.Med. (1987), 28, 505
- [67] Su M, Qui Y, Jia W. *A Pilot Study of Antitumor Effect of gallium Ethylendiamin-tetramethylene Phosphonate [Ga(III)-EDTMP] in Tumor-Bearing Rats*. Adv.Therapy. (2005), 22, (4), 297-306
- [68] Li QN, Zhang XD, Zhang YP, *Preparation of ⁶⁷Ga-EDTMP and its biodistribution studies*. Nuc.Sci. Tech. (2003), 14 (4), 249-52
- [69] Toegel S, Wadsak W, Mien LK, Viernstein H, Kluger R, Eidherr H, Haeusler D, Kletter K, Dudczak R, Mitterhauser M. *Preparation and pre-vivo evaluation of no-carrier-added, carrier-added and cross-complexed [⁶⁸Ga]EDTMP formulations*. Eur.J.Pharm.Biopharm. (2008), 68, 406-12
- [70] http://www.quadramet.de/scripts/patienten/schmerztherapie_bei_Knochenmetastasen/medikamentoese_behandlung.php?menu=2&sub=1
- [71] http://www.onkodin.de/zms/content/e106/e27134/e27146/index_print_ger.html
- [72] Hassfjell SP, Bruland S, Hoff P. *²¹²Bi-DOTMP: An Alpha Particle Emitting Bone-Seeking Agent for Targeted Radiotherapy*. Nucl.Med. Biol. (1997), 24, 231-7
- [73] Hassfjell SP, Bruland S, Hoff P. *Synthesis, purification and biodistribution of ²⁰⁵Bi-DOTMP, visualizing bone deposition patterns with autoradiography*. Nucl.Med. Biol. (2001), 28, 425-33
-

2 Problemstellung

Krebs stellt eine erhebliche Beeinträchtigung der Lebensqualität wie auch der Lebenserwartung erkrankter Menschen dar. Die Vielfältigkeit dieser Erkrankung stellt hierbei die moderne Medizin auch heute noch vor Probleme der Diagnose und Behandlung.

Durch die Chemoresistenz verschiedener Tumore wird weiterhin die Therapie erschwert. Daher ist ein Ziel dieser Arbeit, die Synthese und Anwendung neuartiger Substrate für pGP-relevante Vorgänge zur Evaluierung pGP-überexprimierender Tumorarten. Mit geeigneten Tracern lässt sich eine nicht-invasive funktionelle Bildgebung realisieren, die es ermöglicht, die regionale Verteilung der pGP-Transportrate in Tumoren oder Normalgeweben zu quantifizieren. Chemisches Ziel ist es, Liganden mit hoher Selektivität zum Transportprotein zu entwickeln und mit dem PET-Nuklid ^{68}Ga zu markieren. Als geeignete Strukturen bieten sich Schiff'sche Basen an, die einerseits die Koordination des dreiwertigen Galliums ermöglichen und dabei andererseits monokationische Komplexe bilden. Durch Variation der Liganden können Verbindungen verschiedener Lipophilie mit unterschiedlichen Substitutionsmustern durch Halogene, Ether und aliphatische Reste synthetisiert werden. Diese Liganden sollen mit ^{68}Ga markiert und dabei die optimalen Reaktionsbedingungen untersucht werden.

Die neuen ^{68}Ga -Tracer sollen anschließend bezüglich ihrer Eignung für die Beurteilung der funktionellen Aktivität des pGP in Tumor und Normalgeweben untersucht werden. Hierzu können initial zelluläre Aufnahme sowie Spezifität des Transports durch pGP in *in vitro*-Experimenten analysiert werden. Für die vielversprechendsten Verbindungen wird die Anwendbarkeit dieser Substanzen *in vivo* im Tierversuch geprüft werden. Hierzu können PET-Untersuchungen an solide wachsenden Experimentaltumoren erfolgen mit dem Ziel, sowohl die Organverteilung der Tracer als auch mikroregionale Unterschiede der Tracerkonzentration innerhalb des Tumors zu ermitteln. Schließlich soll die intratumorale pGP-Aktivität gezielt moduliert und der Einfluss auf die Tracerakkumulation gemessen werden.

Die Chemoresistenz von Tumoren ist allerdings nicht die einzige Komplikation in der Therapie. Auch die Metastasierung von Tumoren stellt eine deutliche Verschlechterung des Krankheitsverlaufs dar. Hier sind insbesondere Knochenmetastasen ein schwerwiegender Einschnitt in die Lebensqualität der Patienten. Durch den Einsatz geeigneter Tracer kann hier eine frühzeitige Diagnose die Therapie und das Leben der Patienten verbessern. Somit ist das Ziel des zweiten Projekts dieser Dissertation die Diagnose und Therapie von Knochenmetastasen mittels ^{68}Ga - und ^{177}Lu -markierter Phosphonate.

Hierzu muss zuerst die Markierung ausgewählter phosphonathaltiger Chelatoren mit ^{68}Ga untersucht und optimiert werden. Für spätere Untersuchungen am Tier, sollen die dargestellten Komplexe hinsichtlich ihrer Stabilität gegenüber anderen Liganden wie z. B. Transferrin untersucht werden, um eine *in vivo*-Stabilität vorherzusagen. Weiterhin muss die Bindung der Komplexe an synthetische Knochensubstanz (Hydroxylapatit) geprüft werden. Durch die gewonnenen Daten können Erkenntnisse über die Anforderungen zum einen hinsichtlich der Markierung mit ^{68}Ga , zum anderen bezüglich der Bindung an Knochenmaterial gewonnen werden. Zu Beginn werden hier weitverbreitete Liganden untersucht wie EDTMP und DOTP, die bereits mit anderen Radionukliden vorwiegend für die Therapie eingesetzt werden. Die Ergebnisse sollen in die Entwicklung neuer geeigneter Phosphonat-Liganden fließen. Hier haben Bisphosphonate mit $^{99\text{m}}\text{Tc}$ in den letzten Jahren gezeigt, dass sie sehr gut an Knochenmetastasen binden und wurden mittlerweile in mehreren Generationen weiterentwickelt. DOTA-basierte Liganden bieten darüber hinaus eine hervorragende Möglichkeit, Diagnostik und Therapie in einem Liganden zu vereinen, indem lediglich das radioaktive Nuklid im Komplex ausgetauscht wird. Durch Substitution von ^{68}Ga durch ^{177}Lu soll an geeigneten Liganden die Markierung, Stabilität und biologische Einsatzmöglichkeit evaluiert werden. Die interessantesten dieser Verbindungen sollen anschließend in Tierversuchen *in vivo* evaluiert werden.

Die in der Problemstellung beschriebenen Aufgaben wurden im Rahmen der Dissertation durch individuelle Projekte bearbeitet, die in Form von Publikationen abgeschlossen sind und in Abschnitt 3 beschrieben werden.

3 Manuskripte

Die vorliegende Arbeit basiert auf folgenden 7 Manuskripten:

- (I) M. Fellner, W. Dillenburg, H.-G. Buchholz, N. Bausbacher, M. Schreckenberger, F. Renz, F. Rösch, O. Thews • *Assessing p-glycoprotein (pGP) activity in vivo utilizing ⁶⁸Ga-Schiff base complexes* • Molecular Imaging and Biology, online verfügbar (doi: 10.1007/s11307-010-0410-1)

- (II) O. Thews, W. Dillenburg, M. Fellner, H.-G. Buchholz, N. Bausbacher, M. Schreckenberger, F. Rösch • *Activation of p-glycoprotein (pGP)-mediated drug efflux by extracellular acidosis: In vivo imaging with ⁶⁸Ga-labeled PET tracer* • European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, (2010), 37(10), 1935-1942 (doi: 10.1007/s00259-010-1504-3)

- (III) M. Fellner, B. Bisalski, F. Rösch, O. Thews • *Einfluss der Chiralität auf das Transportvermögen von [⁶⁸Ga]MFL6.MZ durch p-Glykoprotein* • in Vorbereitung

- (IV) M. Fellner, P. Riss, N. Loktionova, K. Zhernosekov, O. Thews, C.F.G.C. Geraldes, Z. Kovacs, I. Lukeš, F. Rösch • *Comparison of different phosphorus-containing ligands complexing ⁶⁸Ga for PET-imaging of bone metabolism* • Radiochimica Acta, angenommen

- (V) M. Fellner, B. Bisalski, N. Bausbacher, V. Kubíček, P. Hermann, F. Rösch, O. Thews • *⁶⁸Ga-BPAMD: PET-imaging of bone metastases with a generator based positron emitter* • Nuclear Medicine and Biology, in Vorbereitung

- (VI) M. Fellner, R. P. Baum, V. Kubíček, P. Hermann, I. Lukeš, V. Prasad, F. Rösch • *PET/CT imaging of osteoblastic bone metastases with ⁶⁸Ga-bisphosphonates - first in human study* • European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, 2010, 37 (4), 834 (doi: 10.1007/s00259-009-1355-y) • Image of the Month

- (VII) M. Fellner, R. P. Baum, V. Kubíček, P. Hermann, F. Rösch • *¹⁷⁷Lu-BPAMD: therapy of bone metastases with a highly potent ligand also used for imaging* • European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, in Vorbereitung

3.1 Assessing p-Glycoprotein (Pgp) Activity *In vivo* Utilizing ⁶⁸Ga–Schiff Base Complexes

Assessing p-Glycoprotein (Pgp) Activity *In vivo* Utilizing ⁶⁸Ga–Schiff Base Complexes

M. Fellner¹, W. Dillenburger², H.-G. Buchholz³, N. Bausbacher³,
M. Schreckenberger³, F. Renz⁴, F. Rösch¹, O. Thews²

¹Institute of Nuclear Chemistry, University of Mainz, Fritz Strassmann-Weg 2, 55128, Mainz, Germany

²Institute of Physiology and Pathophysiology, University Medicine Mainz, 55128, Mainz, Germany

³Department of Nuclear Medicine, University Hospital, 55101, Mainz, Germany

⁴Institute of Inorganic Chemistry, University of Hannover, 30167, Hannover, Germany

Abstract

Purpose: The p-glycoprotein (Pgp) is the most prominent member of active drug transporters leading to a multidrug-resistant phenotype. For identification of tumors functionally overexpressing Pgp *in vivo*, non-invasive imaging techniques are needed.

Procedures: Six Schiff base compounds were synthesized and labeled with ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga generator-derived ⁶⁸Ga. The compounds were studied *in vitro* in Pgp-positive tumor cells. The property of being a Pgp substrate was tested by comparison of the tracers uptake in R-3327 Dunning prostate carcinoma AT1 cells in presence and absence of the Pgp-inhibitor verapamil. *In vivo* investigations were performed with tumor-bearing rats imaged with micro-positron emission tomography.

Results: All ligands were labeled with ⁶⁸Ga in yields of >92% beside one (~55%). The tracers showed different accumulation within the cells *in vitro* (4–60%). In blocking experiments, the ratio (blocked to unblocked) varied from 1.8 to 1.0. For *in vivo* experiments, ⁶⁸Ga–ENBDMPI and ⁶⁸Ga–MFL6.MZ were selected. The tumors showed specific uptake of the tracer. Direct intratumoral injection of verapamil increased the tracer concentration by ~25% reflecting the functional Pgp activity.

Conclusions: Two ⁶⁸Ga-labeled ligands appear to be valuable for imaging non-invasively the intratumoral Pgp activity. On a long term, patients with multidrug-resistant tumors pretherapeutically may be identified prior to treatment.

Key Words: Functional activity, P-glycoprotein, PET tracer, Tumors, ⁶⁸Ga

Abbreviations: Pgp, p-glycoprotein; VPL, verapamil; MDR, multidrug resistance

Introduction

The p-glycoprotein (Pgp) is a 170-kDa protein located in the cell membrane which transports a broad spectrum of drugs (with size from less than 200 Da to almost 1,900 Da and amphiphilic structure) out of the cell [1]. This protein is the most prominent and best studied member of the ATP binding cassette family, which can be found in numerous tissues such as kidney, liver, brain, or placenta [1, 2]. Since many tumors overexpress Pgp and several anti-tumoral drugs are substrates, this transporter is responsible for the phenomenon of multidrug resistance (MDR) in human tumors, thereby limiting the cytotoxic efficacy of chemotherapy [2, 3]. Since more or less specific inhibitors of the transport protein are known, one strategy to overcome MDR is the reduction of the functional transport capacity. However, even though some promising agents have been identified and underwent clinical testing, at present the search of an ideal non-toxic drug sufficiently inhibiting Pgp transport has not been accomplished [4]. In addition, MDR does not play a role in all tumor patients. Only patients (over)expressing Pgp might benefit from a simultaneous inhibitor treatment. For this reason, these patients should be identified in the clinical setting previously to chemotherapy in order to adapt the treatment regime to the individual demands, eventually changing to another treatment modality such as radiotherapy or surgery.

From this background, diagnostic methods are needed to assess the patient's individual tumor cells Pgp activity. With PET, this challenge would be approached non-invasively resulting not only in a value of the mean Pgp transport activity but also to quantify regional differences within the tumor tissue. PET-based imaging of chemoresistance would also help in the development of new, more specific Pgp inhibitors. Several approaches have been published to visualize the activity or expression of Pgp in order to quantify the MDR of tumors or normal tissues. Most attempts used ^{99m}Tc-Sestamibi (a tracer approved for cardiac imaging, which is known to also be a substrate of the Pgp) using the single photon emission computed tomography (SPECT) technique [5, 6]. However, due to the higher spatial and faster kinetic resolution of quantitative positron emission tomography (PET), few tracers were labeled with positron emitters to visualize MDR. Most of these approaches used carbon-11 labeled drugs known to be Pgp substrates (e.g., paclitaxel) [7, 8].

Several studies were performed using ^{11}C -verapamil (for an overview see [8]). However, verapamil is a Pgp substrate with a very high affinity to the transporter [9] which is the reason of this drug being a functional Pgp inhibitor. Thus, ^{11}C -verapamil does not reflect the dynamic transport activity of the drug transporter.

While ^{11}C -carbon is cyclotron-produced, non-cyclotron dependent PET tracers, i.e., radionuclide generator-based derivatives, would provide another route to Pgp-tracer synthesis. The germanium-68/gallium-68 system ($T_{1/2}({}^{68}\text{Ge})= 270.8$ days), generating the positron emitter ${}^{68}\text{Ga}$ ($T_{1/2}= 67.7$ min; 89% positron branching), represents a promising example. Using the recently published generator postprocessing, it is an excellent source for synthesizing and evaluating new tracers [10, 11].

Very few studies have been performed in which ${}^{67/68}\text{Ga}$ -compounds were used to visualize the functional Pgp activity [12, 13]. In the case where the tracer itself is a substrate of Pgp, the intratumoral concentration would inversely reflect the Pgp transport activity. While the compound passively diffuses into the tumor cell, it has to be carried out actively by Pgp. This transport, therefore, should be inhibitable by known Pgp inhibitors.

The aim of the present study was the development of various new ${}^{68}\text{Ga}$ -labeled PET tracers for imaging the functional transport activity of Pgp. The use of ${}^{68}\text{Ga}$ as positron emitter would allow a convenient and fast synthesis at the site of PET scanning. The molecular structure of the ${}^{68}\text{Ga}$ -labeled tracer, however, has to be optimized to lead to a maximal enrichment in the tumor, combined with significant specificity as well as the inhibitability of the tracer efflux via Pgp.

Materials and Methods

Chemicals

All chemicals were used as supplied without further purification. 2,2-Dimethyl-1,3-propanediamine and potassium iodide were obtained from Merck. Dibromoethane and dry solvents were purchased from Fluka; ethanol (+2% MEK), potassium hydroxide, and 5-bromo-3-methoxysalicylaldehyde were obtained from Acros Organics. All other organic reagents were purchased from Sigma-Aldrich. Thin-layer chromatography was carried out on Merck SG 60 F254 and RP-18 F254s plates. ${}^{68}\text{Ga}$ generators were obtained from Cyclotron Co Ltd, Obninsk, Russian Federation. Starting activities ranged from 65 to 280 MBq.

Ligand Synthesis

(1) Bis(N,N'-amino-2,2-dimethylpropan)ethylenediamine (Fig. 1): Synthesis of the tetraamine was carried out as followed. To a cooled solution of 2,2-dimethyl-1,3-propanediamine (60.7 g, 0.63 mol) in 95% ethanol, 1,2-dibromoethane (24.0 g, 0.13 mol) was added drop wise over 2 h. The reaction was heated to reflux for 2 h and stirred for additional 12 h at 50°C. After cooling potassium hydroxide (25.0 g) was added and again heated to reflux for 30 min. The precipitate from the cooled solution was filtered and washed with cold ethanol. The solution was evaporated to oil and excess of the diamine was distilled at reduced pressure (6–8 mbar, 45°C). The residue was dissolved in diethyl ether, filtrated, and evaporated. Product was distilled at reduced pressure, giving a clear liquid (0.1 mbar, 110°C) yield=10.5 g (35%), ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm)=0.83 (s, 12H), 1.32 (bs, 6H), 2.37 (bs, 4H), 2.49 (s, 4H), 2.65 (s, 4H)

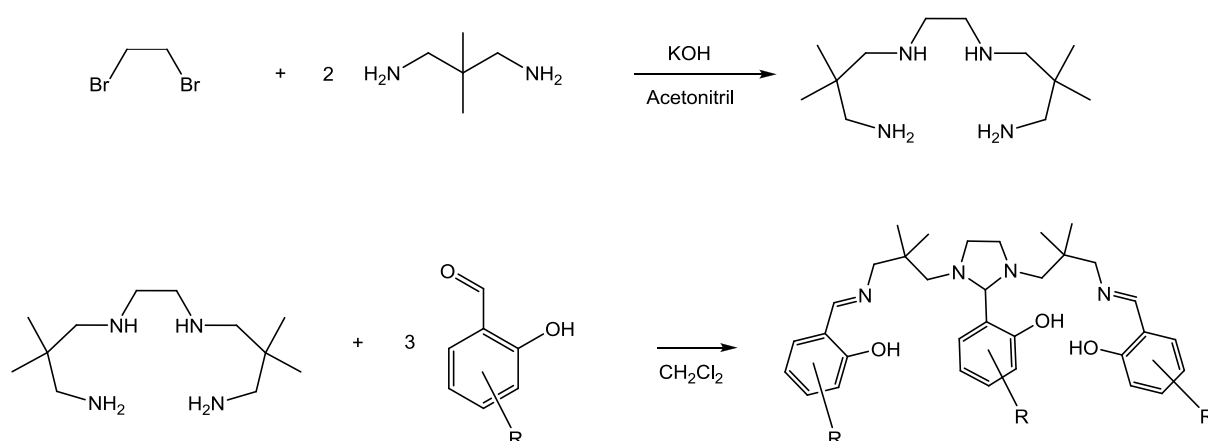


Fig. 1. General synthesis scheme of ligands.

General synthesis of ligands (2–7) (Fig. 2): 1.65 mmol of the corresponding salicylaldehyde was dissolved in 10–15 mL dry dichloromethane together with molecular sieve 4A. Compound (1) (125 mg, 0.54 mmol) in 1 mL dichloromethane was added, and the mixture was shaken overnight at room temperature. The molecular sieve was filtered off, washed with 5 mL dichloromethane, and the resulting solution was evaporated under reduced pressure leading to yellow to orange solids. Products were dried for 2 days under high vacuum. No further purification was needed.

(2) MFL1.MZ (2-(2-hydroxyphenyl)-1,3-bis[4-aza-5-(2-hydroxyphenyl)2,2-dimethyl-but-4-ene-1-yl]-1,3-imidazolidine): yield=98%, ^1H NMR(300MHz, CDCl_3) δ (ppm)=0.79 (s, 6H), 0.81 (s, 6H), 2.25 (d, 2H), 2.53 (d, 2H), 2.64 (d, 2H), 3.02 (d, 2H), 3.39 (d, 2H), 3.54 (d, 2H), 3.72 (s, 1H), 6.91 (m, 3H), 6.83 (m, 3H), 7.23 (m, 6H), 8.07 (s, 2H), 10.09 (s, 1H), 13.58 (s, 2H)

(3) ENBDMPI (2-(2-hydroxy-3-ethoxyphenyl)-1,3-bis[4-aza-5-(2-hydroxy-3-ethoxyphenyl)-2,2-dimethyl-but-4-ene-1-yl]-1,3-imidazolidine): yield=97%, ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm)= 0.78 (s, 6H), 0.80 (s, 6H), 1.37 (t, 3H), 1.46 (t, 6H), 2.27 (d, 2H), 2.52 (d, 2H), 2.64 (q, 2H), 3.02 (d, 2H), 3.37 (d, 2H), 3.50 (q, 2H), 3.75 (s, 1H), 4.02 (q, 2H), 4.08 (q, 4H), 6.70 (m, 7H), 6.86 (d, 2H), 8.03 (s, 2H), 10.25 (s, 1H), 14.08 (s, 2H)

(4) MFL3.MZ (2-(2-hydroxy-3,5-ditertbutylphenyl)-1,3-bis[4-aza-5-(2-hydroxy-3,5-ditertbutylphenyl)-2,2-dimethyl-but-4-ene-1-yl]-1,3-imidazolidine): yield=98%, ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm)=0.77 (s, 6H), 0.79 (s, 6H), 1.27 (m, 27H), 1.39 (m, 27H), 2.30 (d, 2H), 2.54 (d, 2H), 2.65 (q, 2H), 2.93 (d, 2H), 3.42 (d, 2H), 3.56 (q, 2H), 3.75 (s, 1H), 6.79 (d, 1H), 7.02 (d, 2H), 7.20 (d, 1H), 7.34 (d, 2H), 8.18 (s, 2H), 10.54 (s, 1H), 13.79 (s, 2H)

(5) MFL4.MZ (2-(2-hydroxy-5-tertbutylphenyl)-1,3-bis[4-aza-5-(2-hydroxy-3,5-ditertbutylphenyl)-2,2-dimethyl-but-4-ene-1-yl]-1,3-imidazolidine): yield=98%, ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm)=0.77 (s, 6H), 0.79 (s, 6H), 1.27 (m, 27H), 2.27 (d, 2H), 2.54 (d, 2H), 2.65 (d, 2H), 3.02 (d, 2H), 3.40 (d, 2H), 3.53 (q, 2H), 3.72 (s, 1H), 3.91 (s, 2H), 6.66 (d, 1H), 6.83 (d, 1H), 7.07 (d, 1H), 7.17 (m, 2H), 7.31 (m, 3H), 8.17 (s, 2H), 10.04 (s, 1H), 13.34 (s, 2H)

(6) MFL5.MZ (2-(2-hydroxy-3-methoxy-5-bromophenyl)-1,3-bis[4-aza-5-(2-hydroxy-3-methoxy-5-bromophenyl)-2,2-dimethylbut-4-ene-1-yl]-1,3-imidazolidine): yield=98%, ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm)=0.78 (s, 6H), 0.80 (s, 6H), 2.23 (d, 2H), 2.50 (d, 2H), 2.63 (q, 2H), 3.10 (d, 2H), 3.36 (d, 2H), 3.49 (d, 2H), 3.67 (s, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.86 (s, 6H), 6.69 (d, 1H), 6.74 (d, 1H), 6.88 (d, 2H), 6.92 (d, 2H), 7.96 (s, 2H), 10.28 (s, 1H), 14.24 (s, 2H)

(7) MFL6.MZ (2-(2-hydroxy-5-bromophenyl)-1,3-bis[4-aza-5-(2-hydroxy-5-bromophenyl)-2,2-dimethyl-but-4-ene-1-yl]-1,3-imidazolidine): yield=98%, ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm)= 0.80 (s, 6H), 0.82 (s, 6H), 2.23 (d, 2H), 2.50 (d, 2H), 2.63 (q, 2H), 3.08 (d, 2H), 3.36 (d, 2H), 3.53 (q, 2H), 3.66 (s, 1H), 6.59 (d, 1H), 6.80 (d, 2H), 7.03 (d, 1H), 7.15 (d, 1H), 7.27 (d, 2H), 7.32 (d, 1H), 7.35 (d, 1H), 8.01 (s, 2H), 9.82 (s, 1H), 13.48 (s, 2H)

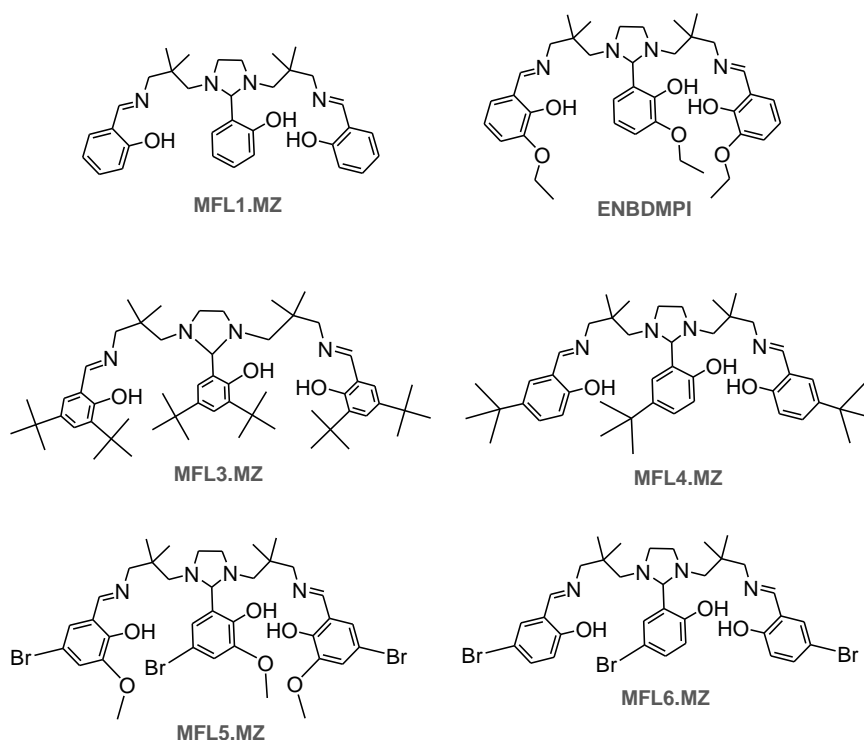


Fig. 2. Ligands investigated in this study (MFL1.MZ–MFL6.MZ and ENBDMPI).

Reference Ga-Complex Formation

(8) Ga–MFL6.MZ: Compound (7) (115 mg, 0.5 mmol) was dissolved in 10 mL methanol, and Ga(acac)₃ (183 mg, 0.5 mmol) in 2 mL methanol was added. The solution was heated to reflux for 30 min. To the cooled solution, KI (100 mg, 0.6 mmol) in water was added. Slow evaporation of the solvent over 4 weeks yielded yellow crystals suitable for X-ray analysis.

⁶⁸Ga-radiolabeling

⁶⁸Ga-labeling: Elution of the ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga generator and purification of the eluate was carried out as described [10, 11]. In brief, ⁶⁸Ga is eluted from the generator with 10 mL 0.1 M HCl and is online immobilized on an acidic cation exchanger. Metal impurities are removed by 1 mL of a mixture of acetone and hydrochloric acid (80% acetone/0.15 M HCl). Subsequently, ⁶⁸Ga is eluted quantitatively in 400 μL of a second mixture of acetone and HCl (97.6% acetone/0.05 M HCl) from the cation exchanger. This fraction serves as an ideal low volume, low acidic, and chemically highly pure source of ⁶⁸Ga for subsequent labeling.

Labeling was performed with 20–40 μL of a ligand solution (1 mg/mL in ethanol, 30 nmol for each ligand) in 400 μL 0.12 M HEPES sodium salt buffer at pH=4.3 by addition of the purified ^{68}Ga -fraction in 1.5 mL Eppendorf vials at different temperatures (room temperature to 80°C) within 1–10 min (Fig. 3). Determination of radiochemical labeling yield and complex formation kinetics were carried out by TLC on silica and RP-18 plates with 90% methanol/10% isotonic saline and were measured on a Canberra Packard Instant Imager.

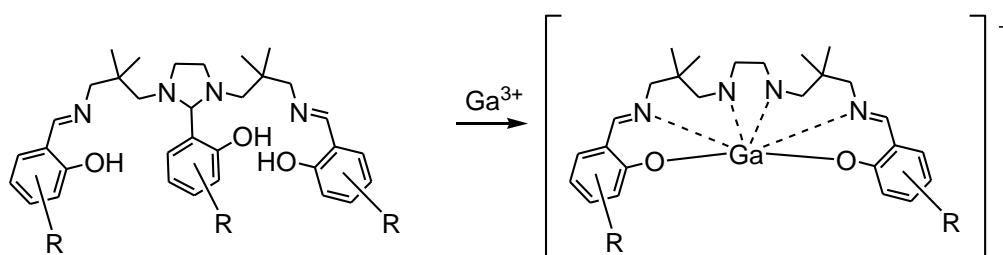


Fig. 3. Complex formation of ligands with Ga^{3+} by ring opening and subsequent formation of the octahedral monocationic complex.

Purification of low yielding complexes was carried out by passing the reaction mixture over a Sep-Pak silica cartridge with subsequent elution by 1 mL ethanol. For labeling yields $>92\%$, no further purification was carried out; only the pH was adjusted to ~ 7 by addition of 8.7 μL 1 M sodium hydroxide. This solution was applicable for *in vitro* and *in vivo* measurements with a total volume of 0.5 mL.

Determination of the Partition Coefficient (Log D)

The partition coefficient at pH 7.4 and therefore the lipophilicity was measured as follows. Each ^{68}Ga -complex was immobilized on a Waters C18 light cartridge or a Merck Silica cartridge (for ^{68}Ga -MFL3.MZ), respectively, from the reaction mixture, washed with 1 mL water, and eluted with 2 mL ethanol. The ethanol was evaporated and the tracer resuspended in phosphatebuffered saline (PBS) buffer. Of this solution, 700 μL was added to 700 μL octanol and mixed for 2 min at $1,500 \text{ min}^{-1}$ at room temperature in a HLC Biotech HeatingThermoMixer MHR 13. After centrifugation at $12,000 \text{ min}^{-1}$ for 2 min, a 3 μL aliquot of the octanol and the water layer was spotted on paper and counts were measured in a Canberra Instant Imager. Of the octanol layer, 400 μL was removed and added to 300 μL octanol and 700 μL PBS buffer. The procedure was repeated, and the partition coefficient was calculated as the ratio of CPM of octanol to CPM of water. Experiments were

conducted in quadruplicate, and the average log D value of two back extractions for the four trials was reported.

Tumor and Animal Model

The subline AT1 of the rat R-3327 Dunning prostate carcinoma was used in all experiments. This cell line functionally expresses Pgp [14]. Cells were grown in RPMI medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) at 37°C under a humidified 5% CO₂ atmosphere and subcultivated once per week. Prior to the experiments, cells were transferred to RPMI medium without additional FCS supplementation for 24 h.

For *in vivo* experiments male Copenhagen rats (Charles River Wiga, Sulzfeld, Germany; body weight 150 to 200 g) housed in the animal care facility of the University of Mainz were used in this study. Animals were allowed access to food and acidified water ad libitum before the investigation. All experiments had previously been approved by the regional animal ethics committee and were conducted in accordance with the German Law for Animal Protection and the UKCCCR Guidelines [15]. Solid carcinomas of the R3327-AT1 cell line were heterotopically induced by injection of AT1 cells (approximately 0.4 mL 10⁴ cells/μL) subcutaneously into the dorsum of the hind foot. Tumors grew as flat, spherical segments and replaced the subcutis and corium completely. Volumes were determined by measuring the three orthogonal diameters (d) of the tumors and using an ellipsoid approximation with the formula: $V=d1 \times d2 \times d3 \times \pi/6$. Tumors were used when they reached a volume of between 1.0 and 2.0 mL approximately 10 to 14 days after tumor cell inoculation.

Tracer Uptake Assay *In vitro*

In order to assess the functional activity of Pgp, the uptake of the proposed ⁶⁸Ga tracer into tumor cells in the presence or absence of a specific Pgp-inhibitor (verapamil) was determined. This technique (using fluorescent Pgp substrates) has been shown to be a suitable parameter of the Pgp activity [16]. After keeping the cells in serumfree medium for 24 h prior to the experiments, the cells were incubated with the tracer in medium (only pmol of the ⁶⁸Ga-tracer together with the uncomplexed ligand, together 30 nmol). In a second set of experiments, cells were incubated with a combination of the tracer and verapamil (VPL) at a concentration of 10 μM (stock solution 5 mM, dissolved in ethanol). After incubation at 37°C for 30 min, the cells were centrifuged and the activity

of the supernatant as well as of the cell pellet was determined separately in a curiemeter (M2316, Messelektronik Dresden GmbH, Germany). The tracer is taken up into the cell by passive diffusion. The fraction of the activity kept in the cell pellet is therefore a measure for the cellular uptake into the cell and is mainly affected by the lipophilic solubility of the tracer. Since VPL inhibits the active efflux of Pgp substrates, the intracellular concentration will be higher in the presence of verapamil. The activity ratio in the presence and absence of VPL can therefore be used as a measure of Pgp activity.

Animal PET Studies

For PET imaging, the tracers, ^{68}Ga -ENBDMPI and ^{68}Ga -MFL6.MZ, were used. Rats were anesthetized with pentobarbital (40 mg/kg, i.p., Narcoren, Merial, Hallbergmoos, Germany), and a catheter was inserted into the left jugular vein for radiotracer application and a tube was placed in the trachea. The PET imaging was performed on a microPET Focus 120 small animal PET (Siemens/Concorde, Knoxville, USA). During PET measurements, the animals were placed in supine position and breathed room air spontaneously through a tracheal tube. Dynamic PET studies were acquired in 3D mode for 60 min with a mean activity of 40.3 ± 3.8 MBq (^{68}Ga -MFL6.MZ) and 36.7 ± 3.6 MBq (^{68}Ga -ENBDMPI). The radiotracer was administered as a bolus injection via the catheter in the left jugular vein of each animal. The PET listmode data was histogrammed into 14 frames and reconstructed using OSEM algorithm. Volumes of interests were defined for tumor and reference tissue (testis). Ratios of tumor to reference tissue were calculated from integral image between 30' and 60' after tracer injection.

In order to assess whether tracer accumulation is correlated with the Pgp activity in the tissue, Pgp was inhibited *in vivo* by intratumoral injection of VPL. Therefore, verapamil was dissolved in ethanol at a concentration of 1 mM. Small amounts of this solution (10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ tumor volume) were injected directly into one of the tumors of the animals 10 min prior to tracer injection leading to a tissue concentration comparable of that used in the cell experiments. The contralateral tumor of each animal served as a control. In this tumor the same amount of ethanol alone, i.e., without the ^{68}Ga -compounds was injected.

Biodistribution Measurements

In order to assess the distribution of the tracer ^{68}Ga -MFL6.MZ in different organs of the animals, the tracer was injected i.v. in anesthetized tumor-bearing rats. After 60 min, the animals were

ethanized, and different organ (blood, brain, heart, kidney, liver, lung, spleen, testis) and tumor samples were taken. The tissue samples were weighed and dissolved in 5 mL 4 M KOH at 75°C for 30 min. Finally, the ^{68}Ga activity in the organs was measured in a gamma counter (Perkin Elmer 2470 Wizard²).

Statistical Analysis

Results are expressed as means \pm SEM. Differences between groups were assessed by the two-tailed Wilcoxon test for paired or unpaired samples. The significance level was set at $\alpha=5\%$ for all comparisons.

Results

Chemistry

Synthesis of the ligands resulted in products of high yields (>97%) and high purity. Complexation of MFL6.MZ with $\text{Ga}(\text{acac})_3$ affords crystals suitable for X-ray structure determination (Fig. 4). This revealed the estimated octahedral monocationic complex with four nitrogen and two phenolic oxygen donors.

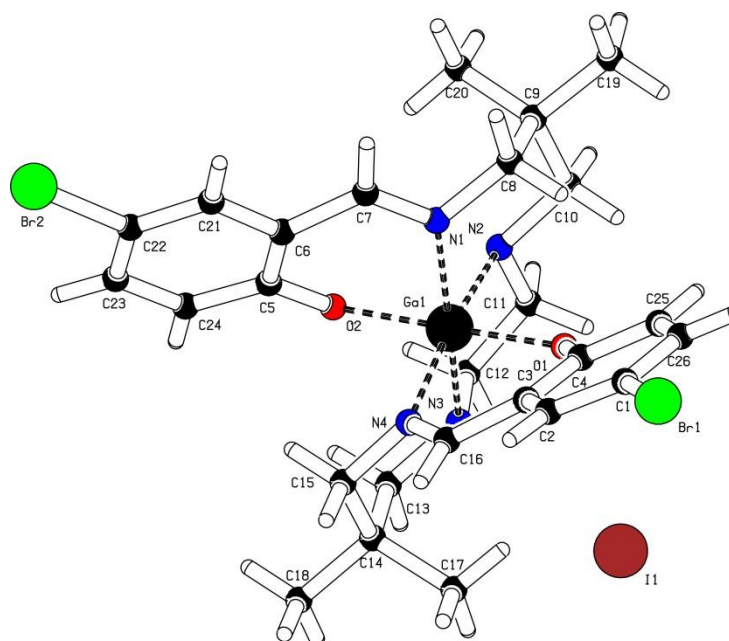


Fig. 4. X-ray structure of inactive $[\text{Ga}(\text{MFL6.MZ})]^+\text{I}^-$ complex.

Labeling with generator-derived ^{68}Ga in HEPES buffer by addition of the purified ^{68}Ga fraction is fast and efficient. Fig. 5 shows kinetics of ^{68}Ga -MFL6.MZ complex formation. The labeling yields of the investigated ligands after 10 min heating at 75°C were >92% for all compounds beside MFL3.MZ which showed only ~55%. However, ^{68}Ga -MFL3.MZ could be purified in a second step in a fast and easy method using commercially available silica solid phase separation cartridges leading to radiochemical purity of >95%. For all the other ^{68}Ga -Schiff base complexes with labeling yields >92%, further purification was not performed.

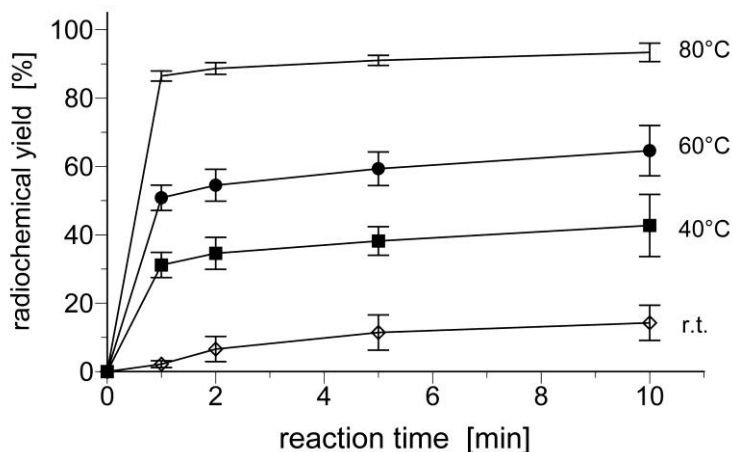


Fig. 5. ^{68}Ga -labeling kinetics of MFL6.MZ (30 nmol ligand, 400 μL 0.12 M Na-HEPES buffer, r.t. to 80°C, 1–10 min). Values are expressed as means \pm SD of three experiments.

Determining the partition coefficients of the compounds showed that the average log D value of two back extractions varied between 1.60 and 3.20 (Table 1) and is only dependent on the aromatic substituents of the ligand structure. It is a helpful indicator for the passive uptake of compounds into the cell. However, it is not a prejudication for determination of transport ability of the ^{68}Ga -tracer by Pgp.

Table 1. Lipophilicity of the compounds expressed by the partition coefficient

Compound	Log D
^{68}Ga -MFL1.MZ	1.60 \pm 0.03
^{68}Ga -ENBDMPI	2.03 \pm 0.09
^{68}Ga -MFL3.MZ	3.20 \pm 0.15
^{68}Ga -MFL4.MZ	2.43 \pm 0.12
^{68}Ga -MFL5.MZ	2.72 \pm 0.14
^{68}Ga -MFL6.MZ	2.49 \pm 0.07

In vitro and In vivo Studies

An applicable tracer for measuring the Pgp activity has to fulfill two features: (1) it should enter the cell easily (by passive diffusion) and (2) the tracer should be a substrate of the Pgp and this transport should be inhibitable by Pgp inhibitors (e.g., verapamil). In order to measure the passive uptake of the ^{68}Ga -Schiff base complexes, cells were incubated with the tracer for 30 min after which the suspension was centrifuged and the activity in the cells as well as in the supernatant was determined. In a second series, the cells were incubated in the presence of VPL. Fig. 6 shows the fraction of ^{68}Ga -complexes detected inside the cells for all tracers in the absence or presence of VPL. The ligand ENBDMPI was described by Sharma et al. [12]. Since the cytocrit of the cell suspension was only $0.28 \pm 0.05\%$, all tracers show a specific enrichment in the cells. However, the passive uptake was much more pronounced with the ^{68}Ga -MFL6.MZ tracer. In this case, more than 20% of the tracer was found within the cells. The tracer ^{68}Ga -MFL3.MZ, which was most lipophilic (Table 1), shows the largest enrichment in the cellular compartment (Fig. 6), presumably in the cell membrane.

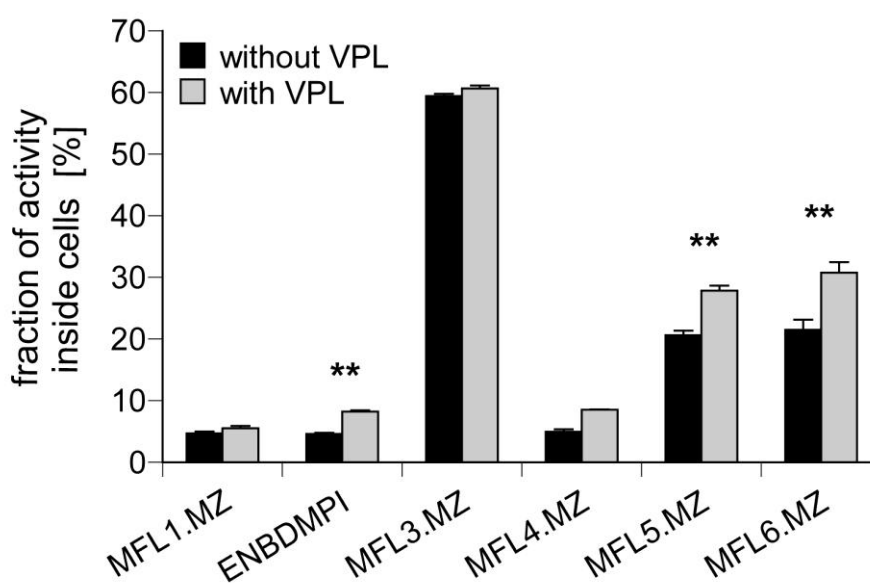


Fig. 6. Fraction of ^{68}Ga activity within AT1 cells after 30 min of incubation with various tracers in the presence and absence of verapamil (VPL). Values are expressed as means \pm SEM of three to nine experiments; ** $p < 0.01$ with VPL vs. without VPL.

All tracers were identified to be substrate of the Pgp since the active efflux could be inhibited by verapamil resulting in a higher intracellular concentration (Fig. 6). In the presence of VPL the concentration of ^{68}Ga -ENBDMPI was $178 \pm 5\%$ of that without VPL, whereas for ^{68}Ga -MFL6.MZ, the ratio was $144 \pm 3\%$. The efflux transport of the lipophilic tracer ^{68}Ga -MFL3.MZ which shows the

highest cellular accumulation showed only a negligible dependency on VPL indicating the Pgp plays only a minor role for the transport of this substance.

From these *in vitro* experiments it became evident that ^{68}Ga -MFL6.MZ showed the best compromise of good passive uptake into the cells and pronounced Pgp-mediated efflux inhibitable by VPL. For this reason further *in vivo* experiments were performed with this tracer and (for comparison) with ^{68}Ga -ENBDMPI which is the compound described by Sharma et al. [12].

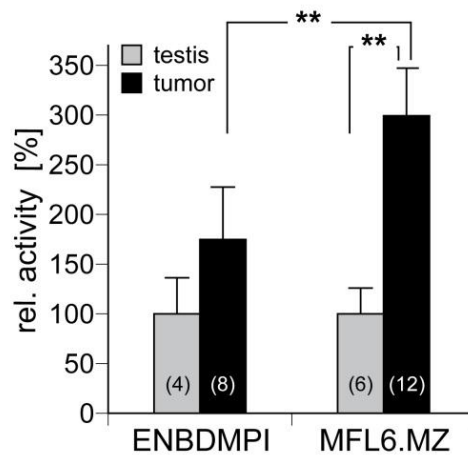


Fig. 7. Accumulation of ^{68}Ga -ENBDMPI and ^{68}Ga -MFL6.MZ in AT1 tumors and a reference tissue (testis) *in vivo*. Values are expressed as means \pm SEM; ** $p < 0.01$; number of tumors in brackets.

Subsequently, both tracers were used in PET experiments with tumor-bearing rats. Fig. 7 shows the averaged activity in tumor and testes between 6 and 60 min of the measuring period. ^{68}Ga -MFL6.MZ is strongly accumulated in the tumor resulting in a three times higher concentration as compared to the reference tissue. ^{68}Ga -ENBDMPI is enriched to a much smaller extent in the tumor by only 74% (μ -PET image shown in Fig. 8). These results are in good accordance to the cell culture experiments (Fig. 6).

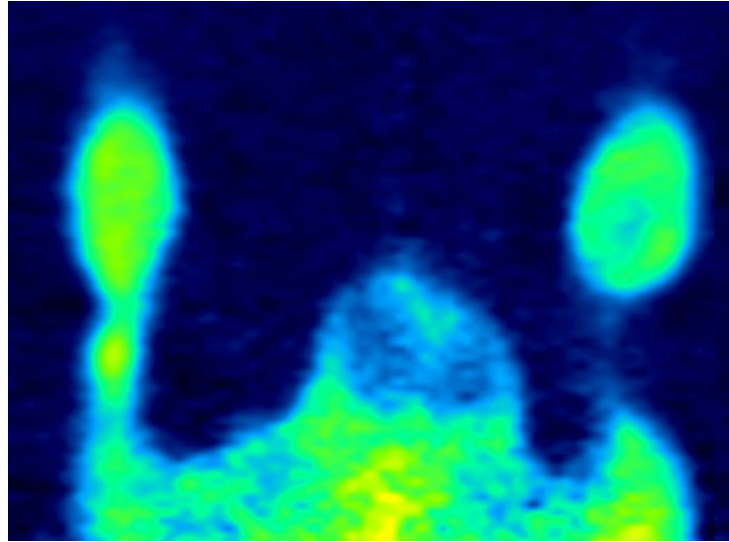


Fig. 8. μ -PET image of ^{68}Ga -ENBDMPI accumulation in AT1 tumors (summed 30' to 60' p.i.).

In order to assess whether the ^{68}Ga -MFL6.MZ concentration in the tumor is dependent on the Pgp activity, 10 to 20 μL of 1 mM verapamil solution was injected directly into one of the two tumors of an animal. The contralateral tumor served as control by injecting the same amount of ethanol. Fig. 9 shows an example of these experiments. The tumor with the VPL injection shows locally a higher tracer accumulation as the contralateral control tumor. These results correspond well to the cell culture experiments (Fig. 6). Fig. 10 shows the results of four animals. The data clearly demonstrate that VPL injection leads to a much higher tracer accumulation (factor 1.3) as a consequence of an inhibited Pgp activity resulting in a reduced ^{68}Ga -MFL6. MZ efflux out of the cells.

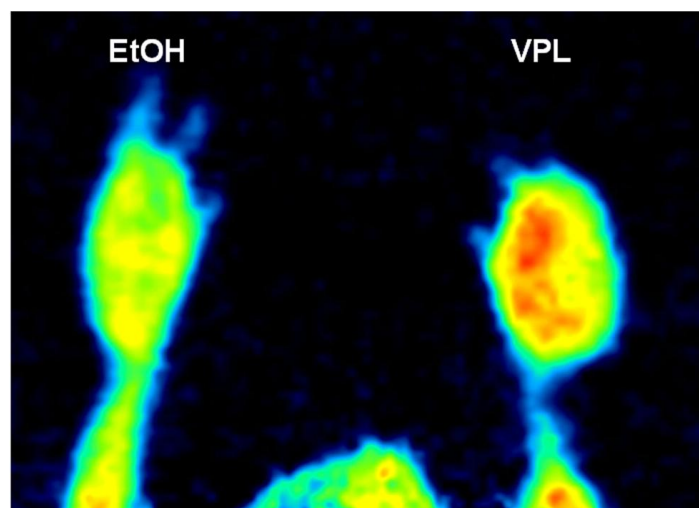


Fig. 9. Example of ^{68}Ga -MFL6.MZ accumulation in AT1 tumors between 30' and 60' p.i. In the right tumor ("VPL") 20 μL of verapamil solution (1 mM in EtOH) was injected. The contralateral tumor received the same volume of EtOH alone ("EtOH").

Table 2 finally shows the distribution of ^{68}Ga -MFL6.MZ in the blood and different organs. The highest concentrations were found in the liver and the kidney (40- and 103-times higher than in the blood). The concentrations in heart, spleen, and tumor were markedly lower. The lowest ^{68}Ga -MFL6.MZ level was found in the brain which is maybe the result of an active Pgp transport out of the brain tissue at the blood–brain barrier.

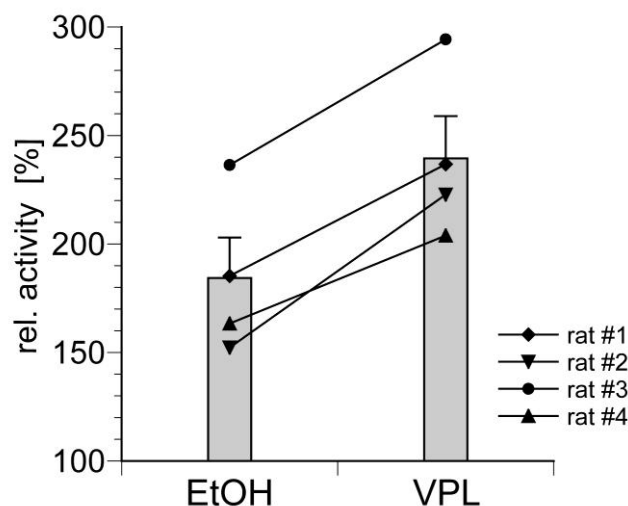


Fig. 10. Impact of verapamil injection into the tumor tissue in vivo on the accumulation of ^{68}Ga -MFL6.MZ between 30' and 60' p.i. expressed as the relative activity related to the testis. Verapamil was injected into one of the two implanted tumors ("VPL"). The contralateral tumor of the same animal served as control (injection of an equivalent volume of EtOH, "EtOH"). Values are expressed as means \pm SEM.

Discussion

Since the activity of the Pgp transporter is of high importance not only in oncology (multidrug resistance of tumors) but also in neurology/psychiatry (drug uptake through the blood–brain barrier), the measurement of this parameter is of importance for the clinical setting. For this reason, imaging techniques have been developed to noninvasively assess the Pgp transport rate. Positron emitterlabeled substrates or blockers of the Pgp have used mostly carbon-11 labeled compounds to visualize the Pgp activity by means of PET (e.g., for determining the role of the Pgp and the blood–brain barrier [17, 18]). These experiments revealed the possibility of functional imaging with PET. However, ^{11}C is a radionuclide with a short half-life time (20 min) that has to be produced at a cyclotron, which makes this positron emitter less suitable for clinical routine. Radionuclides, which

can be obtained directly in the laboratory (generator-based tracers), would be beneficial. Besides PET, SPECT has been used to assess the Pgp activity [5, 6, 19]. However, positron emitters for PET have a higher spatial resolution compared to SPECT and provide quantitative biochemical and physiological parameters.

Starting with the compound $[^{68}\text{Ga}(3\text{-ethoxy-ENBDMPI})]^+$ described by Sharma and coworkers [12, 13], various ^{68}Ga -labeled Schiff base-based tracers differing in side chains and substituents have been synthesized. Labeling the desired ligands with ^{68}Ga in HEPES buffer is much faster than the procedure published by Sharma et al. As the intermediate synthesis of $^{68}\text{Ga}(\text{acac})_3$ is avoided, the reaction time is only 20 min starting from elution of the generator (compared to 60 min with the preparation of the ^{68}Ga -acetylacetonate synthon [12, 13]). The radiochemical yields are comparable to the procedure described by Sharma and coworkers, however with a shorter reaction time (~25 min compared to 60 min by Sharma), higher batch activities and specific activities can be achieved.

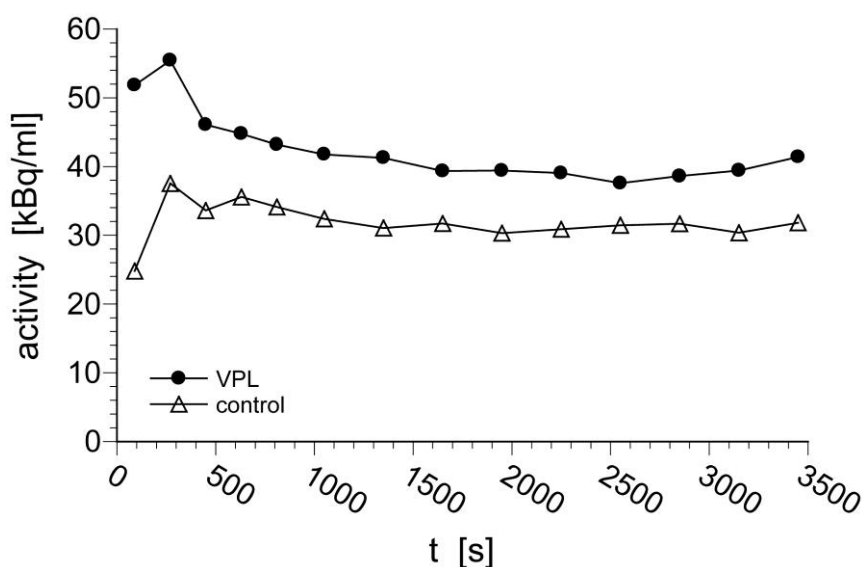


Fig. 11. Time activity curve showing *in vivo* blocking experiment with verapamil (“VPL”) directly injected in one tumor of the animal prior to injection of the tracer ^{68}Ga -MFL6.MZ. For control, the contralateral tumor is also presented.

The ability of using these ^{68}Ga -compounds depends mainly on their cellular uptake and the Pgp-mediated efflux. The first parameter was evaluated *in vitro* by the accumulation of ^{68}Ga -complexes in the cellular compartment. With respect to this parameter, the various tracers differed profoundly. Taking into account that the volume fraction of the cells (cytocrit) was only ~0.3%, the concentration ratio between cells and medium was approximately 16:1 for the tracers ^{68}Ga -MFL1.MZ,

^{68}Ga -ENBDMPI, and ^{68}Ga -MFL4.MZ. For ^{68}Ga -MFL5.MZ and ^{68}Ga -MFL6.MZ, the cellular concentration was ~90 times higher than in the medium, whereas ^{68}Ga -MFL3.MZ showed a concentration ratio of 490. The extremely high uptake of ^{68}Ga -MFL3.MZ seems to be the result of a high lipophilicity (Table 1) leading to a very high passive permeation through the cell membrane. These results clearly demonstrate that all ^{68}Ga -labeled compounds show a marked uptake and accumulation in tumor cells. High cellular tracer concentrations are important for a good signal-to-noise ratio of the PET signal. From this point of view, the ligand MFL3.MZ appears to be most suitable, but also MFL5.MZ and MFL6.MZ are promising.

As a second aspect for a suitable Pgp tracer is that the compound is a substrate for Pgp, the compounds efflux in a Pgp-expressing cell should be inhibitable by Pgp-inhibitor (e.g., verapamil), leading to an increased intracellular concentration of the ^{68}Ga -complex. For this reason the ratio of cellular concentration of a Pgp substrate in the presence and absence of verapamil could be used as an indicator of the Pgp-mediated transport rate of the tracer [16]. This ratio was ~1.2 for ^{68}Ga -MFL1.MZ, ~1.7 for ^{68}Ga -ENBDMPI and ^{68}Ga -MFL4.MZ, and ~1.4 for ^{68}Ga -MFL5.MZ and ^{68}Ga -MFL6.MZ. Only for the lipophilic tracer ^{68}Ga -MFL3.MZ (which showed the most pronounced cellular accumulation), inhibition of Pgp had practically no impact on the cellular tracer accumulation (Fig. 6). This relatively small effect of Pgp inhibition seems to be the result of non-specific binding to membranes and lipophilic compartments of the cells.

In the present study, the concentration ratio between blocked and unblocked cells for the compound ^{68}Ga -ENBDMPI was only 1.78 and thus smaller than in the experiments by Sharma et al. [12] who found a concentration ratio of 6. The difference may be the result of different cell lines used showing different functional Pgp expression or variations in the pharmacological Pgp blocking by the inhibitors used (verapamil vs. GF120918). In conclusion, the tracers analyzed in our assay showed pronounced differences in the cellular uptake as well as in their potential of being a substrate for Pgp. As the compound ^{68}Ga -MFL6.MZ showed the best compromise concerning absolute uptake and inhibition ratio, it was chosen for *in vivo* experiments.

Since Pgp is an active drug transporter depending on ATP as an energy source, the withdrawal of energy may be a mechanism by which Pgp-related chemoresistance might be counteracted [20]. However, since previous studies showed that even a complete glucose deprivation of tumor cells does not affect the functional Pgp activity [21] (presumably due to energy production via other metabolic pathways), it is not expected that glucose depletion affects the cellular distribution of the Pgp tracers.

Table 2. Biodistribution of ^{68}Ga -MFL6.MZ in tumor-bearing rats 60 min after injection

Tissue	%ID/g tissue	Tissue-to-blood ratio
Blood	0.08 ± 0.01	
Lung	0.45 ± 0.03	5.9
Heart	0.89 ± 0.02	12
Spleen	0.97 ± 0.06	13
Liver	3.01 ± 0.08	39
Kidney	7.94 ± 0.19	103
Testis	0.05 ± 0.01	0.4
Brain	0.03 ± 0.01	0.7
Tumor	0.17 ± 0.02	2.3

Values are expressed as means±SEM of the injected dose (2.6 ± 0.1 MBq) normalized to 1 g of tissue ($n=3$ experiments)

Biodistribution experiments (Table 2) demonstrated that this ^{68}Ga -labeled complex was mostly accumulated in the liver and the kidney but also in the heart and spleen. Organs which express high levels of Pgp activity (e.g., brain or testis [1]) but also the multidrug-resistant AT1 tumors used in the present study show lower tracer concentrations. These results are in accordance with data for other SPECT ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Sestamibi [6]) or PET [12, 13, 22] tracers. Comparing the biodistribution data of ^{68}Ga -MFL6.MZ with those of ^{68}Ga -ENBDMPI [13] revealed that on average the tissue-to-blood ratio of the new tracer was slightly lower, however the variability between the different organs was comparable in its range. The differences between the two tracers may be the result of using different animal models in both studies (rats vs. mice) [13]. PET imaging (Figs. 8 and 9) as well as biodistribution measurements [13] reveal that the accumulation in the tumor is in the same magnitude as in the skeletal muscle. For this reason, the imaging contrast between these two tissues is not very high. However, the tracers developed in the present study are not aimed at identifying tumors but at determining the Pgp activity in these tumors. For this reason, a high tumor-to-muscle contrast is not needed. In addition, many of the chemoresistant tumors are not located within the muscle but in the fat tissue (e.g., mammary carcinomas), the lung or bone (e.g., metastases), or the abdominal cavity (e.g., prostate carcinomas). In these tissues, mostly a good contrast between tumor and the surrounding tissue is obtained.

In the *in vivo* experiments with two tracers (^{68}Ga -ENBDMPI and ^{68}Ga -MFL6.MZ), intratumoral concentration was markedly higher than in the testis (reference region in the field of view of the PET images). The intratumoral level of ^{68}Ga -MFL6.MZ was significantly higher (factor 1.74) than for

⁶⁸Ga-ENBDMPI (Figs. 7 and 8). These results correspond well with the *in vitro* data (Fig. 6) where ⁶⁸Ga-ENBDMPI showed a much lower intracellular accumulation. To test whether the intratumoral concentration depends on the functional transport activity, Pgp was blocked by verapamil. Since VPL cannot be applied systemically at the necessary concentration, a small amount of VPL was injected directly intratumorally leading to a marked increase in the tracer accumulation as a result of Pgp inhibition (Figs. 9–11). Since the intratumoral ⁶⁸Ga-activity may depend on the injected dose or other physiological properties (e.g., systemic blood pressure as the driving force of perfusion), the contralateral tumor served as control. Other groups have used the difference of the intratumoral tracer accumulation in Pgp-expressing and Pgp-negative tumors as an indication of the Pgp specificity of the tracer [7, 13, 23]. One problem of the procedure of the present study may be pressure artifacts by direct intratumoral injection. However, the injected volume was rather small (20 µL), and for comparison, the same amount of solvent was injected contralaterally. For this reason, the increase in tracer concentration after VPL injection is solely by inhibition of Pgp.

The µ-PET studies revealed in the tumors of a volume between 1 and 2 mL that the tracer was heterogeneously distributed (Fig. 10). Since the morphological structure in these tumors does not show differences (homogeneous cell distribution, no necrosis), the differences might be caused by either inhomogeneous Pgp expression or functional heterogeneities of the transporter activity. By immunohistological staining, it was seen that the Pgp expression does not show pronounced differences (data not shown). For this reason, the differences are presumably the result of functional differences which in turn might arise from variations of the local pH. Previous studies using the same tumor model could demonstrate that an extracellular acidosis increases Pgp transport activity markedly [14, 24]. Therefore, regional differences in the tracer distribution can originate from local pH gradients. However, further studies need to elucidate whether the pH indeed affects the PET tracer accumulation due to altered Pgp activity.

In conclusion, the present study describes modified ⁶⁸Ga-labeled Schiff base ligand-based PET tracers for effectively assessing the functional activity of Pgp *in vivo*. Varying the molecular structure of the complex ligands, tracers with optimal properties can be identified. These tracers shall be used in the future to, for example, optimize the treatment planning by identifying patients with chemoresistant tumors. In parallel, these compounds could also be helpful for tumor biological studies on the impact of metabolic parameters (e.g., pH) on the functional activity of Pgp or for the development of clinically applicable Pgp inhibitors.

Acknowledgments

The study was supported by the European Union (project COST D38 and BM0607) and the Deutsche Krebshilfe (grant 109136).

Conflict of Interest Disclosure

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Schinkel, A.H.; Jonker, J.W. *Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview*. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 55: 3-29, 2003.
2. Higgins, C.F. *ABC transporters: physiology, structure and mechanism - an overview*. *Res. Microbiol.* 152: 205-10, 2001.
3. Chang, G. *Multidrug resistance ABC transporters*. *FEBS Lett.* 555: 102-105, 2003.
4. Fojo, T.; Bates, S. *Strategies for reversing drug resistance*. *Oncogene* 22: 7512-7523, 2003.
5. Hendrikse, N.H.; Franssen, E.J.; van der Graaf, W.T.; Vaalburg, W.; de Vries, E.G. *Visualization of multidrug resistance in vivo*. *Eur. J. Nucl. Med.* 26: 283-293, 1999.
6. Liu, Z.; Stevenson, G.D.; Barrett, H.H.; Kastis, G.A.; Bettan, M.; Furenlid, L.R. et al. *Imaging recognition of multidrug resistance in human breast tumors using ^{99m}Tc-labeled monocationic agents and a high-resolution stationary SPECT system*. *Nucl. Med. Biol.* 31: 53-65, 2004.
7. Kurdziel, K.A.; Kalen, J.D.; Hirsch, J.I.; Wilson, J.D.; Agarwal, R.; Barrett, D. et al. *Imaging multidrug resistance with 4-[¹⁸F]fluoropaclitaxel*. *Nucl. Med. Biol.* 34: 823-831, 2007.
8. Vaalburg, W.; Hendrikse, N.H.; Elsinga, P.H.; Bart, J.; Van, W.A. *P-glycoprotein activity and biological response*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207: 257-260, 2005.
9. Hsiao, P.; Sasongko, L.; Link, J.M.; Mankoff, D.A.; Muzi, M.; Collier, A.C. et al. *Verapamil P-glycoprotein transport across the rat blood-brain barrier: cyclosporine, a concentration*

- inhibition analysis, and comparison with human data.* J. Pharmacol. Exp. Ther. 317: 704-710, 2006.
10. Zhernosekov, K.P.; Filosofov, D.V.; Baum, R.P.; Aschoff, P.; Bihl, H.; Razbash, A.A. et al. *Processing of generator-produced ^{68}Ga for medical application.* J. Nucl. Med. 48: 1741-1748, 2007.
 11. Asti, M.; De Pietri, G.; Fraternali, A.; Grassi, E.; Sghedoni, R.; Fioroni, F. et al. *Validation of $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generator processing by chemical purification for routine clinical application of ^{68}Ga -DOTATOC.* Nucl. Med. Biol. 35: 721-724, 2008.
 12. Sharma, V.; Beatty, A.; Wey, S.P.; Dahlheimer, J.; Pica, C.M.; Crankshaw, C.L. et al. *Novel gallium(III) complexes transported by MDR1 P-glycoprotein: potential PET imaging agents for probing P-glycoprotein-mediated transport activity in vivo.* Chem. Biol. 7: 335-343, 2000.
 13. Sharma, V.; Prior, J.L.; Belinsky, M.G.; Kruh, G.D.; Piwnica-Worms, D. *Characterization of a $^{67}\text{Ga}/^{68}\text{Ga}$ radiopharmaceutical for SPECT and PET of MDR1 P-glycoprotein transport activity in vivo: validation in multidrug-resistant tumors and at the blood-brain barrier.* J. Nucl. Med. 46: 354-364, 2005.
 14. Thews, O.; Gassner, B.; Kelleher, D.K.; Schwerdt, G.; Gekle, M. *Impact of extracellular acidity on the activity of p-glycoprotein and the cytotoxicity of chemotherapeutic drugs.* Neoplasia 8: 143-152, 2006.
 15. Workman, P.; Twentyman, P.; Balkwill, F.; Balmain, A.; Chaplin, D.J.; Double, J.A. et al. United Kingdom Co-ordinating Committee on Cancer Research (UKCCCR) *Guidelines for the Welfare of Animals in Experimental Neoplasia* (2nd edit.). Br. J. Cancer 77: 1-10, 1998.
 16. Kunikane, H.; Zalupski, M.M.; Ramachandran, C.; Kuruga, M.A.; Lucas, D.; Ryan, J.R. et al. *Flow cytometric analysis of p-glycoprotein expression and drug efflux in human soft tissue and bone sarcomas.* Cytometry 30: 197-203, 1997.
 17. Hendrikse, N.H.; de Vries, E.G.; Eriks-Fluks, L.; van der Graaf, W.T.; Hospers, G.A.; Willemsen, A.T. et al. *A new in vivo method to study P-glycoprotein transport in tumors and the blood-brain barrier.* Cancer. Res. 59: 2411-2416, 1999.
-

-
18. Syvänen, S.; Blomquist, G.; Sprycha, M.; Höglund, A.U.; Roman, M.; Eriksson, O. et al. *Duration and degree of cyclosporin induced P-glycoprotein inhibition in the rat blood-brain barrier can be studied with PET*. Neuroimage 32: 1134-1141, 2006.
 19. Wang, J.H.; Scollard, D.A.; Teng, S.; Reilly, R.M.; Piquette-Miller, M. *Detection of P-glycoprotein activity in endotoxemic rats by ^{99m}Tc-sestamibi imaging*. J. Nucl. Med. 46: 1537-1545, 2005.
 20. Xu, R.H.; Pelicano, H.; Zhou, Y.; Carew, J.S.; Feng, L.; Bhalla, K.N.; Keating, M.J.; Huang, P. *Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia*. Cancer Res. 65: 613-621, 2005.
 21. Trach, P.; Afahaene, N.; Nowak, M.; Thews, O. *Impact of environmental parameters on the activity of the p-glycoprotein*. Acta Physiol. 192 (Suppl. 663): 107, 2008.
 22. Bigott, H.M.; Prior, J.L.; Piwnica-Worms, D.R.; Welch MJ. *Imaging multidrug resistance P-glycoprotein transport function using microPET with technetium-99m-sestamibi*. Mol. Imaging 4: 30-39, 2005.
 23. Marian, T.; Szabo, G.; Goda, K.; Nagy, H.; Szincsak, N.; Juhasz, I. et al. *In vivo and in vitro multitracer analyses of P-glycoprotein expression-related multidrug resistance*. Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 30: 1147-1154, 2003.
 24. Sauvant, C.; Nowak, M.; Wirth, C.; Schneider, B.; Riemann, A.; Gekle, M. et al. *Acidosis induces multi-drug resistance in rat prostate cancer cells (AT1) in vitro and in vivo by increasing the activity of the p-glycoprotein via activation of p38*. Int. J. Cancer 123: 2532-2542, 2008.

3.2 Activation of P-glycoprotein (Pgp)-mediated drug efflux by extracellular acidosis: *in vivo* imaging with ⁶⁸Ga-labelled PET tracer

Activation of P-glycoprotein (Pgp)-mediated drug efflux by extracellular acidosis: *in vivo* imaging with ⁶⁸Ga-labelled PET tracer

O. Thews¹, W. Dillenburger¹, M. Fellner², H.-G. Buchholz³,
N. Bausbacher³, M. Schreckenberger³, F. Rösch²

¹Institute of Physiology and Pathophysiology, University Medicine Mainz, 55099 Mainz, Germany

²Institute of Nuclear Chemistry, University of Mainz, 55099 Mainz, Germany

³Department of Nuclear Medicine, University Medicine Mainz, 55101 Mainz, Germany

Abstract

Purpose: *In vitro* it has been shown that the functional activity of P-glycoprotein (Pgp), an important drug transporter responsible for multidrug resistance, can be strongly increased by extracellular acidosis. Here mitogen-activated protein kinases (MAPK) (p38, ERK1/2) seem to play an important role for signal transduction. However, it is unclear whether these effects are also relevant *in vivo*.

Methods: With the newly developed PET tracer Schiff base based ⁶⁸Ga-MFL6.MZ the functional Pgp activity was visualized under acidic conditions and during inhibition of MAPKs non-invasively by means of microPET in rat tumours. Tumours were acidified either by inspiratory hypoxia (8% O₂) or by injection of lactic acid. Inhibitors of the MAPK were injected intratumourally.

Results: With increasing tumour volume the tumour pH changed from 7.0 to 6.7 and simultaneously the Pgp activity increased almost linearly. When the tumour was acidified by direct lactic acid injection the PET tracer uptake was reduced by 20% indicating a higher transport rate out of the cells. Changing the inspiratory O₂ fraction to 8% dynamically led to a reduction of extracellular pH and in parallel to a decrease of tracer concentration. While inhibition of the p38 pathway reduced the Pgp transport rate, inhibition of ERK1/2 had practically no impact.

Conclusion: An acidic extracellular environment significantly stimulates the Pgp activity. The p38 MAPK pathway plays an important role for Pgp regulation *in vivo*, whereas ERK1/2 is of minor

importance. From these results new strategies for overcoming multidrug resistance (e.g. reducing tumour acidosis, inhibition of p38) may be developed.

Keywords: P-glycoprotein . Acidosis . p38 . ERK1/2 . Transport activity . PET. ⁶⁸Ga . ⁶⁸Ga-MFL6.MZ

Abbreviations: Pgp, P-glycoprotein

Introduction

Solid-growing tumours show several pronounced differences as compared to normal tissues with respect to morphological and histopathological features and also in terms of physiological characteristics at the cellular and tissue level. Due to an abnormally formed vascular network with blind endings, increased vascular permeability, loss of vascular hierarchy and impaired vasomotion [1, 2] insufficient tumour perfusion results [3]. As a consequence of the inadequate oxygen delivery, hypoxia or even anoxia is a commonly found feature of human and experimental tumours [3, 4]. In order to ensure a sufficient energy supply for the tumour under hypoxic conditions, the cells force anaerobic metabolism resulting in an increased lactic acid formation [5] with pH even below 6.0 [3, 6] subsequently causing extracellular acidosis in the tumour tissue. On the other hand, numerous studies have demonstrated that the abnormal physiological microenvironment (e.g. hypoxia) in tumours may limit the efficacy of ionizing radiation [7, 8] but also may reduce the cytotoxicity of chemotherapeutic drugs [9, 10]. For the latter finding several mechanisms caused by the adverse metabolic environment (hypoxia, acidosis) have been discussed:

- (1) oxygen deficiency might directly influence the mechanism of action (pharmacodynamics) of antineoplastic drugs (e.g. alkylating agents) [11],
- (2) hypoxia can cause cell cycle arrest and in turn reduce the efficacy of agents acting only on proliferating cells [11, 12] and
- (3) hypoxia-induced extracellular acidosis may influence the intra-/extracellular distribution of drug [12, 13].

The third mechanism plays a role if the chemotherapeutic drug itself is a weak acid or base. Since these drugs can enter the cell through the lipid membrane primarily in their undissociated form, the

extracellular pH directly influences the drug uptake. In an acidic environment for instance the uptake of weak bases is reduced. All of the above-described mechanisms of chemoresistance are caused by the specific metabolic parameters of tumours.

Besides this, reduced chemosensitivity may result from drug transporters which actively pump amphiphilic xenobiotics out of the cell [14, 15]. Modulation of these drug transporters (e.g. by inhibitors) can modify the cytotoxic efficacy of chemotherapy [16]. The best studied member of the so-called ABC transporter family is P-glycoprotein (Pgp) responsible for a multidrug-resistant phenotype of many human tumours. Besides constitutional differences in the Pgp expression of tumour entities or cell lines, the expression as well as the functional activity of the transporter have been shown to be regulated. Besides cytokines and growth factors, parameters of the metabolic microenvironment such as hypoxia, glucose depletion or reactive oxygen species have been shown to regulate both Pgp expression and function [17–20]. Recent studies [21–23] demonstrated *in vitro* that lowering the extracellular pH to 6.5 functionally increases the Pgp activity and by this reduces the cytotoxicity of those chemotherapeutic drugs which are a substrate of Pgp. This finding was not caused by an increased Pgp expression or a translocation of the pre-existing transporter to the outer cell membrane [22]. *In vivo* it has been shown that lowering the tumour pH by forcing anaerobic glycolysis decreases the cytotoxicity of daunorubicin [22] which could be attributed to acidosis induced activation of Pgp. However, in these experiments the Pgp transport rate itself could not be measured *in vivo*. On the other hand, the results clearly revealed that mitogen-activated protein kinases (MAPK) (p38, ERK1/2) were responsible for the signalling pathway from the extracellular pH to an activation of Pgp [22]. Inhibition of p38 and ERK1/2 both reduced the Pgp activity *in vitro* and consequently increased the cytotoxicity of daunorubicin. Inhibition of only the p38 pathway led to higher apoptosis induction presumably by a reduced Pgp activity.

From these results, there is strong evidence that extracellular acidosis functionally increases the Pgp activity via a p38-mediated pathway *in vivo* [22]. However, with the techniques available a direct non-invasive measurement of the induced change of Pgp transport rate was not feasible in tumour-bearing animals. As recently a new tracer for PET imaging of the functional Pgp activity *in vivo* has been developed and evaluated [24], the hypothesis should be addressed whether it is possible to directly and quantitatively confirm that extracellular acidosis activates Pgp in solid tumours. In addition, it was another aim of this study to demonstrate *in vivo* with PET imaging that MAPKs play a key role for functional Pgp activation and by this for the development of multidrug resistance.

Materials and methods

Tumour and animal model

The subline AT1 of the rat Dunning R3327 prostate carcinoma was used in all experiments. This cell line functionally expresses Pgp [23]. Cells were grown in RPMI medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) at 37°C under a humidified 5% CO₂ atmosphere and subcultivated once per week. For tumour implantation male Copenhagen rats (Charles River Wiga, Sulzfeld, Germany; body weight 150–200 g) housed in the animal care facility of the University of Mainz were used. Animals were allowed access to food and acidified water ad libitum before the investigation. All experiments had previously been approved by the regional Animal Ethics Committee and were conducted in accordance with the German Law for Animal Protection and the UK Co-ordinating Committee on Cancer Research (UKCCCR) Guidelines [25]. Solid carcinomas of the R3327-AT1 cell line were heterotopically induced by injection of AT1 cells (0.4 ml approximately 10⁴ cells/μl) subcutaneously into the dorsum of the hind foot. Tumours grew as flat, spherical segments and replaced the subcutis and corium completely. Volumes were determined by measuring the three orthogonal diameters (d) of the tumours and using an ellipsoid approximation with the formula: $V=d1 \times d2 \times d3 \times \pi/6$. Tumours were used when they reached a volume of between 1.0 and 2.0 ml approximately 10–14 days after tumour cell inoculation.

PET tracer

For imaging of the functional Pgp activity the tracer ⁶⁸Ga-MFL6.MZ was used as described earlier [24]. The complex consists of a hexadentate Schiff base that is labelled with the positron emitter ⁶⁸Ga (T_{1/2}=67.7 min, β⁺ branching= 89%; Fig. 1). ⁶⁸Ga was eluted from a ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga generator [26] with 10 ml HCl and online-immobilized on an acidic cation exchanger. Metal impurities were removed by a mixture of acetone and hydrochloric acid (1 ml; 80% acetone/0.15 M HCl). Subsequently, the ⁶⁸Ga was eluted from the cation exchanger by a second mixture of acetone and hydrochloric acid (0.4 ml; 97.6% acetone/0.05 M HCl). Labelling was performed with 20 μl of the ligand MFL6. MZ solution (1 mg/ml in EtOH, 30 nmol) in 400 μl 0.12 M HEPES sodium salt buffer at pH=4.3 by addition of the purified ⁶⁸Ga fraction at 75°C for 10 min. Radiochemical labelling yield and complex formation were determined by thin-layer chromatography (TLC) on silica and RP-18 plates with 90% methanol/10% isotonic saline on a Canberra Packard Instant Imager. For injection the tracer pH was adjusted to 7.4 with NaOH and diluted with isotonic saline.

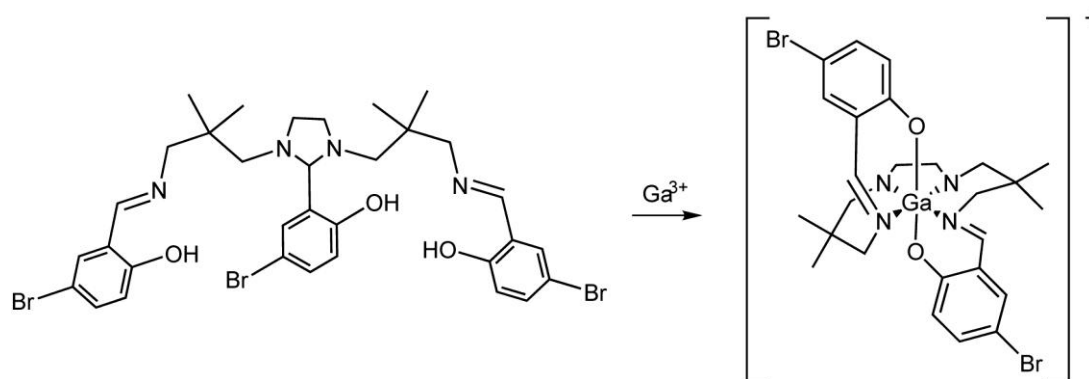


Fig. 1 MFL6.MZ used in the present study for complex formation with Ga^{3+} yielding Ga-MFL6.MZ

The tracer itself is a substrate of Pgp and therefore is actively pumped out of the cell. For this reason the intratumoural concentration inversely reflects the activity of the drug transporter [24]. Besides the active efflux the intracellular concentration depends also on the tracer uptake. Since the compound is a weak acid the tracer influx is not hindered by the extracellular acidosis. In addition, since the tracer shows a relatively high lipophilicity [24], the uptake does not seem to be the limiting factor for the intracellular tracer concentration.

Animal PET studies

For microPET imaging, rats were anaesthetized with pentobarbital (40 mg/kg, intraperitoneal administration, Narcoren, Merial, Hallbergmoos, Germany). A catheter was inserted into the left jugular vein for radiotracer application and a tube was placed into the trachea.

The microPET imaging was performed on a microPET Focus 120 small animal PET (Siemens/Concorde, Knoxville, TN, USA). During PET measurements the animals were placed in the supine position and breathed room air spontaneously through the tracheal tube. After a 15-min transmission scan with an external ^{57}Co source, dynamic PET studies were acquired in 2-D mode. The radiotracer was administered as a bolus injection of 0.4–0.7 ml via the left jugular vein catheter. The mean injected activity of ^{68}Ga -MFL6.MZ was 44.0 ± 1.5 MBq. Time-activity curves were obtained with varying time frames (1–5 min) for a total measuring interval of 60 min. The PET list-mode data were histogrammed into 14 frames and reconstructed using the ordered subset expectation maximization (OSEM) algorithm. Volumes of interest (VOIs) were defined for tumour and reference tissue (testis). The testis was used as a reference since it was in the field of view when imaging the tumours on the feet and because the tissue concentration was relatively constant between all animals on a low level

indicating that the tracer is not taken up into this tissue. Ratios of tumour to reference tissue were calculated from an integral image between 10 and 60 min after tracer injection.

Intratumoural drug application

In order to acidify the extracellular tumour space, small amounts of lactic acid were injected directly intratumourally. Therefore, 50 μ l of a 0.222 mM solution of lactic acid (in H₂O) was injected into the tumour tissue at a depth of 2–3 mm about 5–10 min prior to the tracer application. The same amount of a 0.222 mM sodium lactate solution was applied in the contralateral tumour and this tumour served as intra-individual control. For analysis, the tracer activity in acid treated tumours were normalized to that of the control tumours (=100%).

In order to study the signalling pathway responsible for pH-dependent activation of the Pgp transport activity, inhibitors of different MAPK pathways (p38, ERK1/2) were investigated, namely SB203580 and U0126 (Sigma- Aldrich, Steinheim, Germany) for inhibition of p38 and ERK1/2, respectively. Since these inhibitors cannot be used systemically in animals, a direct intratumoural injection was chosen. Therefore, inhibitors were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) at a concentration of 1 mmol/l and tumours were treated with a single injection of these inhibitors 5–10 min prior to the PET measurements. This time point was used since previous experiments showed an effect of MAPK inhibitors *in vivo* definitely 30 min after injection [22] and since the analysis of tracer accumulation started 10 min after the onset of PET imaging. A small volume (20 μ l) of the inhibitor stock solution was injected into the tumour resulting in a comparable tissue concentration as in previous cell culture experiments [22]. The tumour on the contralateral hind foot was treated with an injection of 20 μ l DMSO only and served as intraindividual control. For further analysis the tracer uptake in the control tumours was set to be 100%.

Intratumoural pH measurement and inspiratory hypoxia

The extracellular pH was measured with steel-shafted pH glass electrodes (type MI-418B, Microelectrodes Inc., Bedford NH, USA) with an outer diameter of 800 μ m. The electrode was inserted into the tumour and remained in place throughout the whole PET period. Before and after the PET imaging, the electrode was calibrated and pH measurements were corrected for signal shift. In order to dynamically change the extracellular pH of the tumours, the inspiratory gas mixture was changed from pure oxygen (100% O₂) starting 10 min prior to the PET tracer injection to a hypoxic

respiratory gas containing a mixture of 92% N₂ + 8% O₂ at 15 min after tracer injection (i.e. during the microPET measurement). It was continued until the end of the microPET measurement at 60 min. By reducing the inspiratory pO₂, glycolysis was forced in the tumour tissue leading to the formation of lactic acid. The change of extracellular pH was followed with the abovementioned pH glass electrode which was placed in the centre of the tumour for the whole period of the microPET measurement.

Statistical analysis

Results are expressed as means ± SEM. Differences between groups were assessed by the two-tailed Wilcoxon test for paired samples. The significance level was set at $\alpha=5\%$ for all comparisons. Correlation analysis was performed by calculating the Pearson correlation coefficient.

Results

The oxygenation worsens in AT1 tumours with increasing tumour volume [22]. As a result glycolysis is forced in larger tumours resulting in an increased formation of lactic acid and by this in a lowering of the extracellular pH with increasing tumour volume (at least in tumours below a volume of 1.9 ml; $r=-0.941$; Fig. 2a). In parallel, it was found that the tracer concentration in the tumour also tended to decrease with larger volume (Fig. 2b; $r=-0.550$, $p=0.080$). This reflects an increased Pgp activity in larger tumours as a result of a lower pH. Since pH measurements were not performed in the same tumours as Pgp PET imaging (to avoid the invasiveness of the pH measurement), the results shown in Fig. 2 are only a slight indication of the pH-dependent activation of Pgp.

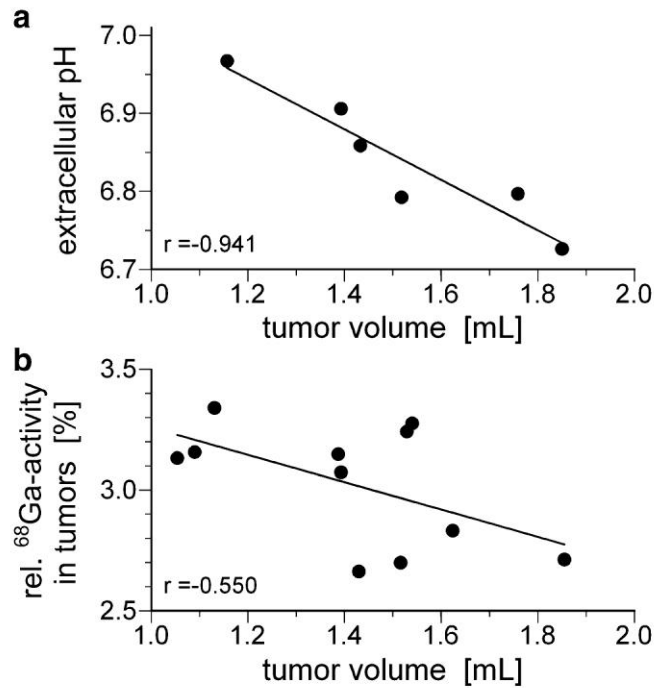


Fig. 2 Correlation of the extracellular pH (a) and the tracer accumulation (b) (normalized to the testis as reference tissue) with the tumour volume (r Pearson correlation coefficient)

Artificial acidification of the tumour

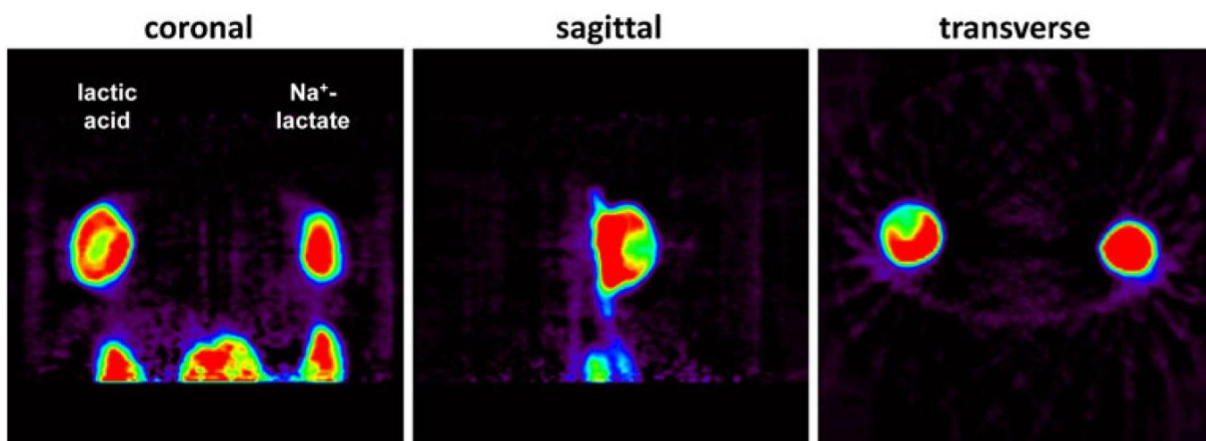


Fig. 3 Example of the tracer accumulation in subcutaneous tumours on the dorsum of the hind feet in different sectional plane microPET images. In the left tumour 50 μl of 0.222 mM lactic acid was injected whereas in the right tumour the same volume of an equimolar Na^+ -lactate solution was applied

In order to acidify the tumour, a small amount (50 μ l) of lactic acid (0.222 mM) was injected directly into the tumour to a depth of 2–3 mm. Since even this small volume might lead to pressure artefacts in the tissue, the contralateral tumour of each animal served as control. The direct comparison allows quantifying the effect of acidification solely on the tracer accumulation. Figure 3 shows an example of the tracer distribution in both tumours where the left tumour was treated with lactic acid. A region of reduced tracer accumulation can clearly be identified in the acid-treated tumour whereas in the contralateral control tumour (lactate) the ^{68}Ga -MFL6.MZ is homogeneously distributed. Since ^{68}Ga -MFL6.MZ is a substrate of Pgp, its decreased uptake in the tissue is the result of an increased Pgp activity. Figure 4 shows the statistical analysis of different animals in this experimental series. In most experiments the tracer concentration was markedly reduced in acidified tumours as compared to lactate-treated control tumours.

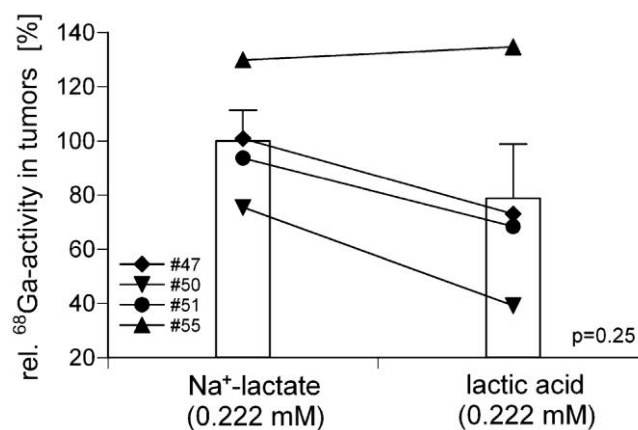


Fig. 4 Intratumoural relative ^{68}Ga -MFL6.MZ concentration (as defined by the activity ratio between tumour and testis) in tumours treated with lactic acid (50 μ l, 0.222 mM) or with an equivalent volume of an equimolar Na⁺-lactate solution. Each line represents one individual animal with two tumours on each hind foot. The activity values are normalized to the mean of the control tumour. Columns represent means \pm SEM of all experiments

Figure 5 illustrates an example of an experiment where the pH was dynamically reduced during the imaging period by inspiratory hypoxia. The animal breathed 100% oxygen starting 10 min prior to the tracer injection. The online pH measurement showed a relatively stable pH of 6.95 ± 0.01 ; 15 min after tracer injection the inspiratory O₂ fraction was reduced to only 8%, i.e. a value known to markedly affect the oxygenation of the tumour tissue [27]. Five minutes after the onset of inspiratory hypoxia, the intratumoural pH decreased to values around 6.8 (Fig. 5, triangles). With a slight delay the intratumoural tracer concentration decreased by 25–30% in both tumours.

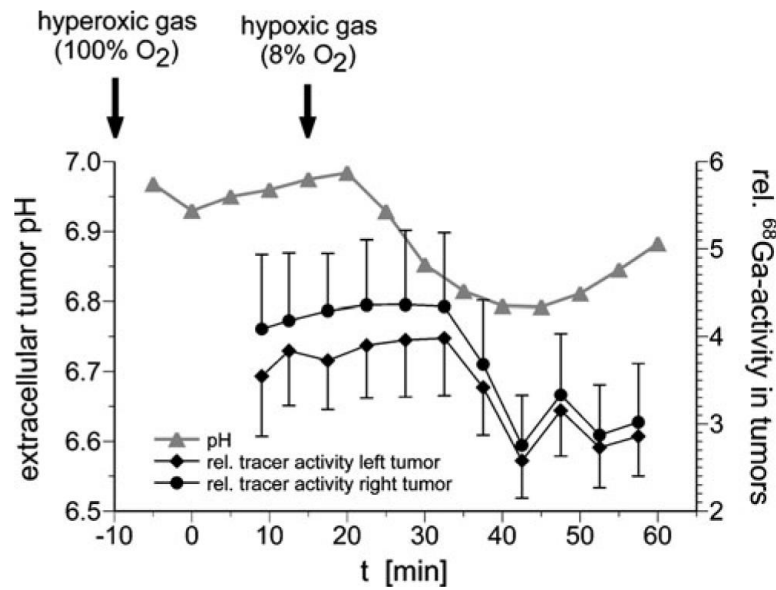


Fig. 5 Extracellular pH and ^{68}Ga -MFL6.MZ concentration ratio (tumour to testis) during change of the inspiratory O_2 fraction. The animal breathed 100% O_2 starting 10 min prior to tracer injection ($t = 0$ min); 15 min after tracer injection the respiratory gas mixture was changed to 8% O_2 and 92% N_2 . The rapid circulatory redistribution of the tracer during the first 7 min has been omitted. The standard deviation of the tracer ratio describes the variability of the signal within the analysed VOI

Inhibition of the MAPK pathways

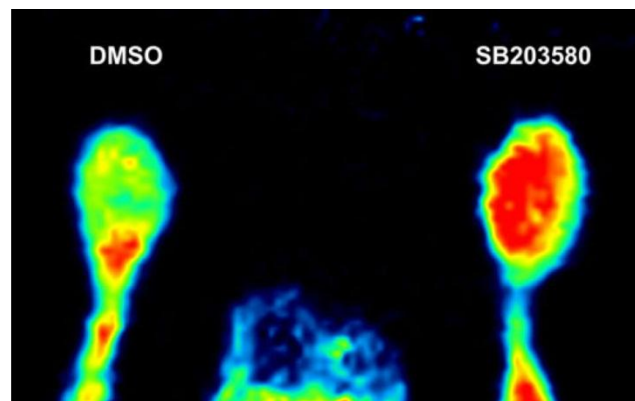


Fig. 6 Example of ^{68}Ga -MFL6.MZ accumulation in AT1 tumours. In the right tumour 20 μl of the p38 MAPK SB203580 inhibitor solution (1 mM in DMSO) was injected. The contralateral tumour received the same volume of DMSO alone

A small volume (20 μ l) of the inhibitor solution was injected into one tumour whereas the contralateral tumour served as control. Figure 6 illustrates an example where in the right tumour the p38 inhibitor SB203580 was injected whereas the left tumour only received DMSO. The right tumour shows a much higher tracer accumulation indicating a reduced Pgp activity. This effect was seen in all animals (Fig. 7) even though the comparison did not reach the level of statistical significance ($p=0.06$) as a result of the limited number of animals. On average, the SB203580-treated tumours showed a more than 70% higher tracer concentration than the contralateral control tumour. However, compared to completely untreated tumours, DMSO injection per se reduced the tracer accumulation markedly by approximately 50%. Compared to tumours without any intratumoural injection, the tumour to testis tracer ratio in completely untreated tumours was $303\pm 7\%$, whereas in DMSO-treated tumours it was $157\pm 32\%$. These findings reveal that the direct intratumoural injection of the lipophilic solvent (DMSO) affects the tracer transport to the tumour cells. However, the direct comparison of SB203580 treatment with the DMSO-injected tumour in the same animal clearly proves that inhibition of the p38 signalling pathway reduces Pgp activity which is reflected by a higher ^{68}Ga -MFL6.MZ concentration.

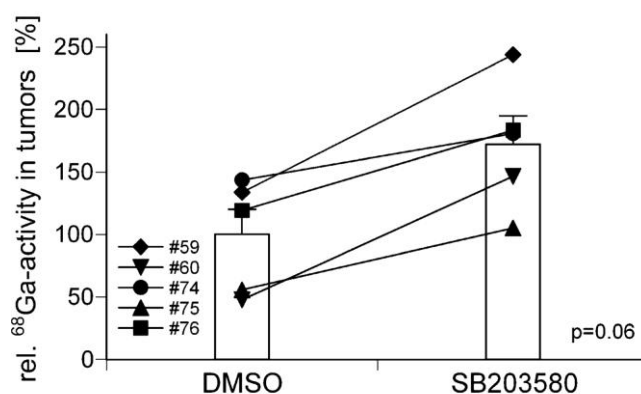


Fig. 7 Relative ^{68}Ga -MFL6.MZ concentration in tumours treated with the p38 MAPK inhibitor SB203580 (20 μ l, 1 mM) or an equivalent volume of DMSO. Each line represents one individual animal with tumours on each hind foot. Values are normalized to the mean of the control tumour. Columns represent means \pm SEM of all experiments

Figure 8 shows the impact of inhibiting the ERK1/2 pathway by U0126. In U0126-treated tumours the PET tracer concentration was slightly higher than in DMSO injected control tumours ($p=0.25$). On average, the tracer concentration was only 29% higher in the case of MAP inhibition. However, these results indicate that the ERK1/2 pathway plays a role in Pgp activation, although to a much lower extent.

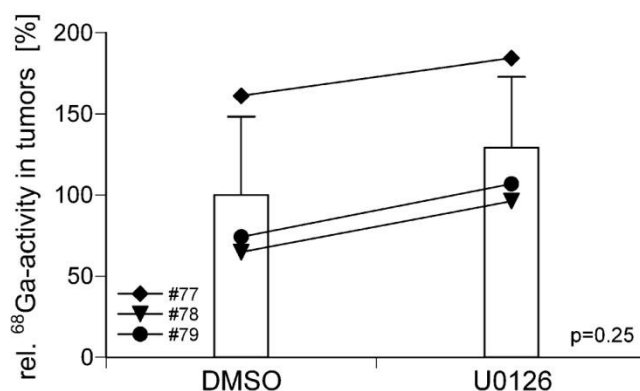


Fig. 8 Relative ^{68}Ga -MFL6.MZ concentration in tumours treated with the ERK1/2 MAPK inhibitor U0126 (20 μl , 1 mM) or an equivalent volume of DMSO. Each line represents one individual animal with tumours on each hind foot. Values are normalized to the mean of the control tumour. Columns represent means \pm SEM of all experiments

Discussion

Pgp is the most important (and best studied) drug transporter of tumours which actively pumps chemotherapeutics out of the cells and therefore leads to a multidrug-resistant phenotype [28]. Recently, it could be demonstrated that a reduced extracellular pH was able to more than double the Pgp transport rate (but not the expression) [22, 23]. Since the *in vivo* measurement of changes of the transport rate was not possible in animal experiments, only a reduced chemosensitivity of tumours artificially made acidic (pH~6.5) has been described [22]. From parallels to the *in vitro* experiments it has been postulated that the reduced chemosensitivity was the result of a functional activation of Pgp. However, the final proof of this hypothesis is lacking [22].

With the development of a new ^{68}Ga -labelled PET tracer for imaging the functional transport rate it becomes possible to qualitatively measure the Pgp activity [24]. This tracer, ^{68}Ga -MFL6.MZ, was shown to be a substrate of Pgp. Therefore, its intratumoural concentration inversely mimics the Pgp-mediated transport. In the present study microPET images were analyzed after acidifying the tumour tissue either by direct injection of lactic acid into the tumour or by forcing glycolytic metabolism. Since the interstitial fluid pressure is elevated in many human malignancies [29], the injection of even a small fluid volume such as 50 μl of lactic acid into the tissue may somehow (further) disturb tumour microcirculation. For this reason it cannot be excluded that the direct injection of the acid

solution may reduce tumour perfusion locally and by this limit the tracer transport resulting in a locally reduced tracer accumulation. For this reason, the contralateral tumour of each animal served as an intra-individual control. In this tumour the same volume of an equimolar Na^+ -lactate solution was injected probably leading to a comparable increase of the interstitial hydrostatic pressure. The comparison of the tracer concentration in both tumours reflects therefore solely the impact of the lower pH on Pgp activity (Fig. 4).

The second method for acidifying the extracellular space was to force anaerobic glycolysis leading to an increased endogenous formation of lactic acid. Since oxygenation in experimental tumours worsens with increasing tumour size [22, 30], the formation of lactic acid will also be higher in larger tumours, which explains the even lower pH in larger tumours (at least in experimental tumour models) (Fig. 2a) [22]. In parallel to the reduced pH, the tracer concentration decreased with increasing tumour volume (Fig. 2b). This correlation can be interpreted as an increased Pgp activity in larger tumours as a result of increased hypoxia leading to a more pronounced acidosis. However, since the correlation is not strong, these findings are only a weak indication of an acidosis-induced activation of Pgp. The tracer uptake in larger tumours might also decrease if marked necrosis were to be found in these tumours. However, histological examination of AT1 tumours of this size did not show any necrosis (data not shown). For this reason necrosis formation as an explanation of reduced tracer uptake in larger tumours can probably be ruled out.

A more direct proof can be seen in the experiment in which during the microPET imaging the inspiratory gas mixture was reduced from pure oxygen to only 8% O_2 (Fig. 5). Several studies clearly demonstrated that inspiratory hypoxia worsens tumour oxygenation [27, 31] and by this leads to a reduced extracellular pH [22, 32]. In the present study hypoxia led to an increase in the Pgp activity resulting in a lower tracer accumulation as demonstrated by microPET imaging (Fig. 5). The reason why the pH starts rising again 30 min after the onset of the hypoxic breathing remains unclear at the moment. Maybe changes in the blood pressure or a hypoxia-induced vasodilation lead to an increase in tumour perfusion and by this to a better oxygen supply.

Previous *in vitro* data revealed that MAPKs (p38, ERK1/ 2) play a relevant role for signal transduction in the acidosis-induced activation of Pgp [22]. *In vivo* (in solid tumours) the increase in chemosensitivity after MAPK inhibition has been described [22]. The induction of apoptosis was increased after inhibiting the p38 pathway. Inhibition of ERK1/2 had almost no impact on the chemosensitivity. However, measuring cytotoxicity gives only indirect evidence that p38 affects the Pgp transport activity [22]. Therefore, the present study provides the first conclusive verification that the p38 signalling pathway is a relevant step from the extracellular pH to the activation of Pgp.

Inhibition of p38 by SB203580 increased the intratumoural tracer concentration as a result of a higher Pgp activity (Fig. 7). As mentioned above a problem of the experimental design might be the direct intratumoural injection of drugs which might impair tumour perfusion. However, since in the contralateral tumour the same volume of DMSO alone was injected, the specific effect of SB203580 can be derived. In all tumours the activity in the SB203580-treated tumour was markedly higher (on average by a factor of 2) than in the control tumour even though the comparison did not reach the level of statistical significance ($p=0.06$; as a result of limited number of animals). Obviously, the inhibitor reduces the Pgp activity. Another problem might be the fact that DMSO has to be used as a solvent which may affect the tracer transport and uptake into the cell since the tracer is (at least partially) lipophilic [24]. Using the tumour to testis ratio as a measure of tracer accumulation, DMSO injection led to a markedly reduced intratumoural tracer level. In DMSO-treated tumours the ratio was $159\pm 24\%$, whereas in untreated controls the ratio was $303\pm 7\%$. These data indicate that DMSO injection per se reduces the tracer uptake which may be the result of pressure artifacts either by the injection or by a better solubility of the tracer in DMSO reducing its cellular uptake. However, independently of this finding the impact of SB203580 can be assessed from the comparison of the treated with the contralateral tumour. Inhibition of the p38 pathway seems therefore to be effective for reducing the Pgp transport rate.

The present findings on the impact of inhibition of ERK1/2 on the Pgp activity (Fig. 8) were comparable to those obtained on the daunorubicin toxicity [22]. In these previous experiments, ERK1/2 had practically no effect on chemosensitivity. In the present study $^{68}\text{Ga-MFL6.MZ}$ concentration was only increased by 29% after application of U0126. Therefore, the effect of p38 on Pgp activation seems to be much stronger than that of the ERK1/2 pathway.

In conclusion, the newly developed tracer $^{68}\text{Ga-MFL6.MZ}$ is a good choice to measure functional differences in the activity of Pgp. The present study clearly demonstrates that an acidic extracellular environment activates Pgp resulting in a strong drug efflux out of the cells. This mechanism might be one reason for the reduced chemosensitivity of hypoxic tumours. The results also prove that the p38 MAPK pathway plays an important role for Pgp regulation *in vivo*, whereas the impact of ERK1/2 is much less pronounced. With these experimental data in hand and the option of further systematic non-invasive imaging of Pgp-related effects in tumour treatment, new strategies for overcoming multidrug resistance may be developed either by reducing the extracellular acidosis or by inhibition of the p38 MAPK pathway. Using $^{68}\text{Ga-MFL6.MZ}$ and molecular imaging by means of PET/CT patients with chemoresistant tumours may be identified prior to therapy. On the other hand, PET imaging might be helpful in developing and evaluating new compounds (e.g. p38 inhibitors) for counteracting multidrug resistance.

Acknowledgments

The study was supported by Deutsche Krebshilfe (grant 109136).

Conflicts of interest

None.

References

1. Konerding MA, Malkusch W, Klapthor B, van Ackern C, Fait E, Hill SA, et al. *Evidence for characteristic vascular patterns in solid tumours: quantitative studies using corrosion casts*. Br J Cancer 1999;80:724–32.
2. Thews O, Kelleher DK, Vaupel P. *Disparate responses of tumour vessels to angiotensin II: tumour volume-dependent effects on perfusion and oxygenation*. Br J Cancer 2000;83:225–31.
3. Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. *Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review*. Cancer Res 1989;49:6449–65.
4. Höckel M, Vaupel P. *Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects*. J Natl Cancer Inst 2001;93:266–76.
5. Mueller-Klieser W, Vaupel P, Streffer C. *Energy status of malignant tumors in patients and experimental animals*. In: Molls M, Vaupel P, editors. Blood perfusion and microenvironment of human tumors. Berlin: Springer; 1998. p. 193–207.
6. Stubbs M. Tumor pH. In: Molls M, Vaupel P, editors. *Blood perfusion and microenvironment of human tumors*. Berlin: Springer; 1998. p. 113–20.
7. Bush RS, Jenkin RD, Allt WE, Beale FA, Bean H, Dembo AJ, et al. *Definitive evidence for hypoxic cells influencing cure in cancer therapy*. Br J Cancer Suppl 1978;3:302–6.
8. Gray LH, Conger AD, Ebert M, Hornsey S, Scott OCA. *The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy*. Br J Radiol 1953;26:638–48.

9. Sanna K, Rofstad EK. *Hypoxia-induced resistance to doxorubicin and methotrexate in human melanoma cell lines in vitro*. *Int J Cancer* 1994;58:258–62.
10. Teicher BA, Holden SA, Al-Achi A, Herman TS. *Classification of antineoplastic treatments by their differential toxicity toward putative oxygenated and hypoxic tumor subpopulations in vivo in the FSa1C murine fibrosarcoma*. *Cancer Res* 1990;50:3339–44.
11. Teicher BA. *Hypoxia and drug resistance*. *Cancer Metastasis Rev* 1994;13:139–68.
12. Chaplin DJ, Horsman MR, Trotter MJ, Siemann DW. *Therapeutic significance of microenvironmental factors*. In: Molls M, Vaupel P, editors. *Blood perfusion and microenvironment of human tumors*. Berlin: Springer; 1998. p. 131–43.
13. Mahoney BP, Raghunand N, Baggett B, Gillies RJ. *Tumor acidity, ion trapping and chemotherapeutics. I. Acid pH affects the distribution of chemotherapeutic agents in vitro*. *Biochem Pharmacol* 2003;66:1207–18.
14. Higgins CF. *ABC transporters: physiology, structure and mechanism—an overview*. *Res Microbiol* 2001;152:205–10.
15. Schinkel AH, Jonker JW. *Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview*. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55:3–29.
16. Fojo T, Bates S. *Strategies for reversing drug resistance*. *Oncogene* 2003;22:7512–23.
17. Ledoux S, Yang R, Friedlander G, Laouari D. *Glucose depletion enhances P-glycoprotein expression in hepatoma cells: role of endoplasmic reticulum stress response*. *Cancer Res* 2003;63: 7284–90.
18. Lee G, Piquette-Miller M. *Cytokines alter the expression and activity of the multidrug resistance transporters in human hepatoma cell lines; analysis using RT-PCR and cDNA microarrays*. *J Pharm Sci* 2003;92:2152–63.
19. Wartenberg M, Gronczynska S, Bekhite MM, Saric T, Niedermeier W, Hescheler J, et al. *Regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in multicellular prostate tumor spheroids by hyperthermia and reactive oxygen species*. *Int J Cancer* 2005;113:229–40.
20. Yang JM, Sullivan GF, Hait WN. *Regulation of the function of Pglycoprotein by epidermal growth factor through phospholipase C*. *Biochem Pharmacol* 1997;53:1597–604.

-
21. Lotz C, Kelleher DK, Gassner B, Gekle M, Vaupel P, Thews O. *Role of the tumor microenvironment in the activity and expression of the p-glycoprotein in human colon carcinoma cells*. *Oncol Rep* 2007;17:239–44.
 22. Sauvant C, Nowak M, Wirth C, Schneider B, Riemann A, Gekle M, et al. *Acidosis induces multi-drug resistance in rat prostate cancer cells (AT1) in vitro and in vivo by increasing the activity of the p-glycoprotein via activation of p38*. *Int J Cancer* 2008;123: 2532–42.
 23. Thews O, Gassner B, Kelleher DK, Schwerdt G, Gekle M. *Impact of extracellular acidity on the activity of P-glycoprotein and the cytotoxicity of chemotherapeutic drugs*. *Neoplasia* 2006;8:143– 52.
 24. Fellner M, Dillenburg W, Buchholz HG, Bausbacher N, Schreckenberger M, Rösch F et al. *Radiopharmaceutical ⁶⁸Ga tracer for assessing p-glycoprotein (Pgp) activity in vivo*. *Mol Imaging Biol* 2010; submitted.
 25. Workman P, Twentyman P, Balkwill F, Balmain A, Chaplin DJ, Double JA, et al. United Kingdom Co-ordinating Committee on Cancer Research (UKCCCR) *guidelines for the welfare of animals in experimental neoplasia* (2nd edit.). *Br J Cancer* 1998;77:1–10.
 26. Zhernosekov KP, Filosofov DV, Baum RP, Aschoff P, Bihl H, Razbash AA, et al. *Processing of generator-produced ⁶⁸Ga for medical application*. *J Nucl Med* 2007;48:1741–8.
 27. Thews O, Wolloscheck T, Dillenburg W, Kraus S, Kelleher DK, Konerding MA, et al. *Microenvironmental adaptation of experimental tumours to chronic vs acute hypoxia*. *Br J Cancer* 2004;91:1181–9.
 28. Comerford KM, Wallace TJ, Karhausen J, Louis NA, Montalto MC, Colgan SP. *Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene*. *Cancer Res* 2002;62: 3387–94.
 29. Fukumura D, Jain RK. *Tumor microenvironment abnormalities: causes, consequences, and strategies to normalize*. *J Cell Biochem* 2007;101:937–49.
 30. Thews O, Kelleher DK, Lecher B, Vaupel P. *Blood flow, oxygenation, metabolic and energetic status in different clonal subpopulations of a rat rhabdomyosarcoma*. *Int J Oncol* 1998;13:205–11.
-

31. Kelleher DK, Thews O, Vaupel P. *Hypoxyradiotherapy: lack of experimental evidence for a preferential radioprotective effect on normal versus tumor tissue as shown by direct oxygenation measurements in experimental sarcomas*. Radiother Oncol 1997;45:191–7.
32. Kalliomaäki T, Hill RP. *Effects of tumour acidification with glucose+MIBG on the spontaneous metastatic potential of two murine cell lines*. Br J Cancer 2004;90:1842–9.

3.3 Einfluss der Chiralität auf das Transportvermögen von [⁶⁸Ga]MFL6.MZ durch p-Glykoprotein

Einfluss der Chiralität auf das Transportvermögen von [⁶⁸Ga]MFL6.MZ durch p-Glykoprotein

M. Fellner¹, B. Bisalski², F. Rösch¹, O. Thews³

¹ Institut für Kernchemie, Johannes Gutenberg Universität, Mainz, Deutschland

² Institut für Physiologie and Pathophysiologie, Universitätsmedizin Mainz, Mainz, Deutschland

³ Institute für Physiologie, Martin-Luther-Universität, Halle (Saale), Germany

Kurzzusammenfassung

Zielsetzung: Die Chemoresistenz vieler Tumore verursacht durch den Transport von Zytostatika durch p-Glykoprotein (pGP) ist eine schwere Komplikation in der Tumorthherapie. Obwohl pGP eine weite Bandbreite von Substanzklassen transportiert, scheint auch die Isomerie von Verbindungen eine Rolle zu spielen. Auch ⁶⁸Ga-markierte Schiff'sche Basen weisen eine Isomerie auf, deren Beeinflussung untersucht werden soll.

Methoden: Zur Evaluierung des Einflusses der Isomerie von Schiff'schen Basen wurde das bereits untersuchte Racemat [⁶⁸Ga]MFL6.MZ ausgewählt. Mittels chiraler HPLC galt es das Racemat zu trennen und in *in vitro*-Versuchen die beiden Isomere evaluiert werden. Anschließende Biodistribution an tumortragenden Ratten sollte Verteilung der Spiegelbildisomere in den Organen untersuchen.

Ergebnisse: Das Racemat [⁶⁸Ga]MFL6.MZ konnte erfolgreich mittels chiraler HPLC in die beiden Isomere separiert werden. *In vitro*-Ergebnisse zeigten eine niedrigere Aufnahme des (+)-Isomers gegenüber dem (-)-Isomer (11,6 gegenüber 14,4 %). Interessanterweise ist auch der freie Ligand ein Substrat von pGP, wie ein Wettbewerbsversuch mit dem (+)-Isomer darstellte. *Ex vivo* Biodistributionsversuche bildeten hingegen ein gegenteiliges Bild ab. Das (+)-Isomer war in allen Organen außer der Leber häufiger vorhanden als sein Spiegelbildisomer.

Schlussfolgerung: Die Chiralität von pGP-Substraten kann einen Einfluss auf das Transportvermögen bzw. die Anreicherung von ⁶⁸Ga-markierten Schiff'schen Basen haben. So konnten Unterschiede

zwischen den beiden Spiegelbildisomeren gezeigt werden. Allerdings ist das *in vitro*- nicht ohne Anpassung auf ein *in vivo*-Modell übertragbar. Hier scheinen noch andere Einflüsse wie Plasmaproteinbindung oder der Transport durch weitere Transportproteine von Signifikanz zu sein.

Einleitung

Lipophile monokationische Gallium(III)-Komplexe, wie die in [1,2] untersuchten Schiff'schen Basen weisen eine Chiralität als Komplex auf. Abb. 1 zeigt die beiden Spiegelbildisomere von Ga-MFL6.MZ. Von GREEN et al. wurde berichtet [3], dass chirale Komplexe potentiell unterschiedlich durch pGP transportiert werden können. Um dies näher zu untersuchen, wurde daher der bereits evaluierte Tracer [^{68}Ga]MFL6.MZ ausgewählt, der bisher immer als Racemat eingesetzt wurde.

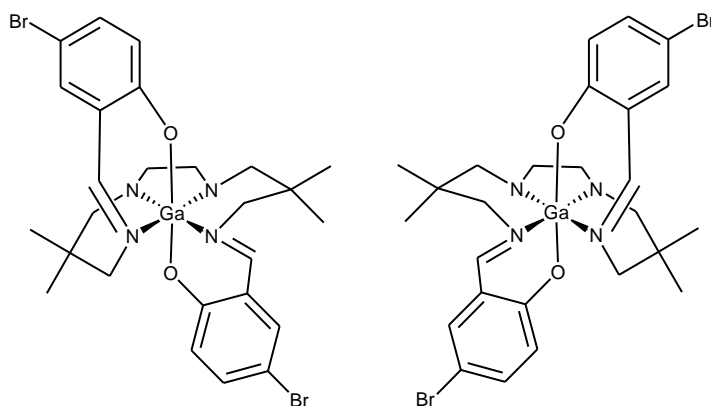


Abb. 1: Spiegelbildisomere von [^{68}Ga]MFL6.MZ

Experimentelles

^{68}Ga -Markierung

Der Vorläufer MFL6.MZ wurde in einer Konzentration von 1 mg/mL in Ethanol gelöst. Zur Markierung wurde das aufgereinigte ^{68}Ga -Eluat von 400 μL mit 400 μL 0,12 M Na-HEPES Puffer und 30 nmol des Vorläufers versetzt und für 10 min bei 90 °C in einem HLC Biotech Heizschüttler erhitzt. Nach 1 min Abkühlen wurde die Reaktionslösung über eine 30 mg Strata-X Kartusche gegeben und so der Tracer darauf auf der Festphase fixiert. Nach Waschen der Kartusche mit 2 mL Wasser eluierte der

Tracer mit 150 µL Acetonitril. Die Auftrennung der vorgereinigte Fraktion erfolgte mittels HPLC unter folgenden Bedingungen: 65 % Acetonitril, 35 % 0,1 M NH_4PF_6 Lösung bei 1 mL Fluss auf einer Phenomenex Lux Cellulose 2 Säule 250 x 4,6 mm. Sowohl UV- als auch Radioaktiv-Chromatogramme wurden aufgenommen und die beiden chiralen Verbindungen getrennt gesammelt. Nach Verdünnung mit Wasser (Fraktion:Wasser 1:2) wurden beide Verbindungen jeweils auf einer 30 mg Strata-X Kartusche fixiert, mit 2 mL Wasser gewaschen und anschließend mit 1 mL Ethanol eluiert. Die Bestimmung der chiralen Stabilität erfolgte für bis zu 2 h mittels HPLC.

In vitro-Untersuchungen

Die Versuche wurden an einer experimentellen Tumorzelllinie der Ratte durchgeführt, die auch bereits in den vorangegangenen Versuchen als Tumormodell diente. Die Sublinie AT-1 des R-3327 Dunning-Prostata-Karzinoms der Ratte ist sowohl *in vitro* als auch *in vivo* kultivierbar und exprimiert funktionell das pGP [4].

Für die *in vitro*-Untersuchungen wurden die Zellen mit den Tracern ($5,0 \pm 0,3$ MBq) für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend zentrifugiert. Nach Trennung des Zellpellets vom Überstand erfolgte die getrennte Messung im Curiemeter, um so die Anreicherung in den Zellen als Prozentsatz der Gesamtaktivität zu erhalten. Je besser eine Substanz die Zellmembran permeieren kann, desto höher ist die zelluläre Radioaktivität. Um eine Aussage über die Transporteigenschaften des Tracer durch das pGP machen zu können, wurde die intrazelluläre Konzentration in An- bzw. Abwesenheit des pGP-Inhibitors Verapamil bestimmt. Die intrazelluläre Konzentration ergibt sich aus dem dynamische Gleichgewicht der Diffusion des Moleküls in die Zelle und dem aktiven Auswärtstransport mittels pGP. Wird die Verbindung aktiv auswärts transportiert, so führt die pGP-Hemmung zu einer erhöhten intrazellulären Konzentration und Aktivität. Dieses Verhältnis der zellulären Konzentration in An- und Abwesenheit von Verapamil eignet sich als Maß der pGP-Transportaktivität [5]. Als Vergleich wurde gleichzeitig auch eine nicht chiral aufgereinigte Lösung des Tracers vermessen sowie zu einer der chiralen Verbindungen, die lediglich im pikomolaren Bereich eingesetzt wurden, nachträglich inaktivier Ligand (30 nmol) gegeben. Damit sollte der Einfluss des inaktiven Liganden auf die Transportleistung von pGP hin gezielt überprüft werden, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass auch der Ligand selbst ein Substrat für pGP darstellt.

Ex vivo-Biodistribution

Die AT-1-Karzinome wurden in männlichen Copenhagen-Ratten heterotop subkutan auf dem Fußrücken der Hinterpfoten implantiert. Vor den Versuchen erhielten die Tiere eine Standarddiät (Typ 1324, Altromin, Lage) sowie angesäuertes Trinkwasser *ad libitum*. Zur Implantation werden Zellen aus Kultur in einer Konzentration von etwa 10^4 Zellen/ μ L resuspendiert und ca. 0,4 mL dieser Suspension mit einer sterilen Injektionsnadel subkutan injiziert. Hierbei musste bei der Implantation auf dem Fußrücken vermieden werden, dass die Zellsuspension bei der Injektion entlang der Sehnenscheiden bis in den Unterschenkelbereich gelangte, da sonst aufgrund des irregulären Tumorwachstums die exakte Bestimmung des Tumolvolumens unmöglich war. Innerhalb von 10 bis 14 Tagen entwickelten sich aus den injizierten Zellen solide Tumoren in Form eines Halb-Rotationsellipsoids. Die Tumorgöße wurde durch Messung der drei orthogonalen Tumordurchmesser bestimmt. Als Qualitätskontrolle erfolgte eine tägliche Kontrolle des Tumorwachstums ab Tag 3 nach Implantation, um Tumoren, die vom exponentiellen Wachstumsverlauf abwichen, von der Untersuchung auszuschließen. Die Versuchstiere wogen am Versuchstag zwischen 200 und 220 g mit Tumolvolumina zwischen 0,4 und 0,8 mL. Die Versuchstiere wurden mittels Injektion von Pentobarbital narkotisiert. Nach Verdünnung des Tracers mit isotoner Kochsalzlösung erfolgte die Injektion über die Schwanzvene. Die Narkose wurde für 60 min aufrechterhalten und die Tiere anschließend getötet. Nach Entnahme der Organe/Gewebeproben erfolgte die Aktivitätsmessung in einem Autogammadetektor (Perkin-Elmer Wizard² 2470).

Ergebnisse & Diskussion

Radiomarkierung und Aufreinigung

Die Markierung von MFL6.MZ mit ^{68}Ga ergab eine Ausbeute von > 90 %, bestimmt über die Fixierung des markierten Produkts auf einer Strata-X Kartusche aus der Reaktionslösung und nach neutral Waschen mit Wasser. Mit 150 μ L Acetonitril konnte das Produkt nahezu quantitativ (97 %) wieder eluiert werden.

Die Auftrennung der Isomere mittels chiraler HPLC lieferte bei 13,1 min das (+)-[^{68}Ga]MFL6.MZ respektive 18,1 min Retentionszeit das (-)-Isomer. Hierbei konnte für die beiden radioaktiven Produkte keine UV-messbare Verunreinigung festgestellt werden. Sämtliche UV-aktiven Stoffe wie der Markierungsvorläufer oder Reste des HEPES-Puffers eluierten mit Retentionszeiten zwischen

3 und 8 min von der Säule, womit sich für die beiden chiralen Produkte eine sehr hohe spezifische Aktivität ergab die jedoch nicht näher bestimmt werden konnte, da sich kein UV-Signal für die ^{68}Ga -Tracer messen ließ. Die Produkte eluierten in 2-3 mL HPLC-Laufmittel komplett von der Säule. Nach Verdünnung mit 4-6 mL Wasser konnten diese wieder quantitativ auf Strata-X Kartuschen retardiert werden. Durch Spülen mit Wasser wurden mögliche letzte Reste des NH_4PF_6 Salzes entfernt und die beiden chiralen Verbindungen konnten mit je 1 mL Ethanol zu 95 % wieder eluiert werden.

Die Untersuchung der Stabilität der chiralen Verbindungen zeigte keine Zerstörung des Komplexes oder eine Racemisierung der chiralen Tracer. Auch nach 2 h waren die einzelnen Verbindungen noch zu >98,5 % vorhanden.

In vitro-Untersuchung

Zum Vergleich der beiden chiralen Tracer sowie des Racemats wurden je $5,0 \pm 0,3$ MBq mit Zellen der AT1-Sublinie inkubiert. In einem vierten Versuchsansatz erfolgte schließlich die Inkubation der Zellen mit dem (+)- ^{68}Ga]MFL6.MZ-Isomer zusammen mit 5 nmol des inaktiven Vorläufers MFL6.MZ, um hierüber eine Aussage zu treffen, ob auch der Ligand selbst ein pGP-Substrat ist.

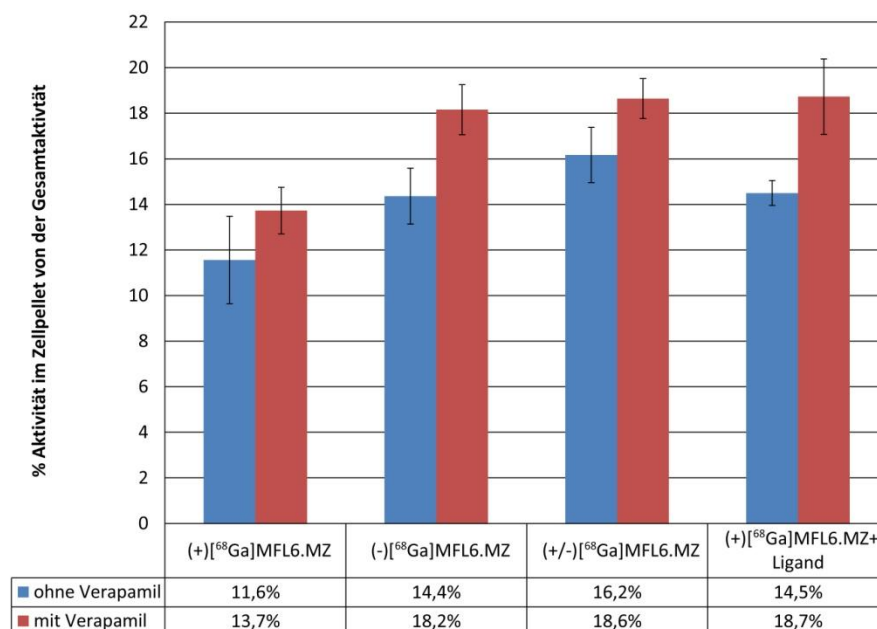


Abb. 2: Zellaufnahme der beiden Isomere von [^{68}Ga]MFL6.MZ in AT1-Zellen in Ab- und Anwesenheit von Verapamil. Als Vergleich sind ebenfalls das (+)-Isomer mit zusätzlichem inaktiven Ligand und das Racemat dargestellt (n=4).

Vergleicht man die Anreicherung der beiden chiralen Tracer zuerst ohne Verapamilzusatz (Abb. 2) ist ein deutlicher Unterschied in der Aufnahme bzw. im Umkehrschluss in der Transportrate durch pGP zu sehen. Die zelluläre Konzentration des (+)-[⁶⁸Ga]MFL6.MZ-Isomers ist merklich niedriger, was bedeutet, dass (+)-[⁶⁸Ga]MFL6.MZ offensichtlich stärker durch pGP transportiert wird als dessen Spiegelbild-Isomer.

Insgesamt liegt die Anreicherung des (+)-Isomers allerdings unter der des Racemats. Bezieht man nun den Versuch mit dem Zusatz an freiem, unmarkiertem Vorläufer zur chiralen Verbindung mit in Betracht, ist deutlich zu sehen, dass durch den wesentlich höheren Zusatz des Liganden im Vergleich zum eingesetzten Tracer (5 MBq ⁶⁸Ga = 0,05 pmol gegenüber ~5 nmol freiem Ligand) eine Erhöhung der zellulären Konzentration festzustellen ist. Dies kann durch ein Interferieren des freien Liganden mit pGP selbst erklärt werden. Dies bedeutet dass wahrscheinlich nicht nur der Gallium(III)-Komplex durch pGP transportiert wird, sondern auch der freie Ligand und somit eine Konkurrenz zum aktiven Tracer darstellt. Daher sollte für zukünftige Versuche besser auch das Racemat, falls die Verbindung nicht in chiral reiner Form eingesetzt wird, vom Vorläufer abgetrennt werden sollte, um so die Konkurrenz mit dem Liganden zu vermeiden.

Biodistribution der Stereoisomere

Nach den Ergebnissen der Zellstudien wurde die Organverteilung in tumortragenden Copenhagen-Ratten untersucht. Drei bzw. vier Tiere erhielten eine Injektion des (+)- bzw. (-)-Isomers des Tracers in einer Dosis von $6,2 \pm 0,8$ MBq bzw. $7,0 \pm 0,8$ MBq. 60 min nach Tracerinjektion wurden die Tiere getötet, die Organe oder Gewebeproben entnommen und vermessen. Die Daten wurden umgerechnet auf den Anteil (%) der injizierten Aktivität pro Gramm Gewebe und sind in Abb. 3 dargestellt.

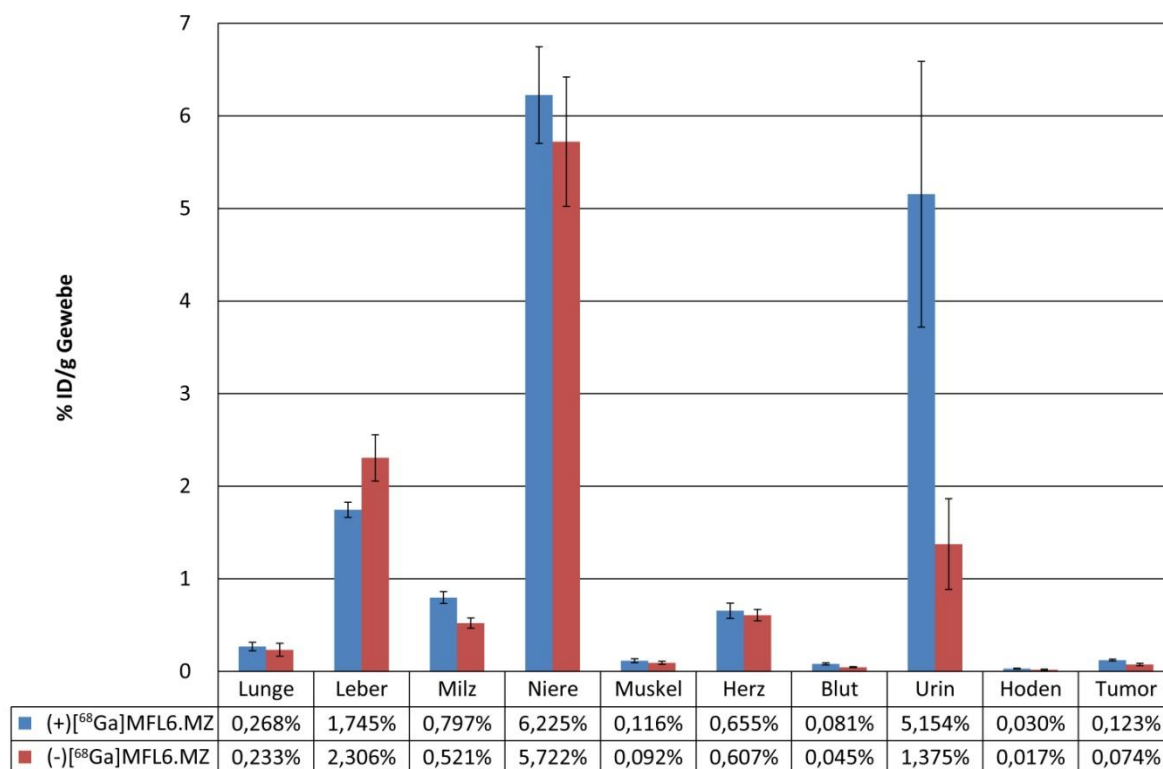


Abb. 3: Biodistribution der beiden chiralen Verbindungen von [⁶⁸Ga]MFL6.MZ in tumortragenden Ratten 60 min p.i., Werte angegeben als Prozent der injizierten Dosis/g Gewebe (n=3 für das (+)-Isomer, n=4 für das (-)-Isomer).

Überblickend zeigt sich, dass in den meisten untersuchten Organen die Anreicherung des (+)-Isomers höher ist als die des (-)-Isomers. Auffällig ist hier zuerst der Wert im Urin, der fast eine vierfach höhere Aktivität für das (+)-Isomer zeigt. Da die Nierenepithelien bekanntermaßen in der apikalen Zellmembran eine große Zahl an pGP-Transportern aufweisen, könnte der Urinbefund ausgehend von den *in vitro*-Daten so erklärt werden, dass das pGP das (+)-Isomer stärker aus dem Blut in den Urin sezerniert und so die Ausscheidung fördert. Allerdings ist hierzu anzumerken, dass Urinwerte allgemein stark fehlerbehaftet sein können. So können Unterschiede der Tracerkonzentration im Urin auch durch die Menge des produzierten Harns durch das Tier beeinflusst werden. Zudem ist es äußerst schwierig den gesamten entstehenden Harn durch Punktieren der Blase zu entnehmen, so kann in der Blase noch Harn verbleiben, sodass eine exakte Erfassung des gesamten über den Urin ausgeschiedenen Tracer nicht möglich ist.

Ebenfalls einen deutlichen Unterschied zeigt die Tracerkonzentration im Blut. Hier ist mit $0,08 \pm 0,01$ % ID/g das (+)-Isomer die Aktivität fast doppelt so hoch im Vergleich zum (-)-Isomer mit $0,05 \pm 0,01$ % ID/g. Diese Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass das (-)-Isomer eventuell stärker

aus dem Organismus eliminiert wird als das (+)-Isomers und daher der Gesamtbestand des (+)-Isomers im Körper höher ist.

Das einzige Organ, das eine gegensätzliche Verteilung zeigt, ist die Leber. Es ist nicht davon auszugehen, dass zwei chirale Komplexe wie die hier genutzten eine unterschiedliche Lipophilie aufweisen, sodass die Aufnahme in die Hepatozyten für die beiden Isomere vermutlich gleich ist. Jedoch kann der Konzentrationsunterschied mit einer unterschiedlichen pGP-Transportleistung für die Isomere erklärt werden, da die Leber bekanntermaßen ebenfalls eine deutliche pGP-Expression im Bereich der Gallengänge besitzt. Aus diesem Grund könnte die Elimination des (+)-Isomers über die Galle stärker sein. Es kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass andere Transporter der ABC-Familie (z.B. MRP1), die sich ebenfalls in der Leber finden, ebenfalls die Schiff'sche Base Komplexe transportieren können und so zu den beobachteten Unterschieden der Konzentration in der Leber beitragen [6]. Weiterhin kann auch die SLC22 Familie der organischen Kationen Transporter (OCT) in Betracht gezogen werden. OCT1 und OCT2 sind in der Leber exprimiert, OCT 2 dabei jedoch häufiger in der Niere [7]. So könnten die Schiff'schen Basen auch Substrate für diese variablen Transportproteine sein. Es zeigt sich bereits hier, dass *in vivo*-Verteilungsmodelle von Tracern deutlich komplexer sind als in Zellversuchen und mehr Parameter und Mechanismen berücksichtigt werden müssen.

Betrachtet man nun abschließend die Anreicherung in den Tumoren so wäre die Erwartung aus den *in vitro* Versuchen, dass die AT1-Tumoren eigentlich eine niedrigere Konzentration des (+)-Isomers aufweisen sollten (aufgrund der in den isolierten Zellen gefundenen höhere Transportaktivität für dieses Isomer). Die *in vivo*-Daten zeigen jedoch eine höhere Konzentration des (+)-Isomers im Vergleich zum (-)-Isomer ($0,12 \pm 0,01\%$ vs. $0,07 \pm 0,01\%$; $p=0,0024$) Dieses Ergebnis könnte jedoch auch die Folge der erhöhten Blutkonzentration des (+)-Isomers sein. Da die Tumoren gut durchblutet sind, ist es möglich, dass die erhöhte (+)-Tracer-Konzentration nicht die Aktivität des pGP widerspiegelt (die, entsprechend den Zellversuchen, für das (+)-Isomer höher sein sollte als für das spiegelbildliche Isomer), sondern lediglich die höhere Konzentration im Blut darstellt. Auch diese Befunde zeigen die Schwierigkeiten bei der Interpretation von *in vivo*-Biodistributionsdaten.

Zusammenfassung

Schiff'sche Base Komplexe vom Typ N_4O_2 mit ^{68}Ga wie das hier gezeigte [^{68}Ga]MFL6.MZ besitzen eine Chiralität durch die Komplexbildung. Dabei wird keine Konformation bevorzugt, sondern beide Isomere treten gleichermaßen auf. Da die Chiralität erst bei der Bildung der ^{68}Ga -Komplexe eintritt,

ist die nachfolgende Aufreinigung mittels chiraler HPLC nötig. Durch die Basislinien-getrennten Peaks des Chromatogramms gelingt dies einfach und die beiden Isomere können nach Isolierung und Überführung in Ethanol getrennt voneinander untersucht werden. *In vitro*-Untersuchungen ergaben, dass zum einen das (+)-Isomer stärker durch pGP transportiert wird als das (-)-Isomer. Wird zusätzlich auch inaktiver Markierungsvorläufer zugesetzt, zeigt sich eine Konkurrenz zwischen dem Komplex und dem inaktiven Liganden, was bedeutet, dass auch der unmarkierte Ligand ein Substrat von pGP ist. In *ex vivo*-Biodistribuitionsexperimenten konnte gezeigt werden, dass sich beide Verbindungen auch *in vivo* unterscheiden. In den untersuchten Organen (Lunge, Milz, Niere, Hoden, Blut) zeigte immer das (+)-Isomer eine höhere Anreicherung. Die Leber hingegen wies einen entgegen gesetzten Trend der Aktivitätsverteilung auf. Aus den Zellversuchen wäre eine niedrigere Anreicherung des (+)-Isomers gegenüber dem (-)-Isomer für den Tumor zu erwarten gewesen, was sich in den durchgeführten Versuchen jedoch gegenteilig heraus stellte. Dass sich hier das erwartete Ergebnis umkehrte, kann nur durch ein wesentlich komplexeres Kompartiment-Modell der Verteilung der Verbindungen erklärt werden. So ist anzunehmen, dass die Tracer neben pGP potentiell auch für weitere Proteine der MRP-Familie (Multidrug Resistance-Related Proteine) oder der SLC 22 Familie Substrate darstellen. Das relativ einfache Zellmodell kann so nicht auf *in vivo* Versuche direkt übertragen werden. Hier besteht noch weiterer Untersuchungsbedarf, in welcher Weise beispielsweise die Tracer an Plasmaproteine binden und an das Tumorgewebe abgegeben werden können sowie zur Frage welche anderen ABC-Transporter ebenfalls die Substanzen aktiv aus der Zelle oder einem Gewebe eliminieren können.

Literatur

- [1] Fellner M, Dillenburg W, Buchholz HG, Bausbacher N, Schreckenberger M, Renz F, Rösch F, Thews O. *Assessing p-glycoprotein (pGP) activity in vivo utilizing ⁶⁸Ga-Schiff base complexes*. Mol. Imag. Biol. online verfügbar (doi: 10.1007/s11307-010-0410-1)
- [2] Thews O, Dillenburg W, Fellner M, Buchholz HG, Bausbacher N, Schreckenberger M, Rösch F. *Activation of p-glycoprotein (pGP)-mediated drug efflux by extracellular acidosis: In vivo imaging with ⁶⁸Ga-labeled PET tracer*. Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imag, (2010), 37(10), 1935-42

-
- [3] Green MA, Mathias CJ, Hsiao YM. *Gallium radiopharmaceuticals for imaging MDR1-Pgp transport function with PET: Effects of chelate stereochemistry on tracer fate in vivo*. Abstracts of Papers, 235th ACS National Meeting, New Orleans, LA, United States, April 6-10, 2008
- [4] Thews O, Gassner B, Kelleher DK, Schwerdt G, Gekle M. *Impact of extracellular acidity on the activity of P-glycoprotein and the cytotoxicity of chemotherapeutic drugs*. *Neoplasia* (2006), 8, 143-152
- [5] Kunikane H, Zalupski MM, Ramachandran C, Kukuruga MA, Lucas D, Ryan JR, Krishan A. *Flow cytometric analysis of p-glycoprotein expression and drug efflux in human soft tissue and bone sarcomas*. *Cytometry* (1997), 30, 197-203
- [6] Schinkel AH, Jonker JW. *Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview*. *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2003), 55, 3-29
- [7] Koepsell H. *Polyspecific organic cation transporters: their functions and interactions with drugs*. *Trends Pharmacol. Sciences* (2004), 25(7), 375-81

3.4 Comparison of different phosphorus-containing ligands complexing ^{68}Ga for PET-imaging of bone metabolism

Comparison of different phosphorus-containing ligands complexing ^{68}Ga for PET-imaging of bone metabolism

M. Fellner¹, P. Riss¹, N. Loktionova¹, K. Zhernosekov¹, O. Thews²,
C.F.G.C. Geraldes³, Z. Kovacs⁴, I. Lukeš⁵, F. Rösch^{1*}

¹ Institute of Nuclear Chemistry, Johannes Gutenberg University of Mainz,
Fritz-Strassmann-Weg 2, 55128 Mainz, Germany

² Institute of Pathophysiology, Johannes Gutenberg University of Mainz,
Duesbergweg 6, 55128 Mainz, Germany

³ Department of Life Science, Faculty of Science and Technology, and Center of Neurosciences and
Cell Biology, University of Coimbra, 3001–401 Coimbra, Portugal.

⁴ Advanced Imaging Research Center, University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas,
5801 Forest Park Rd., Dallas, Tx 75235-9085, USA.

⁵ Department of Inorganic Chemistry, Charles University, Hlavova 2030,
12840 Prague, Czech Republic.

Keywords: Ga-68/ macrocyclic ligands/ phosphonates/ complex formation/ bone metastases

Summary

^{99m}Tc-phosphonate structures are well established tracers for bone tumour imaging. Our objective was to investigate different ⁶⁸Ga-labelled phosphonate ligands concerning labelling kinetics, binding to hydroxyapatite and bone imaging using μ -PET. Seven macrocyclic phosphorus-containing ligands and EDTMP were labelled in nanomolar scale with n.c.a. ⁶⁸Ga in Na-HEPES buffer at pH ~4. Except for DOTP, all ligands were labelled with >92 % yield. Binding of the ⁶⁸Ga-ligand complexes on hydroxyapatite was analysed to evaluate the effect of the number of the phosphorus acid groups on adsorption parameters. Adsorption of ⁶⁸Ga-EDTMP and ⁶⁸Ga-DOTP was >83%. For the ⁶⁸Ga-NOTA-phosphonates an increasing binding with increasing number of phosphonate groups was observed but was still lower than ⁶⁸Ga-DOTP and ⁶⁸Ga-EDTMP. μ -PET studies *in vivo* were performed with ⁶⁸Ga-EDTMP and ⁶⁸Ga-DOTP with Wistar rats. While ⁶⁸Ga-EDTMP-PET showed uptake on bone structures, an excess amount of the ligand (>1.5 mg EDTMP/kg body weight) had to be used, otherwise the ⁶⁸Ga³⁺ is released from the complex and forms gallium hydroxide or it is transchelated to ⁶⁸Ga-transferrin. As a result, the main focus of further phosphonate structures has to be on complex formation in high radiochemical yields with macrocyclic ligands with phosphonate groups that are not required for complexing ⁶⁸Ga.

Introduction

Besides lung and liver, the bones are most frequently affected by metastases. About 60 – 80 % of these metastases are caused by breast or prostate carcinoma. However, their symptoms (bone pain, pathological fracture, spinal cord compression, hypercalcaemia, bone marrow suppression) are recognized rather late [1,2]. Hence a diagnosis of bone metastases in an early state together with a subsequent therapy is of great importance for patients.

^{99m}Tc-phosphonates are well established tracers for the diagnosis of bone metastases using planar imaging or single photon emission tomography (SPECT) [3]. However, due to the higher spatial resolution of positron emission tomography (PET), adequate pharmaceuticals with positron emitters would be of great potential. The superior imaging quality in the case of PET/CT imaging is clearly demonstrated by using ¹⁸F-fluoride [4]. However, non-cyclotron dependent PET-tracers, i.e. radionuclide generator-based derivatives, would provide the required availability for instant tracer synthesis and PET/CT diagnosis. For this attempt the Germanium-68/Gallium-68 generator

with the positron emitter ^{68}Ga ($T_{1/2} = 67.7$ min) represents a promising system. Using our recently developed generator post-processing, it is an excellent source for synthesizing and evaluating new tracers [5].

In the context of imaging bone metastases, several papers have recently discussed the use of ^{68}Ga -EDTMP as a chemical analogue of, e.g. ^{153}Sm -EDTMP, utilized for the palliative treatment of bone diseases [6-9]. In this study, we investigated several macrocyclic phosphonate ligands in terms of ^{68}Ga -ligand complex formation and binding behaviour to hydroxyapatite. The aim of the study was also to systematically study the efficiency of $^{68}\text{Ga}^{3+}$ labelling of a series of phosphonate ligands of different structural characteristics (linear and triaza or tetraza macrocyclic ligands). *In vivo* bone uptake of some of those ^{68}Ga -phosphonates was also evaluated in a preliminary μ -PET imaging study on healthy Wistar rats.

Materials and Methods

Generator

Germanium-68 ($T_{1/2} = 270.8$ d) provides the positron emitter Gallium-68 ($T_{1/2} = 67.7$ min; 89% positron branching) as an easily available and relatively inexpensive source of a PET nuclide. A Cyclotron Obninsk Ltd. Co. generator was used, with Germanium-68 fixed on a solid phase of modified titanium dioxide. Gallium-68 is eluted from the generator with 10 mL HCl and is on line-immobilized on a strong acidic cation exchanger. Impurities such as zinc, iron and titanium as well as ^{68}Ge generator breakthrough are further removed by 1 mL of a mixture of hydrochloric acid and acetone (N1: 0.15 M HCl / 80% acetone). Subsequently, ^{68}Ga is eluted quantitatively in 400 μL of a second mixture of HCl and acetone (N2: 0.05 M HCl / 97.6% acetone) from the cation exchange resin [5]. This fraction serves as an ideal low-volume, low-acidic and chemically highly pure source of ^{68}Ga for subsequent labelling.

Phosphonates

The following macrocyclic tri- and tetraaza based phosphonate chelators have been used (see Fig. 1 for their chemical structures): H_8DOTP (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetra(methylene

phosphonic acid)), and $H_4DO3A-P^{ABn}$ (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-4,7,10-triacetic-1-{methyl[(4-aminophenyl) methyl]}phosphinic acid)) and triazacyclononane (TACN) derivatives such as H_4NO2AP (1,4,7-triazacyclononane-1-(methylene phosphonic acid)-4,7-diacetic acid), H_5NOA2P (1,4,7-triazacyclononane-1,4-bis(methylene phosphonic acid)-7-acetic acid) and H_6NOTP (1,4,7-triazacyclododecane-1,4,7-tri(methylene phosphonic acid)). For comparison, non-phosphonate ligands H_3NOTA (1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid) and H_4DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid) were also tested. The linear phosphonate ligand H_8EDTMP (ethylenediamine-tetra(methylene phosphonic acid)) was evaluated for comparison.

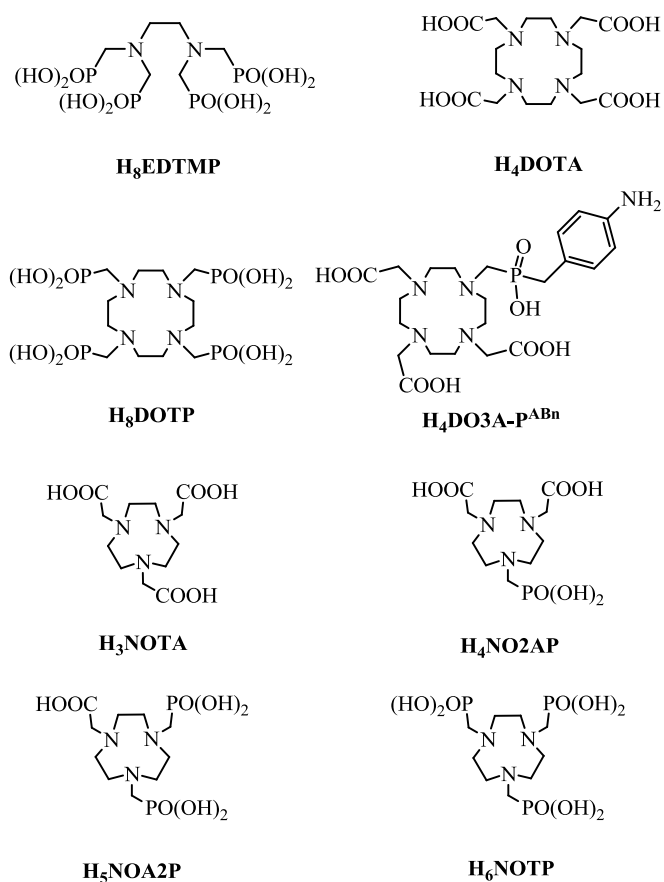


Fig. 1: Chemical structure of the acid forms of the phosphonate and carboxylate ligands used in this work.

Ligand syntheses

H_8EDTMP was obtained commercially from Sigma-Aldrich. The ligands DOTA [10], DOTP [11], NOTA [12], NOTP [13] and $DO3A-P^{ABn}$ [14] were synthesized according to the literature. The purity of these

ligands was checked by ^1H NMR spectroscopy, and their chemical shifts were in agreement with the values reported in the literature (for DOTA – [10], for DOTP – [11], for NOTA – [12], for NOTP – [13] and for DO3A–P^{ABn} – [14]).

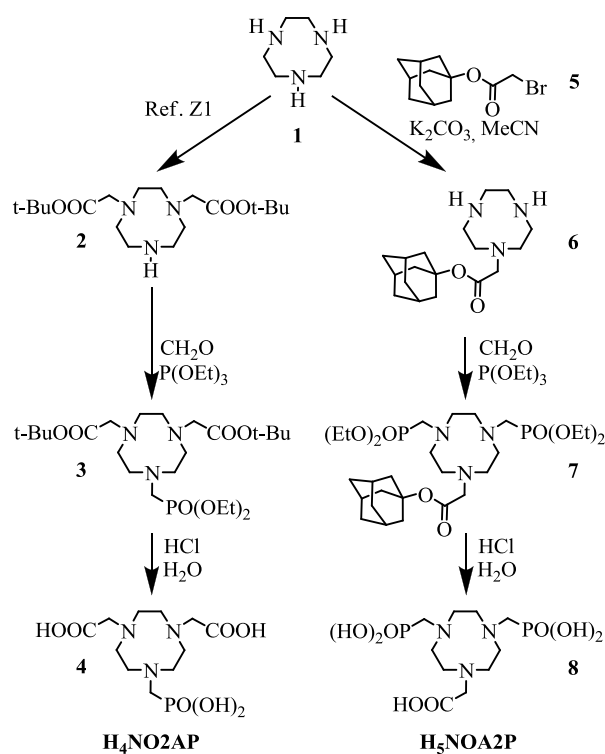


Fig. 2: Synthesis scheme for $\text{H}_4\text{NO}_2\text{AP}$ and $\text{H}_5\text{NOA}_2\text{P}$

Synthesis of $\text{H}_4\text{NO}_2\text{AP}$:

1,4,7-Triazacyclononane-1,4-bis(acetic acid tert-butyl ester)-7-(methylene-phosphonic acid diethyl ester) 3. A mixture of 1,4,7-triazacyclononane-1,4-bis(acetic acid tert-butyl ester) **2** (1.09 g), triethyl phosphite (0.63 g) and paraformaldehyde (0.96 g) was stirred at room temperature for 4 days. The clear pale yellow oil was kept at 50°C in high vacuum for 24 hours to remove any volatile sideproducts. The yield of the crude ester **3** was 1.64 g. This material contained a small amount of hydroxymethyl phosphonic acid diethyl ester and was used without further purification in the hydrolysis. ^1H NMR CDCl_3 , δ : 4.07 (m, 4H, POCH_2), 3.29 (s, 4H, acetate CH_2), 2.98 (d, $J_{\text{PH}} = 8.6$ Hz, 2H, PCH_2), 2.90 (br m, 4H, macrocyclic CH_2), 2.87 (br m, 4H, macrocyclic CH_2), 2.83 (br s, macrocyclic CH_2), 1.40 (s, 18H, t-Bu), 1.27 (m, 6H, POCH_2CH_3). ^{13}C NMR, CDCl_3 , δ : 171.08 (CO), 80.71 (t-Bu), 61.55 (d, $J_{\text{PC}} = 7.0$ Hz, POCH_2), 56.20 (d, $J_{\text{PC}} = 5.9$ Hz macrocyclic CH_2) 55.04 (br, macrocyclic CH_2) 55.01 (shoulder,

macrocyclic CH₂), 53.10 (d, J_{PC} = 156.1 Hz, PCH₂), 28.08 (t-Bu), 16.43 (d, J_{PC} = 5.7 Hz, POCH₂CH₃). ³¹P NMR, CDCl₃, δ: 28.0. ESI-MS (pos) *m/z* = 508.27 [M+H]⁺.

1,4,7-Triazacyclononane-1,4-bis(acetic acid)-7-(methylenephosphonic acid) 4. 1,4,7-Triazacyclononane-1,4-bis(acetic acid tert-butyl ester)-7-(methylenephosphonic acid diethyl ester) **3** [15] (1.5 g) was dissolved in hydrochloric acid (3 M, 50 mL) and the mixture was refluxed for two days. The excess hydrochloric acid was removed by rotary evaporation and the residue was redissolved in water. The yellow solution was treated with activated carbon, filtered and evaporated by rotary evaporation. The residue was redissolved in water (50 mL) and freeze-dried to give crude **4** as a yellow glassy solid (1.20 g), which was redissolved in water (10 mL) and converted to the sodium salt by neutralizing it with NaOH (to pH 11). The solution was concentrated by rotary evaporation and the sodium salt was precipitated by adding ethanol (50 mL) to the residue. It was filtered and dried in nitrogen stream to give a very hygroscopic white solid (1.0 g) This was converted to the free acid form of **4** by loading it onto a Cl-form anion exchange column (DOWEX 1X4-50) and eluting it with HCl (3 M, 500 mL). The fractions containing the product were freeze-dried to give **4** as a pale yellow amorphous solid (0.55 g). ¹H NMR, D₂O, δ: 3.73 (s, 4H, acetate CH₂), 3.36 (br 4H, macrocyclic CH₂), 3.25 (br, 4H, macrocyclic CH₂), 3.20 (s, 4H, macrocyclic CH₂), 3.15 (d, J_{PH} = 11.7 Hz, PCH₂). ¹³C NMR, D₂O, δ: 170.54 (CO), 56.39 (acetate CH₂), 53.10 (d, J_{PC} = 140.3 Hz, PCH₂), 51.51 (d, J_{PC} = 4.04 Hz, macrocyclic CH₂), 50.46 (macrocyclic CH₂), 50.22 (macrocyclic CH₂). ³¹P NMR, D₂O, δ: 12.50. ESI-MS (neg) *m/z* = 338.13 [M-H].

Synthesis of H₅NOA2P:

1,4,7-Triazacyclononane-1-mono(acetic acid adamantyl ester) 6. 1,4,7-Triazacyclononane **1** (2.60g) was dissolved in chloroform (30 mL) and the solution was cooled in an ice bath. Bromoacetic acid adamantyl ester **5** [16] (1.0 g) was added and the mixture was stirred for 30 min. The ice bath was removed and stirring was continued for 1 day at room temperature. The chloroform was removed by rotary evaporation, the residue partitioned between ether (50 mL) and water (20 mL), and the ether layer was washed with water (3x20 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated and the residue was dried to a constant mass under vacuum. The oily product slowly turned into a white waxy crystalline solid. Yield: 1.03 g, 78%. This product contained about 5% of the bisalkylated derivative as evidenced by NMR and MS. ¹H NMR, CDCl₃, δ: 3.23 (s, 2H, acetate CH₂), 2.83, 2.74, 2.68, 2.64, 2.63 (br m, 14H, macrocyclic CH₂ and NH), 2.08 (br s, 3H, adamantyl C3, C5,

C7), 2.04 (br s, 6H, adamantyl C2, C8, C9), 1.58 (br s, 6H, adamantyl C4, C6, C10). ^{13}C NMR, CDCl_3 , δ : 171.10 (CO), 81.04 (adamantyl C1), 57.72 (acetate CH_2), 52.43 (macrocyclic CH_2), 46.26 (macrocyclic CH_2), 45.80 (macrocyclic CH_2), 41.29 (adamantyl C2, C8, C9), 35.95 (adamantyl C4, C6, C10), 30.64 (adamantyl C3, C5, C7). ESI-MS (pos) $m/z = [\text{M}+\text{H}]^+$ 322.4 ; 514.53 $[\text{M}+\text{H}]^+$ for 1,4,7-triazacyclononane-1,4-bis(acetic acid adamantyl ester).

1,4,7-Triazacyclononane-1-mono(acetic acid adamantyl ester)-4,7 bis(methylenephosphonic acid diethyl ester) 7. 1,4,7-Triazacyclononane-1-mono(acetic acid adamantyl ester) **6** (0.95 g) was dissolved in triethyl phosphite (1.10 g) and paraformaldehyde (190 mg) was added. The mixture was stirred for 4 days at room temperature and then kept at 50°C in high vacuum for 24 hours to remove any volatile side products. The crude ester **7** (1.7 g) was dissolved in ether (50 mL) and the solution was washed with water (3x50 mL). The ether layer was dried over sodium sulfate, filtered and evaporated by rotary evaporation to give **7** as pale yellow oil (1.45 g). ^1H NMR, CDCl_3 , δ : 4.05 (m, 8H, POCH_2), 3.22 (s, 2H, acetate CH_2), 2.93 (d, $J_{\text{PH}} = 8.9\text{Hz}$, 4H, PCH_2), 2.90 (s), 2.86 (br m), 2.78 (br m) (12H, macrocyclic CH_2), 2.08 (br s, 3H, adamantyl C3, C5, C7), 2.03 (br s, 6H, adamantyl C2, C8, C9), 1.58 (br s, 6H, adamantyl C4, C6, C10), 1.25 (t, $J_{\text{HH}} = 7.0\text{Hz}$, 12H, POCH_2CH_3). ^{13}C NMR, CDCl_3 , δ : 170.90 (CO), 80.68 (adamantyl C1), 61.50 (d, $J_{\text{PC}} = 7.0\text{Hz}$, POCH_2), 59.83 (acetate CH_2), 56.55 (d, $J_{\text{PC}} = 4.8\text{Hz}$, macrocyclic CH_2), 56.48 (d, $J_{\text{PC}} = 4.1\text{Hz}$, macrocyclic CH_2), 55.25 (macrocyclic CH_2), 41.32 (adamantyl C2, C8, C9), 35.99 (adamantyl C4, C6, C10), 30.63 (adamantyl C3, C5, C7), 16.39 (d, $J_{\text{PC}} = 5.8\text{Hz}$, POCH_2CH_3). ^{31}P NMR, CDCl_3 , δ : 28.0. ESI-MS (pos) $m/z = 622.40$ $[\text{M}+\text{H}]^+$.

1,4,7-Triazacyclononane-1-mono(acetic acid)-4,7-bis (methylenephosphonic acid) 8. 1,4,7-Triazacyclononane-1-mono(acetic acid adamantyl ester)-4,7-bis(methylene phosphonic acid diethyl ester) **7** (1.0 g) was dissolved in HCl (3 M, 20 mL) and the solution refluxed for two days. 1-Adamantanol got separated in the form of white crystals. The mixture was allowed to cool to room temperature and then extraction was done with ether (3x20 mL). The aqueous layer was evaporated by rotary evaporation, redissolved in water (25 mL) and freeze-dried to give a colorless glassy solid (0.93 g). This was redissolved in water (5 mL) and the product separated as a white solid on standing. It was filtered, washed with water (3x 3 mL) and dried by air suction to give **8** as a white solid (0.58 g). ^1H NMR D_2O , NH_3 , δ : 3.34 (s, 2H, acetate CH_2), 3.23 (br s, 4H, macrocyclic CH_2), 3.10 (br, 4H, macrocyclic CH_2), 2.94 (d, 4H, $J_{\text{PH}} = 10.1\text{ Hz}$, PCH_2), 2.85 (br t, 4H, macrocyclic CH_2). ^{13}C NMR, D_2O , NH_3 , δ : 179.36 (CO), 58.37 (acetate CH_2), 52.84 (d, $J_{\text{PC}} = 132.8\text{ Hz}$, PCH_2), 51.37 (d, $J_{\text{PC}} = 3.6\text{ Hz}$,

macrocyclic CH₂), 49.59 (d, not resolved, macrocyclic CH₂), 48.38 (s, macrocyclic CH₂). ³¹P NMR, D₂O, NH₃, δ: 11.59. ESI-MS (neg) *m/z* = 374.13 [M-H]⁻.

Labelling with ⁶⁸Ga(III)

Labelling with ⁶⁸Ga was performed in 400 μL 0.12 M HEPES sodium salt buffer (Merck KGaA) by adding the 400 μl ⁶⁸Ga fraction of N2. Through variation of reaction time (1 to 10 min), temperature (r.t. to 75°C) and different amounts of the complex ligands (10 to 50 nmol), optimum reaction parameters for ⁶⁸Ga complex formation were deduced.

Analysis

Determination of radiochemical labelling yield and complex formation kinetics were carried out by paper chromatography on cellulose sheets (Schleicher & Schuell 589/5) using two solvent systems (A: water : ethanol : pyridine – 4:2:1; B: isotonic saline) and were measured on a Canberra Packard Instant Imager. Due to the migration of free gallium(III) on cellulose under both conditions, the pH had to be adjusted to 13 by addition of 60 μL 1 M NaOH prior to spotting the probe.

NOTP was used as proof of concept for developing a HPLC method as comparison to Radio-TLC.

For this purpose a strong anion exchange column (Partisil 10 SAX 250x4 mm) with following conditions was used: 75% 0.75 M phosphate buffer, pH = 3/ 25% 1.0 M sodium citrate, 1 mL flow; radiodetector Raytest Gabi Star.

Purification

Complexes with yields lower than 95% had to be purified prior to their use in binding studies. Therefore the reaction mixture was passed over a cation exchanger (50 mg Bio–Rad AG 50W–X8). The non–complexed gallium is immobilized on the exchanger while the ⁶⁸Ga ligand complexes pass the resin.

Binding studies

Binding studies on synthetic hydroxyapatite (Hap) were done to simulate the binding of the different ^{68}Ga ligand complexes to bone structures. For this purpose, 20 mg Hap were incubated in 1 mL isotonic saline for 24 h. The test itself was performed by the addition of 50 μL of the ^{68}Ga -ligand complexes to the Hap fraction. After vortexing for 10 seconds, the probes were incubated for 10 min at ambient temperature. The samples were centrifuged and the supernatant was removed. The Hap fraction was washed with 0.5 mL saline. This solution contained less than 2% of the overall ^{68}Ga radioactivity.

The ^{68}Ga radioactivity in combined liquids and the Hap fraction was measured in a curiemeter (Aktivitätsmessgerät M2316, Messelektronik Dresden GmbH). ^{68}Ga complex binding to Hap was determined as percent of ^{68}Ga absorbed to Hap. For comparison of all species possibly formed in the reaction mixture and the investigated ^{68}Ga -complexes, the behaviour of free $^{68}\text{Ga}^{3+}$ was analysed similarly. The aim was to validate whether there is any binding of free Ga^{3+} itself to hydroxyapatite.

μ -PET experiments

In vivo studies were only performed with ^{68}Ga -EDTMP.

The ^{68}Ga complex was prepared with 50 nmol ligand under the described conditions. After purification, a solution was obtained ready for injection. For animal μ -PET imaging, the effect of the overall amount of EDTMP present in the injected ^{68}Ga -EDTMP fraction was varied. It was 22 μg originating from the synthesis protocol in one case. In another experiment, 1.7 mg EDTMP was added to the purified ^{68}Ga -EDTMP fraction and the overall amount of EDTMP injected was 1.7 mg.

Healthy male Wistar rats weighting 500 – 700 g were used.

The complexes were injected through the tail vein (30 – 73 MBq). Anaesthesia was carried out using chloral hydrate. All experiments were approved by the German law on animal experiments.

A Siemens μ -PET Focus 120 Scanner was used. For each study a dynamic scan was performed from 0 to 60 min p.i., followed by a whole body scan at 60 – 75 min p.i.. μ -PET image quantification was not applied.

Results

Generator elution and complex formation

The elution of $^{68}\text{Ga}^{3+}$ from the generator and the on line-processing of the eluate are performed within less than five minutes. Figs. 3 and 4 compare typical labelling reactions for the ligands EDTMP, DOTP and $\text{DO3A-P}^{\text{ABn}}$ at 25°C (room temperature) and 75°C.

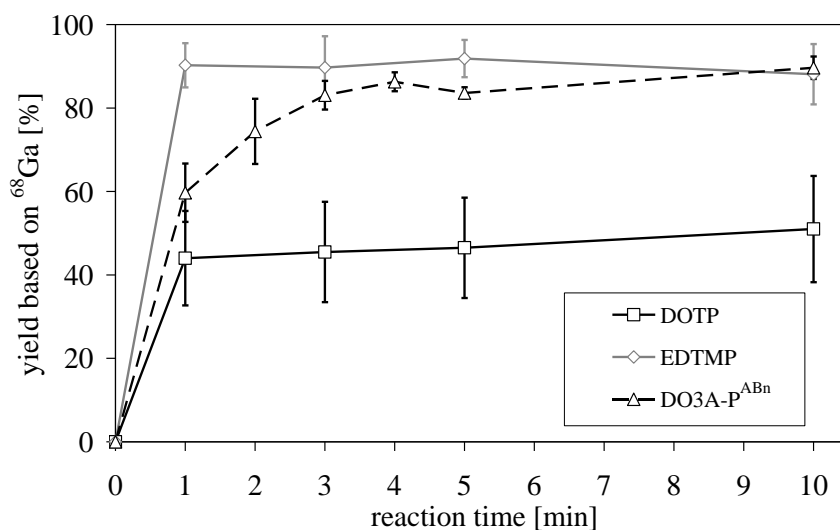


Fig. 3: $^{68}\text{Ga}^{3+}$ complex formation for DOTP, EDTMP and $\text{DO3A-P}^{\text{ABn}}$ at 25°C (50 nmol of each ligand, pH ~4).

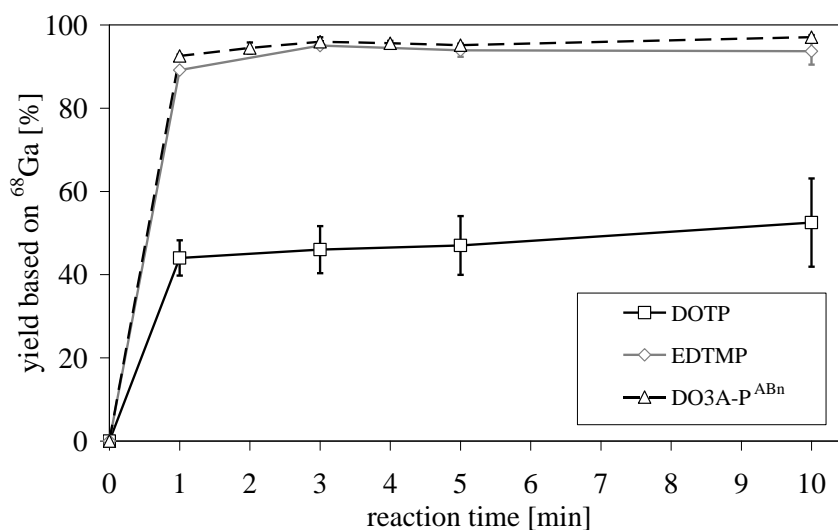


Fig. 4: $^{68}\text{Ga}^{3+}$ complex formation for DOTP, EDTMP and $\text{DO3A-P}^{\text{ABn}}$ at 75°C (50 nmol of each ligand, pH ~4).

Fig. 5 summarizes the labelling yields for the triazacyclononane derivatives and DOTA at room temperature and 75°C after 10 min reaction.

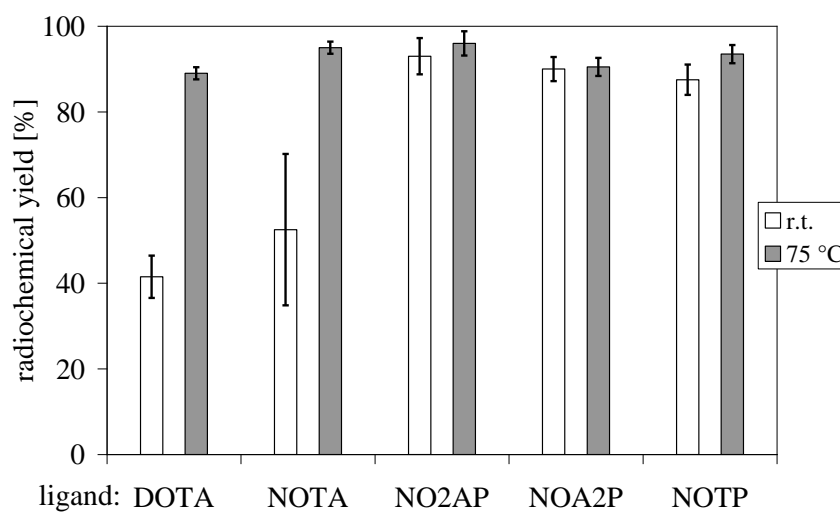


Fig. 5: Yields of the $^{68}\text{Ga}^{3+}$ labelling of DOTA, NOTA, NO2AP, NOA2P and NOTP after 10 min at room temperature (r.t.) and 75°C (50 nmol of each ligand, pH ~4).

Labelling finally proceeds at temperatures between 25 and 75°C within 2 to 10 min in a total volume of 800 μL , and at optimal pH of 4.

HPLC analysis

The ^{68}Ga -NOTP complex was synthesized as described and used for HPLC analysis. The HPLC chromatogram showed 98% radiochemical yield (compared to 95% for radio-TLC for this reaction). The other fraction at 2.1 min retention time is uncomplexed ^{68}Ga , cf. Fig. 6.

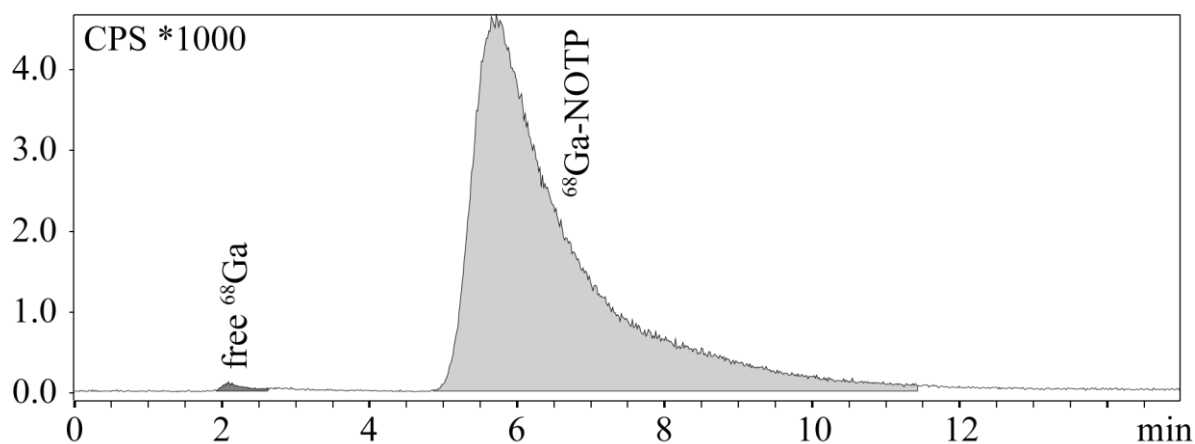


Fig. 6: HPLC chromatogram of the reaction mixture of ^{68}Ga -NOTP.

Hydroxyapatite binding

^{68}Ga complexes with DOTA and NOTA showed the expected results of almost any binding to hydroxyapatite (Hap), which is 7.6% for the ^{68}Ga -DOTA complex and 6.3% for ^{68}Ga -NOTA. The ligand ^{68}Ga -DO3A- P^{ABn} also has negligible binding to hydroxyapatite, as the adsorption experiments show a $5.4 \pm 0.4\%$ ^{68}Ga content in the final Hap fraction. In terms of quantification of Hap binding, these amounts of non-phosphonate ^{68}Ga -complexes still measurable in the washed Hap fraction are in the following taken as “unspecific binding”. For unspecific binding, therefore, an average value of $6 \pm 1\%$ was adopted.

Interestingly, free $^{68}\text{Ga}^{3+}$ is significantly taken up by Hap with $84.4 \pm 2.9\%$. However, this is interpreted as chemisorption of ^{68}Ga hydroxide, formed in the saline medium.

The percentage of ^{68}Ga -phosphonate complexes bound to Hap is summarized in Fig. 7. The uptake illustrated has been corrected by an average of 6% of “unspecific binding”. The results of the hydroxyapatite binding assays indicate strongest binding of ^{68}Ga -EDTMP and ^{68}Ga -DOTP. The ^{68}Ga complexes with the triazacyclononane derivatives show an increase of binding to Hap with rising number of phosphonate groups, though still much lower than in the case of ^{68}Ga -EDTMP or ^{68}Ga -DOTP.

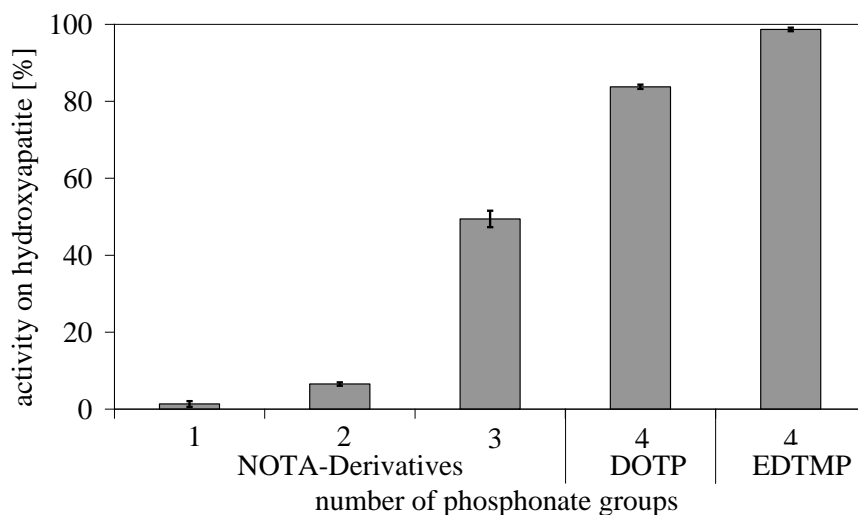


Fig. 7: Binding efficacies of ^{68}Ga -phosphonate complexes on 20 mg of Hap at 25°C.

μ -PET studies

Initial *in vivo* experiments using 55 MBq ^{68}Ga -EDTMP containing 50 nmol (22 μg) EDTMP revealed no uptake on bone structures of the healthy rats. The main activity was found in the bladder, cf. Fig. 8.

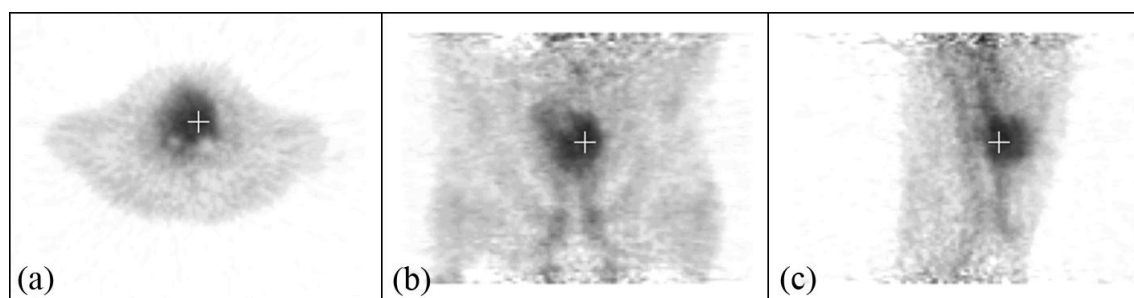


Fig. 8: ^{68}Ga -EDTMP distribution measured *in vivo*. Transversal (a), coronal (b) and sagittal (c) μ -PET images 30 – 60 min *p.i.*, Wistar rat, 55 MBq ^{68}Ga -EDTMP injected containing 22 μg EDTMP

However, applying much higher amounts of the free aliphatic ligand EDTMP (1.7 mg), a significant uptake of ^{68}Ga -EDTMP (73 MBq injected) on the skeleton of healthy rats was obtained (Figs. 9,10). In coronal slices (Fig. 9) the image shows clearly each rib and the spine. The only other organ showing high ^{68}Ga activity was the bladder, cf. Fig. 10c.

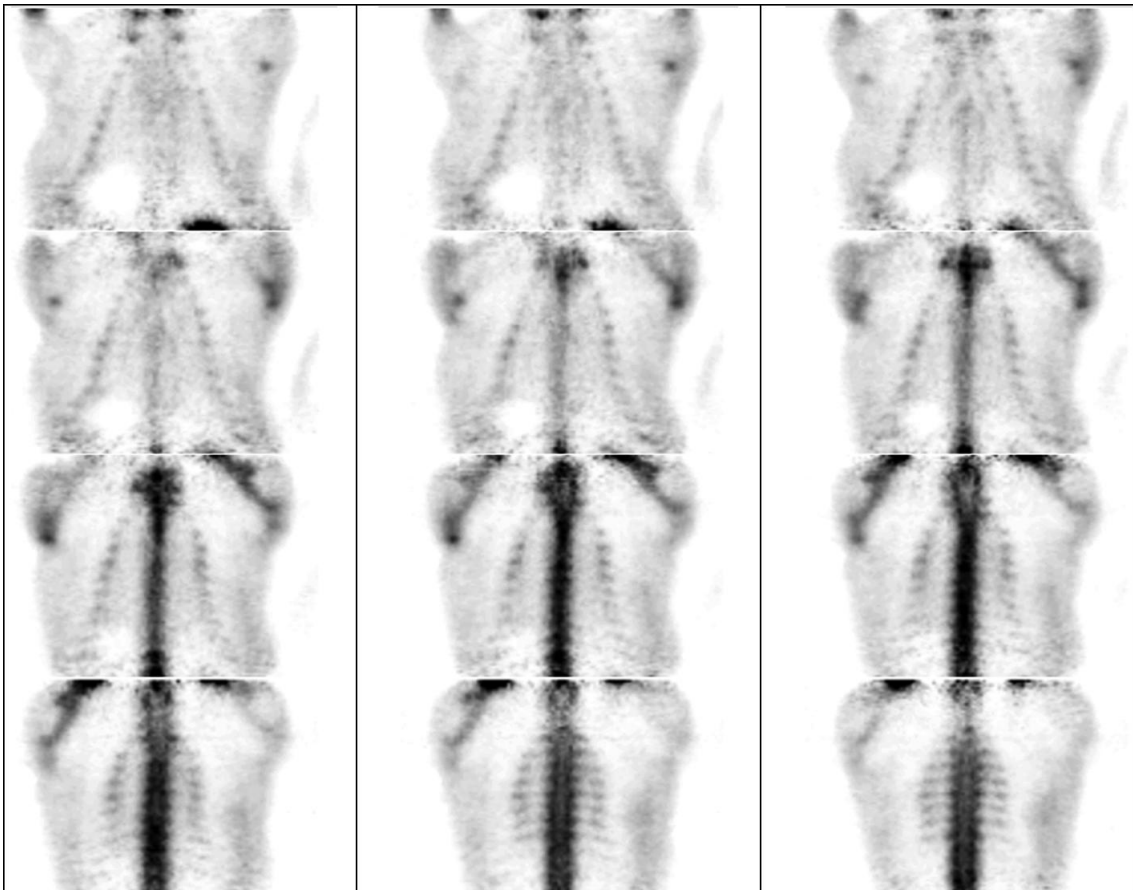


Fig. 9: ^{68}Ga -EDTMP distribution measured *in vivo*. Coronal μ -PET images 30 – 60 min *p.i.*, Wistar rat, 73 MBq ^{68}Ga -EDTMP injected containing 1.7 mg EDTMP

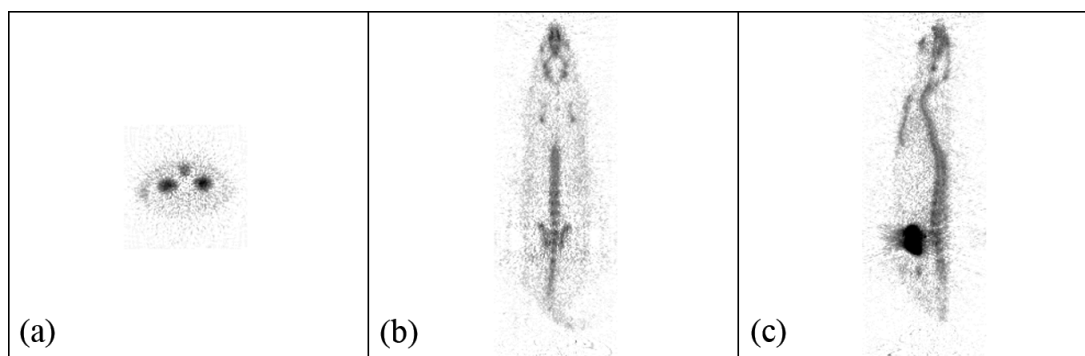


Fig. 10: ^{68}Ga -EDTMP distribution measured *in vivo*. Transversal (a), coronal (b) and sagittal (c) μ -PET images 60 – 75 min *p.i.*, Wistar rat, 73 MBq ^{68}Ga -EDTMP injected containing 1.7 mg EDTMP

Discussion

Synthesis of H₄NO₂AP and H₅NOA₂P

The synthesis of H₄NO₂A was straightforward and started from 1, 4, 7-triazacyclononane-1,4-bis(acetic acid tert-butyl ester) (**2**), which is easily available from 1, 4, 7-triazacyclononane (**1**) [15]. **2** was converted to the methylenephosphonate diethyl ester derivative **3** in a Mannich-Arbuzov reaction and the free acid **4** was obtained by the acid hydrolysis of the ester groups (Fig. 2). The synthesis of H₅NOA₂P was more challenging. There are several possible synthetic routes to this ligand, all of which involve the selective functionalization of the parent macrocycle **1**. Preliminary experiments suggested that monofunctionalization of 1,4,7- triazacyclononane (**1**) could advantageously be achieved by reacting bromoacetic acid 1-adamantyl ester (**5**) [16] with large excess of **1**. The product 1,4,7-triazacyclononane-1-mono(acetic acid adamantyl ester) (**6**) is sparingly soluble in water in its deprotonated form and therefore, excess **1** can easily be removed by a simple aqueous wash. **6** was then converted to the phosphonate ester derivative **7** and removal of the ester groups by acid hydrolysis gave the desired final product **8**. (Fig. 2).

⁶⁸Ga–Labelling

Besides DOTP, all ligands show a very high radiochemical yield of >92% after 10 min heating at 75°C and pH about 4, although the ligands are only used in nanomole scale.

Labelling of DOTP with ⁶⁸Ga³⁺ is more difficult when compared to the complexation with lanthanides such as ¹⁷⁷Lu [17,18]. The Ln³⁺ cations are relatively easily complexed at pH 7 – 9 with DOTP [11,19,20]. Due to the formation of insoluble Ga(OH)₃ (it has a K_{sp} = 5x10⁻³⁷ which is much lower than that for lanthanides, varying between La(OH)₃: K_{sp} = 1x10⁻¹⁹ and Lu(OH)₃: K_{sp} = 2.5x10⁻²⁴) [21], reactions carried out with Ga³⁺ and DOTP at this alkaline pH are problematic. In the present work reactions were performed at a maximum pH of ~ 4 in order to suppress the mentioned formation of the ⁶⁸Ga–hydroxide species and under these conditions only the out of cage complex is probably formed and full complexation may also be hampered by kinetic problems [22].

Interestingly, the labelling yields of the NOTA–based phosphonates are very high already at low temperature. This reflects the favourable thermodynamic and kinetic properties of triazacyclononane–based chelators for ⁶⁸Ga³⁺ labelling.

HPLC analysis

Initially a HPLC system for the inactive Ga-complexes was developed. This was a strong anion exchange column (Partisil 10 SAX 250x4 mm) and a 0.75 M phosphate buffer, pH = 3, (1 mL flow; detection at 200 nm with Dionex UVD170U). In the case of Ga-NOTP, for example, the UV-based chromatograms showed retention times of 4.7 min for the Ga-NOTP complex and 7.3 min for the free ligand. However, these conditions did not work for the radioactive compounds. Possibly because of very low concentration of the radioactive complexes and also due to the use a metal based HPLC system, the retention times could not be reproduced. The radioactive reaction mixture showed intense tailing over many minutes.

Therefore a new solvent system was developed using 25% of 1 M sodium citrate. Other ^{68}Ga -species possibly occurring in the reaction were injected for control. For example, uncomplexed ^{68}Ga is sufficiently separated from the final complex ^{68}Ga -NOTP (cf. Fig. 6). HPLC analysis showed similar results compared to TLC. Beside this, a ^{68}Ga -intermediate is formed in the HEPES reaction buffer alone and the very weak Ga-HEPES complex itself [23] appears at 3.5 min retention time.

Purification

^{68}Ga -ligand complexes obtained in >95% yield were used directly for further experiments. Due to the lower yield of 51 ± 12 % for the ^{68}Ga -DOTP complex, purification was needed in this case. It was carried out by passing the reaction mixture over a cation exchanger. This provides an easy and fast method of purifying this complex from free, i.e. uncomplexed $^{68}\text{Ga}^{3+}$. Chemical purification was also applied for ^{68}Ga -EDTMP as this complex was obtained for *in vivo* μ -PET studies.

Binding studies

^{68}Ga -DOTA and ^{68}Ga -NOTA, the chelates of non-phosphonate ligands, showed an unspecific binding to Hap of ~6%. After deduction of this unspecific adsorption for the ^{68}Ga -TACN derivatives, a trend among their binding affinity to Hap with increasing number of phosphonate groups is observed, ranging from NO2AP: 7.6 - 6 \approx 2% to NOA2P: 12.8 - 6 \approx 7% and NOTP: 55.7 - 6 \approx 50%.

However, these binding parameters are still much lower than those found for the ^{68}Ga -DOTP and ^{68}Ga -EDTMP complexes. A similarly high binding capacity to Hap was found for the analogous chelate

^{153}Sm -DOTP in the literature [24,25]. The further increase of Hap binding capacity achieved by four phosphonates, as represented in the ^{68}Ga -DOTP complex, may directly be related to the increase of the number of phosphonate groups per ligand. There may be evidence that enhanced binding to Hap is facilitated by geminal configurations, i. e. by the concerted action of two neighbouring phosphonate groups. This is reflected by bisphosphonate structures established for $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MDP (methylene diphosphonate) for example, as recently shown for a bisphosphonate mono-amide analogue of DOTA [26]. In that work, ((4-[[bis-phosphonomethyl]carbomoyl]methyl)-7,10-bis-(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododec-1-yl)-acetic acid (BPAMD) was labelled with carrier-free ^{160}Tb (^{160}Tb -BPAMD) and strong binding to Hap was observed.

In our comparative study, ^{68}Ga -EDTMP showed excellent binding to Hap. ^{68}Ga -EDTMP seems to behave similarly to the well-established ^{153}Sm -EDTMP in terms of binding capacity to bone metastases. Interestingly, experimental data on the tracer's uptake on Hap are difficult to compare for various experimental setups. A recently published study on binding of ^{68}Ga -EDTMP showed 4.3 ± 2.7 % on 3 mg Hap after 120 min only [8]. The authors used commercially available multibone kits with 25 mg EDTMP and added 2 mL of a 0.1 M HCl direct generator eluate together with isotonic saline and kept it at ambient temperature for 30 min. Using 20 mg of hydroxylapatite is in our setup a good marker for binding of the phosphonates. Different publications dealing with up to 100 mg of hydroxyapatite [27,28] in binding studies reveal that these studies are not an optimal solution for binding studies.

The DO3A- P^{ABn} was involved in the present study to investigate whether a phosphorus containing acid group needed for metal coordination or substituted derivatives show affinity to Hap. The DO3A- P^{ABn} contains one phosphinate acid group in the molecule. The low binding of the ^{68}Ga -DO3A- P^{ABn} -complex indicates, that a free phosphonate group is needed for binding to Hap.

μ -PET measurements

The first attempt of *in vivo* imaging of bone structures of a healthy rat was conducted with ^{68}Ga -EDTMP of 50 nmol EDTMP concentration only. The image showed accumulation of the activity in the bladder, with negligible uptake at the skeleton. This seems to be in analogy to the reported ^{153}Sm -EDTMP characteristics. With 4 μg EDTMP, the ^{153}Sm -EDTMP is stable for 1 h in plasma whereas for 24 h it is stable only when using 50 μg EDTMP [29]. The trivalent metal is released from the complex very fast *in vivo* because of low thermodynamic and kinetic complex stability (Sm-

EDTMP: $\log K=14.44$) [30]. This can be completed by the usage of an excess amount of the ligand. Consequently, a large excess of EDTMP is injected with the ^{153}Sm -EDTMP tracer.

The same strategy seems to be required in the case of ^{68}Ga -EDTMP. Recent work [8,9] used a large amount of 25 mg EDTMP for complexing $^{68}\text{Ga}^{3+}$. Our experiments indicate that at best 1 mg of EDTMP is needed to identify ^{68}Ga -EDTMP bone uptake in rats (which is about >1.5 mg/kg body weight). If a lower amount of EDTMP is applied, the ^{68}Ga released from the complex is taken up as hydroxide or colloids by the liver and/or is transchelated to the protein transferrin due to the high stability of Ga-transferrin ($\log K_1=20.3$, $\log K_2=19.3$) [31].

When 1.7 mg EDTMP ligand (3.9 μmol) was co-injected, the promising results shown in Fig. 9 and Fig. 10 were obtained. For an additional investigation of the minimum amount of EDTMP required for *in vivo* stabilisation, two other experiments with 1 mg and 3 mg co-injected ligand were performed. Even with 1 mg there was an accumulation of activity at the bone, but with worse statistics compared to the use of 1.7 mg and 3 mg EDTMP.

Conclusion

Syntheses of no-carrier-added ^{68}Ga phosphonate complexes are performed within 20 minutes or less after elution of the generator in high yields of >92 %. First evaluations on synthetic apatite show high binding within 10 minutes for both ^{68}Ga -EDTMP and the macrocyclic ^{68}Ga -DOTP. However due to the limitation of the reaction pH, ^{68}Ga -DOTP could not be synthesized in sufficient radiochemical yields (51 ± 12 %), interesting for imaging purpose.

Preliminary μ -PET imaging on healthy Wistar rats demonstrated bone uptake *in vivo* for ^{68}Ga -EDTMP. To overcome the addition of EDTMP (or MDP in the case of $^{99\text{m}}\text{Tc}$), the attention still would be focused on macrocyclic ligands forming thermodynamically and kinetically stable complexes with Ga(III). Here, the macrocyclic ligands are of particular interest, as the complex stability is higher than those for open-chain ligands like EDTMP.

NOTA-based phosphonates clearly show favourable ^{68}Ga -ligand complex formation parameters in terms of high labelling yield at low temperature compared to DOTA-analogues. The lower Hap uptake in the case of macrocyclic NOTA-based ligands with 3, 2 or 1 phosphonate groups reflects the

impact of the number of phosphonate targeting groups. Interestingly, the non-Hap binding of DO3A-P^{ABn} indicates further requirements to design optimum tracers for imaging bone metabolism.

Nevertheless, further research will focus on new tetraaza- or triaza-macrocylic chelates with free bisphosphonate structural characteristics, able to complex Gallium and bind to bone structures.

Acknowledgements:

This work was carried out in the framework of COST D38 Action "Metal-Based Systems for Molecular Imaging Applications" and EU-FP6 "Network of Excellence" EMIL (No. LSHC-2004-503569) project. C. F. G. C. Geraldês thanks the Foundation of Science and Technology (F.C.T.), Portugal (project PTDC/QUI/70063/2006) and FEDER. I. Lukeš thanks the Long-Term Research Plan of the Ministry of Education of the Czech Republic (No. MSM0021620857).

References

1. Greenlee, R. T.; Hill-Harmon, M. B.; Murray, T.; Thun, M.: *Cancer Statistics, 2001*. CA Cancer J. Clin. 51, 15 (2001).
2. Rubens, R. D.: *Bone metastases - The clinical problem*. Eur. J. Cancer 34, 210 (1998).
3. Zettinig, G.; Dudczak, R.; Leitha, T.: *Nuklearmedizinische Diagnostik der Osteomyelitis*. J. Mineralstoffwechsel 10, 20 (2003).
4. Harmer, C. L.; Burns, J. E.; Sams, A.; Spittle, M.: *The value of fluorine-18 for scanning bone tumours*. Clin. Radiol. 20, 204 (1969).
5. Roesch, F.; Filosofov, D. V.; Zhernosekov, K.; Jennewein, M.: *Method and device for chemical and radiochemical purification of ⁶⁸Ga for labeling of precursor compounds*; WO2006056395.
6. Dewanjee, M. K.; Hnatowich, D. J.; Beh, R.: *New ⁶⁸Ga-labeled skeletal-imaging agents for positron scintigraphy*. J. Nucl. Med. 17, 1003 (1976).

7. Su, M.; Qiu, Y.; Jia, W.: *A pilot study of antitumor effect of gallium ethylene diaminetetramethylene phosphonate [Ga(III)-EDTMP] in tumor-bearing rats*. *Adv. Ther.* 22, 297 (2005).
8. Mitterhauser, M.; Toegel, S.; Wadsak, W.; Lanzenberger, R. R.; Mien, L.-K.; Kuntner, C.; Wanek, T.; Eidherr, H.; Ettliger, D. E.; Viernstein, H.; Kluger, R.; Dudczak, R.; Kletter, K.: *Pre vivo, ex vivo and in vivo evaluations of [⁶⁸Ga]-EDTMP*. *Nucl. Med. Biol.* 34, 391 (2007).
9. Toegel, S.; Wadsak, W.; Mien, L. K.; Viernstein, H.; Kluger, R.; Eidherr, H.; Haeusler, D.; Kletter, K.; Dudczak, R.; Mitterhauser, M.: *Preparation and pre-vivo evaluation of no-carrier-added, carrier-added and cross-complexed [⁶⁸Ga]-EDTMP formulations*. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 68, 406 (2008).
10. Desreux, J. F.; Merciny, E.; Loncin, M. F.: *Nuclear magnetic resonance and potentiometric studies of the protonation scheme of two tetraaza tetraacetic macrocycles*. *Inorg. Chem.* 20, 987 (1981).
11. Sherry, A. D.; Ren, J.; Huskens, J.; Brucher, E.; Toth, E.; Geraldès, C. F. C. G.; Castro, M. M. C. A.; Cacheris, W. P.: *Characterization of lanthanide(III) DOTP complexes: thermodynamics, protonation, and coordination to alkali metal ions*. *Inorg. Chem.* 35, 4604 (1996).
12. Bryden, C. C.; Reilley, C. N.; Desreux, J. F.: *Multinuclear nuclear magnetic resonance study of three aqueous lanthanide shift reagents: complexes with EDTA and axially symmetric macrocyclic polyamino polyacetate ligands*. *Anal. Chem.* 53, 1418 (1981).
13. Geraldès, C. F. G. C.; Brown, R. D., III; Cacheris, W. P.; Koenig, S. H.; Sherry, A. D.; Spiller, M.: *Evaluation of polyaza macrocyclic methylene phosphonate chelates of gadolinium ions as MRI contrast agents*. *Magn. Reson. Med.* 9, 94 (1989).
14. Rudovsky, J.; Kotek, J.; Hermann, P.; Lukes, I.; Mainero, V.; Aime, S.: *Synthesis of a bifunctional monophosphinic acid DOTA analogue ligand and its lanthanide(III) complexes. A gadolinium(III) complex endowed with an optimal water exchange rate for MRI applications*. *Org. Biomol. Chem.* 3, 112 (2005).
15. Kovacs, Z.; Sherry, A. D.: *A general synthesis of mono- and disubstituted 1,4,7-triazacyclononanes*. *Tetrahedron Lett.* 36, 9269 (1995).

-
16. Avery, T. D.; Fallon, G.; Greatrex, B. W.; Pyke, S. M.; Taylor, D. K.; Tiekink, E. R. T.: *Mechanistic investigations on the reaction between 1,2-dioxines and bulky stabilized phosphorus ylides: an efficient route to closely related cyclopropane stereoisomers*. J. Org. Chem. 66, 7955 (2001).
 17. Das, T.; Chakraborty, S.; Sarma, H. D.; Banerjee, S.: *¹⁷⁷Lu-DOTMP: a viable agent for palliative radiotherapy of painful bone metastasis*. Radiochim. Acta 96, 55 (2008).
 18. Das, T.; Chakraborty, S.; Unni, P. R.; Banerjee, S.; Samuel, G.; Sarma, H. D.; Venkatesh, M.; Pillai, M. R. A.: *¹⁷⁷Lu-labeled cyclic polyaminophosphonates as potential agents for bone pain palliation*. Appl. Radiat. Isot. 57, 177 (2002).
 19. Geraldes, C. F. G. C.; Sherry, A. D.; Kiefer, G. E.: *The solution structure of Ln (DOTP)⁵⁻ complexes. A comparison of lanthanide-induced paramagnetic shifts with the MMX energy-minimized structure*. J. Magn. Reson. 97, 290 (1992).
 20. Avecilla, F.; Peters, J. A.; Geraldes, C. F. G. C.: *X-ray crystal structure of a sodium salt of [Gd(DOTP)]⁵⁻. Implications for its 2nd-sphere relaxivity and the ²³Na NMR hyperfine shift effects of [Tm(DOTP)]⁵⁻*. Eur. J. Inorg. Chem. 23, 4179 (2003).
 21. Holleman, A. F.; Wiberg, E.: *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*, 101. Auflage; Gruyter: 1995.
 22. Burai, L.; Király, R., Lázár I., Brücher, E.: *Formation and dissociation kinetics of complexes of Gd(DOTP)⁵⁻ and Gd(DOTPMB)⁵⁻*. Eur. J. Inorg. Chem., 813 (2001).
 23. Azab, H. A.; Abou El-Nour, K. M.; Sorrow, S. H.: *Metal Ion Complexes Containing Dipeptides, Tripeptides, and Biologically Important Zwitterionic Buffers*. J. Chem. Eng. Data. 52, 381 (2007)
 24. Alves, F. C.; Donato, P.; Sherry, A. D.; Zaheer, A.; Zhang, S.; Lubag, A. J. M.; Merritt, M. E.; Lenkinski, R. E.; Frangioni, J. V.; Neves, M.; Prata, M. I. M.; Santos, A. C.; Lima, J. J. P. de; Geraldes, C. F. G. C.: *Silencing of Phosphonate-Gadolinium Magnetic Resonance Imaging Contrast by Hydroxyapatite Binding*. Inv. Radiol. 38, 750 (2003).
 25. Chakraborty, S.; Das, T.; Banerjee, S.; Chaudhari, P. R.; Sarma, H. D.; Venkatesh, M.; Pillai, M. R. A.: *Preparation and biological evaluation of ¹⁵³Sm-DOTMP as a potential agent for bone pain palliation*. Nucl. Med. Commun. 25, 1169 (2004).
 26. Kubicek, V.; Rudovsky, J.; Kotek, J.; Hermann, P.; Vander Elst, L.; Muller, R. N.; Kolar, Z. I.; Wolterbeek, H. T.; Peters, J. A.; Lukes, I.: *A Bisphosphonate Monoamide Analogue of DOTA: A Potential Agent for Bone Targeting*. J. Am. Chem. Soc. 127, 16477 (2005).
-

27. Foersterova, M.; Jandurova, Z.; Marques, F.; Gano, L.; Lubal, P.; Vanek, J.; Hermann, P.; Santos, I.: *Chemical and biological evaluation of ^{153}Sm and ^{166}Ho complexes of 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetrakis(methylphosphonic acid monoethylester) (H4dotpOEt)*. J. Inorg. Biochem. 102, 1531 (2008).
28. Okamoto, Y.: *Accumulation of technetium-99m methylene diphosphonate. Conditions affecting adsorption to hydroxyapatite*. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radio./ Endod. 80, 115 (1995)
29. Bai, H.; Jin, H.; Fan, H.; Du, J.; Wang, F.; Chen, D.; Cheng, Z.: *Study on analysis of ^{153}Sm -EDTMP stability in vitro and vivo by HPLC*. J. Radioanal. Nucl. Chem. 236, 87 (1998).
30. Jarvis, N. V.; Wagener, J. M.; Jackson, G. E.: *Metal-ion speciation in blood plasma as a tool for elucidating the in vivo behavior of radiopharmaceuticals containing ^{153}Sm and ^{166}Ho* . Dalton Trans. 9, 1411 (1995).
31. Harris, W. R.; Pecoraro, V. L.: *Thermodynamic binding constants for gallium transferrin*. Biochem. 22, 292 (1983).

3.5 ^{68}Ga -BPAMD: PET-imaging of bone metastases with a generator based positron emitter

^{68}Ga -BPAMD: PET-imaging of bone metastases with a generator based positron emitter

**M. Fellner¹, N. Loktionova¹, B. Bisalski³, N. Bausbacher⁴, V. Kubíček²,
P. Hermann², F. Rösch¹, O. Thews⁵**

¹ Institute of Nuclear Chemistry, Johannes Gutenberg University of Mainz, Mainz, Germany

² Department of Inorganic Chemistry, Charles University, Prague, Czech Republic

³ Institute of Physiology and Pathophysiology, University Medicine Mainz, Mainz, Germany

⁴ Department of Nuclear Medicine, University Hospital, 55101, Mainz, Germany

⁵ Institute of Physiology, Martin-Luther-University, Halle (Saale), Germany

Keywords: Ga-68, macrocyclic ligand, bisphosphonate, bone metastases

Abstract

Purpose: Bone metastases are a serious aggravation for patients suffering from cancer. Therefore, early recognition of bone metastases is of great interest for further treatment of patients. Bisphosphonates are widely used for imaging bone lesions with $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Using the $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generator together with a macrocyclic bisphosphonate a comparable PET-tracer comes into focus.

Procedures: The bisphosphonate DOTA-like ligand BPAMD was labelled with ^{68}Ga . [^{68}Ga]BPAMD was investigated concerning binding to hydroxyapatite and stability. The tracer's *in vivo* accumulation was determined on healthy rats and bone metastases bearing animals by μ -PET.

Results: BPAMD was labelled efficiently with ^{68}Ga after 10 min at 100 °C. [^{68}Ga]BPAMD showed high stability within 3h and high binding to hydroxyapatite. Consequently μ -PET experiments revealed

high accumulation of [^{68}Ga]BPAMD in regions of pronounced remodelling activity like bone metastases.

Conclusions: [^{68}Ga]BPAMD is of great interest for diagnosis of bone metastases. The straight forward ^{68}Ga -labelling could be transferred to a kit-preparation of a cyclotron-independent PET tracer, that could be used in many clinical sites using the $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generator.

Introduction

Besides lung and liver, the bones are most frequently affected by metastases. 60-80 % of these metastases are caused by breast or prostate carcinoma. Bone metastases occur in many cases at an early stage of the tumour disease, however their symptoms are recognized rather late [1,2]. Hence, a diagnosis of bone metastases in an early state together with a subsequent therapy is of great importance for patients.

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -phosphonates are well-established tracers for the diagnosis of bone metastases in nuclear medicine using planar imaging or single photon emission tomography (SPECT) [3]. However, due to the higher spatial resolution of positron emission tomography (PET), adequate pharmaceuticals with positron emitters would be of great potential. The superior imaging quality in the case of PET/CT imaging is clearly demonstrated by using [^{18}F]fluoride [4]. Nevertheless PET features also quantification of the tracer accumulation in the tissues investigated, compared to SPECT, which cannot afford this. Additionally, non-cyclotron dependent PET-tracers, i.e. radionuclide generator based derivatives, would provide the required availability for instant tracer synthesis and PET/CT diagnosis. For this attempt the Germanium-68/Gallium-68 generator with the positron emitter ^{68}Ga ($T_{1/2} = 67.7$ min; high positron branching = 89%) represents a promising system. Having had recent supply difficulties of the $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ generators [5,6], this Gallium generator comes into focus of nuclear medicine diagnostics.

Using the cationic post-processing of the generator eluate, it is an excellent source for synthesizing and evaluating new tracers [7,8]. Previous studies on first generation phosphonates [9] provided following requirements and restrictions: 1. open chained ligands like EDTMP (Fig. 1) exhibit low stability, this means high amounts of free ligand has to be injected (> 1.5 mg / kg body weight) in order to keep the complex stable; 2. phosphonate groups in ligands which are needed for complexing

Ga^{3+} are not available for binding to apatite (e.g. NOTP; Fig. 1), thus free phosphonates are necessary [9].

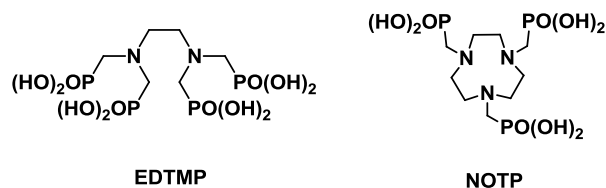


Fig. 1: Ligands EDTMP and NOTP used in former study investigating ^{68}Ga -complex formation and binding to hydroxyapatite

Bisphosphonates are known to have high and fast binding to apatite structures especially those of high biological activity [10] and are well-established ligands for $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labelled SPECT tracers. Most used phosphonates for $^{99\text{m}}\text{Tc}$ are bisphosphonates like methylene diphosphonate (MDP), dicarboxypropane diphosphonate (DPD) and hydroxymethylene diphosphonate (HDP). Chemically combining bisphosphonates with a positron emitter, however, would be of great potential for the *in vivo* imaging of bone metastases using PET/CT, particularly in times of global ^{99}Mo shortage as seen in the last 2 years.

Combining these results led to a new generation of DOTA bisphosphonates. One out of these is (4-[[bis-(phosphonomethyl) carbamoyl]methyl]-7,10-bis(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododec-1-yl)acetic acid (BPAMD; Fig. 2) [11,12], which was labelled with ^{68}Ga in nanomolar scale in water after 10 min heating at 100 °C and has been used for a first human application [13].

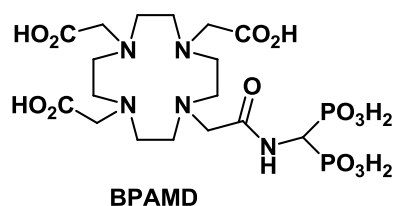


Fig. 2: Macrocylic bisphosphonate BPAMD investigated in this study

Bisphosphonates in general are of another benefit. Compounds like alendronate, risedronate or zoledronate do not only bind to the hydroxyapatite structure of the bone, they are also interacting in the HMG CoA reductase pathway and are inhibiting the farnesyl diphosphate synthase (FPPS) [10,14]. The bisphosphonates mimic pyrophosphates and thus inhibit the FPPS meaning that bisphosphonates have a biochemical target and not only a physical one by binding to hydroxyapatite.

Materials and Methods

Generator

Germanium-68 ($T_{1/2} = 270.8$ d) provides the positron emitter Gallium-68 as an easily available and relatively inexpensive source of a PET nuclide. A Cyclotron Obninsk Ltd. Co. (Russian Federation) generator was used, with Germanium-68 fixed on a solid phase of modified titanium dioxide. Gallium-68 is eluted from the generator with 10 mL 0.1 M HCl and is on line-immobilized on a strong acidic cation exchanger. A mixture of hydrochloric acid and acetone further removes impurities such as zinc, iron and titanium as well as ^{68}Ge generator breakthrough (0.15 M HCl / 80 % acetone). Subsequently, ^{68}Ga is eluted quantitatively in 400 μL of a second mixture of HCl and acetone (0.05 M HCl / 97.6 % acetone) from the cation exchange resin [7,8]. This fraction serves as an ideal low-volume, low acidic and chemically highly pure source of ^{68}Ga for subsequent labelling.

BPAMD Synthesis and Labelling

BPAMD was prepared by published method [11,12]. In brief, Triethyl orthoformate (1.2 eq.), diethyl phosphite (3 eq.), and dibenzylamine (1 eq.) were reacted at 150 °C for 5 h with condenser and additional 24h without. Reaction mixture was partitioned between CHCl_3 and 5 % aqueous NaOH and washed with brine. The crude product was purified by gradient column chromatography over ethanol/ hexane yielding tetraethyl (*N,N*-dibenzyl)aminomethyl-bis(phosphonate) (43 %). This compound was hydrogenated using 10 % Pd/C in ethanol, yielding tetraethyl aminomethyl-bis(phosphonate) in 96 % yield as colorless oil. This product was dropped in a solution of chloroacetyl chloride in acetonitrile, cooled to -40 °C. Treated with charcoal and removing excess of chloroacetyl chloride by co-distillation with toluene gave the chloroacetamide as colourless oil (96 %). Finally the chloroacetamid was dissolved in acetonitrile together with K_2CO_3 and added to a solution of $t\text{-Bu}_3\text{DO3A}\cdot\text{HBr}$ in acetonitrile with K_2CO_3 . Reaction overnight, subsequently evaporation of the solvent and deprotection of the tertbutyl ester yielded the product BPAMD after purification over a strong cation exchanger (39 %).

A stock solution of BPAMD (1 mg/mL water) was prepared and aliquots were used for labelling studies. ^{68}Ga labelling itself was performed in 5 mL millipore water in 11 mL Techne vials by adding the 400 μL of purified and concentrated ^{68}Ga fraction. Through variation of reaction time (1-10 min), temperature (60 to 100 °C), different amounts of the complex ligands (5-50 nmol) as well as reaction pH (pH = 1-5), optimum reaction parameters for ^{68}Ga complex formation were analysed. All

experiments studying labelling kinetics were conducted in a thermomixer system (HLC Biotech HeatingThermoMixer MHR 13). For the human application, the thermomixer can be replaced by a simple heating block available at most clinical sites with a $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generator.

Radioactive Analysis

Determination of radiochemical labelling yield and complex formation kinetics were carried out by two TLC systems: A: Merck SG-60 silica plates developed with 0.25 M citrate buffer pH 4; B: Macherey Nagel cellulose TLC plates (Polygram Cel 300, 0.1 mm) developed with 2:1 mixture of B1:B2 (B1: 9 mL millipore water; 0.6 mL HCl (conc. 37 %); 88 mL acetone / B2: 2,4-pentadione). After drying and developing the TLCs, they were measured on a Canberra Packard Instant Imager.

Additionally a HPLC system was developed for quality control using a strong anion exchange column (Partisil 10 SAX 250x4 mm) on a Dionex HPLC system (P680 HPLC, UVD 170U) connected with a Raytest Gabi 2x2" radioactivity detector. The solvent system was a gradient of 1 M phosphate buffer (pH = 3, A) and 1 M sodium citrate (B): flow 1.5 mL/min; 0-5 min 100 % A; 5-7 min 100 % A to 70 % A/ 30 % B; 7-12 min 70 % A/ 30 % B; 12-14 min 70 % A/ 30 % B to 100 % A; 14-20 min 100 % A.

Purification of [^{68}Ga]BPAMD

Non-complexed ^{68}Ga had to be removed prior to further evaluations. This was performed by passing the reaction mixture over strong cation exchanger (Strata-X-C 60 mg, conditioned with 1 mL 4 M HCl and 1 mL water). The non-complexed gallium was immobilized on the exchanger while the [^{68}Ga]BPAMD complex passed to the product vial. In order to adjust the pH to 7.4, aliquots of a 100 mg/mL sodium HEPES solution were added.

Binding studies on Hydroxyapatite

Binding studies on synthetic hydroxyapatite (Hap) were applied to simulate the binding of the different ^{68}Ga ligand complexes to bone structures. For this purpose, 20 mg Hap were incubated in 1 mL isotonic saline for 24 h. The test itself was performed by the addition of 50 μL of the ^{68}Ga -complexes to the Hap fraction. After vortexing for 10 seconds, the probes were incubated for 10 min at ambient temperature. The samples were centrifuged and the supernatant was removed. The Hap

fraction was washed with 0.5 mL saline. This solution contained less than 2% of the overall ^{68}Ga radioactivity.

The ^{68}Ga radioactivity in combined liquids and the Hap fraction was measured in a curiemeter (Aktivimeter Isomed 2010, MED Nuklear-Medizintechnik Dresden GmbH). ^{68}Ga complex binding to Hap was determined as percent of ^{68}Ga absorbed to Hap.

Stability study

For stability study, 3 mg of apo-transferrin was suspended in 1 mL PBS buffer. 400 μL of purified [^{68}Ga]BPAMD was added. The mixture was shaken in the thermomixer at 37 °C for up to 180 min. The solution was analyzed by TLC using 0.25 M citrate buffer pH 4. For control, additional vials were prepared by the same method only missing of one compartment (chelator or transferrin) and therefore serving as complete binding of ^{68}Ga to transferrin (without chelator) and only [^{68}Ga]BPAMD (without transferrin).

Animals and tumours

Animal imaging experiments were performed either in healthy rats (Copenhagen rat, body weight 190 g) and in animals bearing induced bone metastases (Sprague-Dawley rats). Animals were allowed access to food and acidified water ad libitum before the investigation. All experiments had previously been approved by the regional animal ethics committee and were conducted in accordance with the German Law for Animal Protection and the UKCCCR Guidelines [15].

For metastases experiments cells of the Walker 256 carcinoma has been used, a cell line which is known to form bone metastases [16]. Walker 256 cells were grown in RPMI medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) at 37°C under a humidified 5% CO_2 atmosphere and sub cultivated once per week. For tumour implantation male Sprague-Dawley rats (Charles River Wiga, Sulzfeld, Germany; body weight 320 to 480 g) housed in the animal care facility of the University of Mainz were used in this study. For metastasis induction Walker 256 cells were injected into the superficial caudal epigastric artery. In brief, after an inguinal incision the subcutaneous preparation of the epigastric artery was performed. After distal ligation of the artery a thread was looped loosely around the proximal end. Following a small incision of the artery wall a catheter (o.d. 0.5 mm, i.d. 0.25 mm) was inserted and fixed with the thread. 2×10^5 cells were suspended in 200 μL isotonic

saline and injected into the catheter. After tightening the proximal ligature the catheter was removed, the operating field was cleaned with ethanol and the cutaneous incision was closed. Tumour cells were always implanted into the right leg whereas the contralateral side served as a control. PET imaging was performed two weeks after tumour cell injection an interval during which bone metastases in the distal femur or the tibia were formed in approximately 80% of the animals (data not shown).

μ-PET experiments

PET imaging was performed in spontaneously breathing rats under isoflurane anaesthesia (2% isoflurane, 98% oxygen). [⁶⁸Ga]BPAMD was prepared with 30 nmol ligand using the described conditions. After purification and pH adjustment, a solution was obtained ready for injection.

The PET imaging was performed on a microPET Focus 120 small animal PET (Siemens/Concorde, Knoxville, USA). During PET measurements the animals were placed in supine position. For imaging of the healthy animals the scanning region was placed over the chest whereas in the tumour experiments the region was located over the lower limb from the pelvis down to the feet. After a 15 min transmission scan with an external ⁵⁷Co source, dynamic PET studies were acquired in 2D mode. The radiotracer was administered as a bolus injection via the tail vein. For the measurement of the tracer distribution in a healthy animal the injected dose was 15 MBq. In the metastases experiments the dose was 20.5±0.5 MBq. Afterwards, PET images were obtained for a total measuring interval of 60 min. Finally, a whole body scan (60-75 min post injection) was performed.

For analysis the PET listmode data were histogrammed into 14 to 20 frames with varying time frames (1-5 min) and reconstructed using OSEM algorithm. μ-PET image quantification was applied using PMOD software (PMOD Technologies Ltd.). Volumes-of-interest (VOIs) were defined for tumour and reference tissue (contralateral bone). Ratios of tumour to reference tissue were calculated from integral image between 10' and 60' after tracer injection.

Results

Complex formation, Analysis and Purification

The elution of $^{68}\text{Ga}^{3+}$ from the generator and the on line-processing of the eluate are performed within less than five minutes. Figs. 3 to 5 compare typical labelling reactions for BPAMD depending on temperature (Fig. 3, 60 to 100 °C), amount of ligand (Fig.4, 5-50 nmol) and reaction pH (Fig. 5, pH = 1-5).

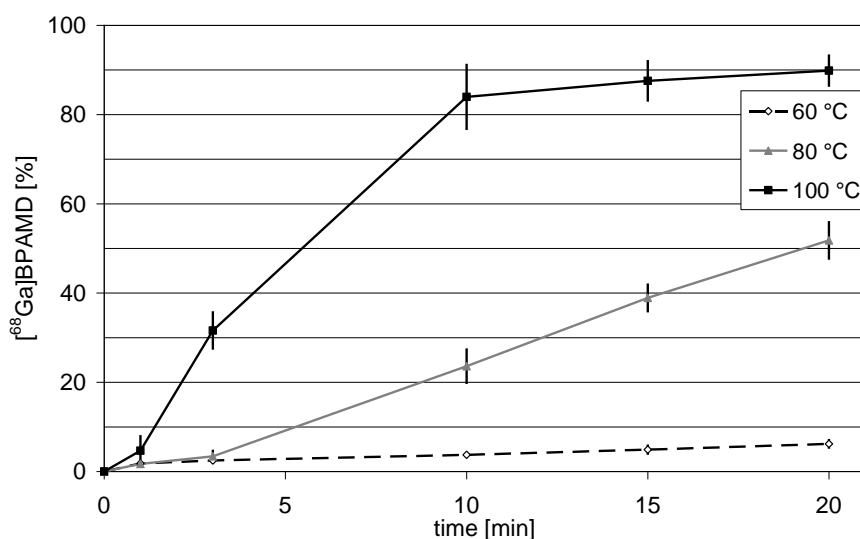


Fig. 3: Radiochemical yield of $[^{68}\text{Ga}]$ BPAMD at different temperatures with 20 nmol BPAMD at pH = 3

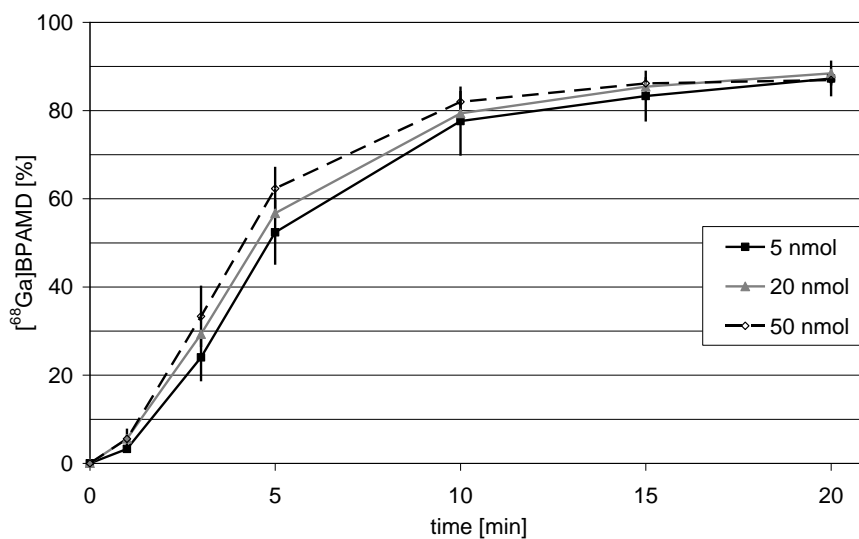


Fig. 4: Radiochemical yield of $[^{68}\text{Ga}]$ BPAMD at 100 °C and pH = 3 with different amounts of ligand (5-50 nmol)

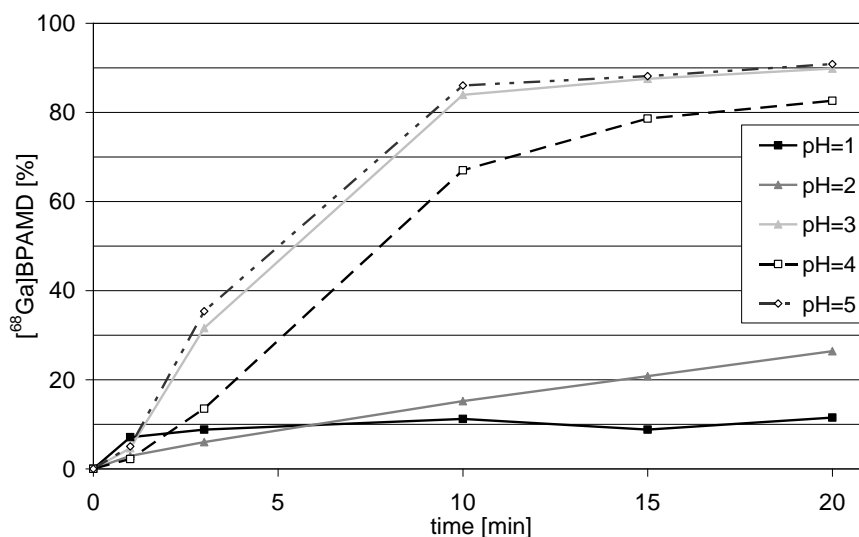


Fig. 5: Radiochemical yield of [^{68}Ga]BPAMD using 20 nmol ligand at 100 °C with pH varied from 1 to 5

Labelling finally proceeds at temperatures of 100 °C within 10 min in a total volume of 5 mL and at optimal pH of 3 to yield 90 % of [^{68}Ga]BPAMD. This was checked by TLC and HPLC: TLC with sodium citrate showed the complex with an $R_f = 0.5$ and uncomplexed ^{68}Ga with $R_f = 0.0$ and 0.9 (due to formation of ^{68}Ga -citrate with solvent front and possibly colloidal ^{68}Ga at the origin) whereas the second solvent system showed 2 spots only and takes only 5 min for developing, compared to about 15 min for the citrate TLC. The complex [^{68}Ga]BPAMD with $R_f = 0.0$ and the uncomplexed ^{68}Ga with $R_f = 0.8$ (Fig. 6).

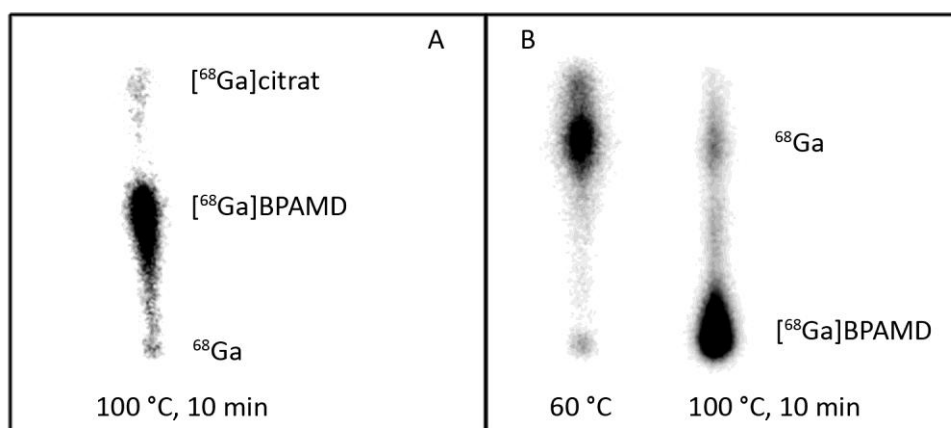


Fig. 1: A) Citrate TLC of the reaction mixture of [^{68}Ga]BPAMD, $R_f = 0.0$: ^{68}Ga , $R_f = 0.5$: [^{68}Ga]BPAMD, $R_f = 0.9$: ^{68}Ga -citrate; B) cellulose TLC with solvent system B1:B2 (2:1) with $R_f = 0.0$: [^{68}Ga]BPAMD, $R_f = 0.8$: ^{68}Ga

HPLC chromatogram revealed two peaks, the complex [^{68}Ga]BPAMD at 3.2 min and the uncomplexed ^{68}Ga at 8.5 min (Fig. 7). Both analytical methods were found to be consistent among the analysis methods (90 % by TLC compared to 91 % by HPLC). The reaction mixture was purified from uncomplexed ^{68}Ga using 60 mg Strata-X-C columns yielding pure [^{68}Ga]BPAMD (> 98 % radiochemical purity by HPLC, Fig. 8). Prior to using the purified ^{68}Ga -species for binding and μ -PET studies, pH was adjusted to 7.4 by adding aliquots of a sodium HEPES solution.

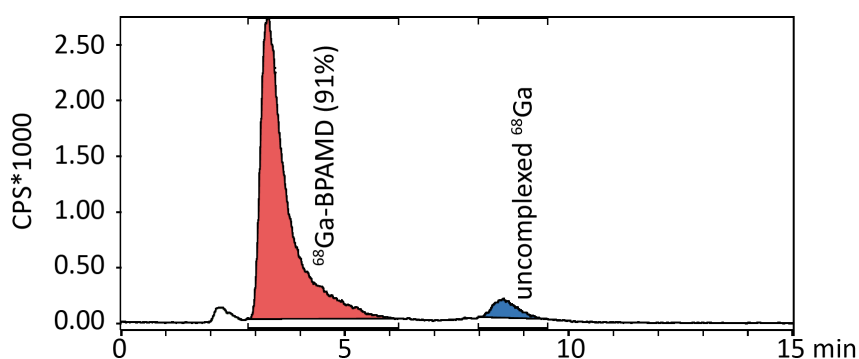


Fig. 7: HPLC radioactivity chromatogram of the reaction mixture of [^{68}Ga]BPAMD (20 nmol BPAMD, 100 °C, 10 min); retention times: [^{68}Ga]BPAMD at 3.2 min, uncomplexed ^{68}Ga at 8.5 min

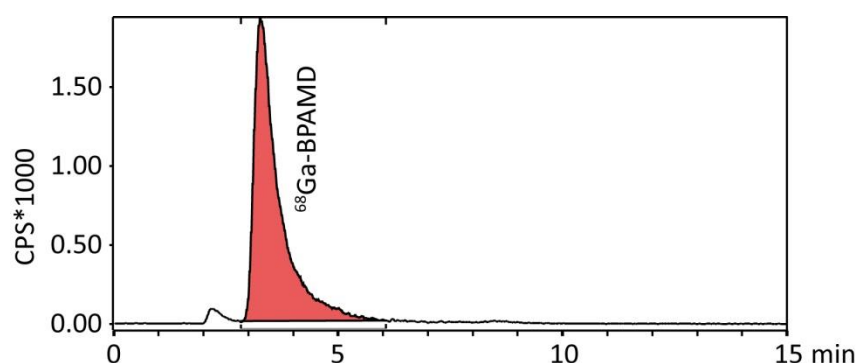


Fig. 8: HPLC radioactivity chromatogram of purified [^{68}Ga]BPAMD, radiochemical purity > 98 %

Hydroxyapatite Binding

Hydroxyapatite experiments showed binding of 81.5 ± 0.5 % for [^{68}Ga]BPAMD. Compared to former studies under the same conditions with the NOTA tri-phosphonate (NOTP) and an open chained phosphonate (EDTMP) the binding is lower than for [^{68}Ga]EDTMP (Fig. 9). However, due to very low *in vivo* stability of EDTMP [9], [^{68}Ga]BPAMD is more favourable.

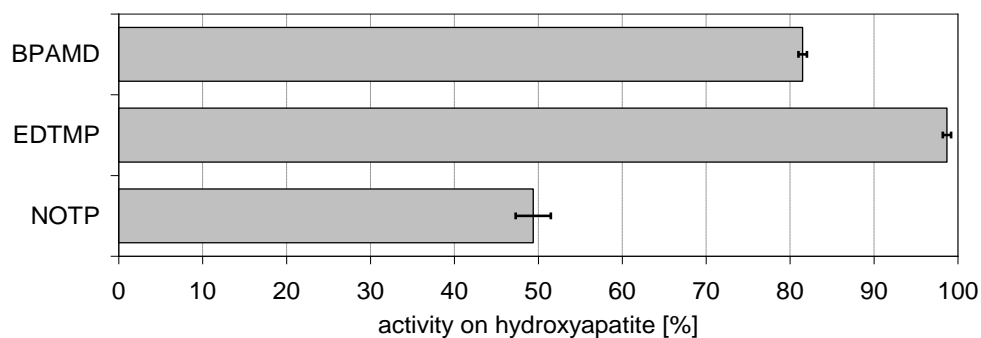


Fig. 9: binding of ^{68}Ga complexes (only ligands are given) to hydroxyapatite; comparison of BPAMD to ligands used in previous study (EDTMP, NOTP) [9]

Stability Study

Stability study of [^{68}Ga]BPAMD against 3 mg apo-transferrin revealed a decomposition of $9.1 \pm 0.6\%$ within 3 h at 37 °C. However, this decomposition was also present in PBS buffer under the same experimental conditions but with a lower value of $4.2 \pm 0.8\%$.

μ -PET Small Animal Study

Imaging the [^{68}Ga]BPAMD uptake in a healthy animal showed that the tracer is accumulated in bones most prominent in sections with a relatively high turnover of the bone matrix. Under physiological conditions rats show high remodelling activity in the joints. For this reason the [^{68}Ga]BPAMD accumulation was highest in the shoulder and along the backbone (Fig. 10). Compared to solid bones the activity in the joints of the vertebral column was higher by a factor of 2.49 (humerus), 2.88 (sternum) or 2.08 (scapula). These data indicate that the new tracer preferentially accumulates in metabolically active bone regions.

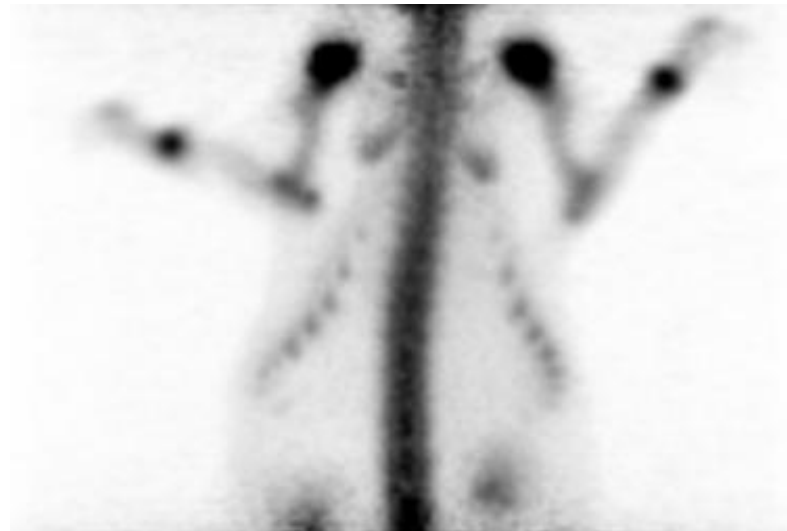


Fig. 10: Example of the tracer accumulation in bones of a healthy rat.

For the metastasis experiments Walker 256 cells were injected into the superficial caudal epigastric artery of the right leg of 7 animals. Within 2 weeks five of them developed a bone metastasis in the tibia (confirmed by histology after PET imaging) whereas 2 animals did not show any signs of tumour growth. All metastases were located in the proximal end or the shaft of the tibia. Using [^{68}Ga]BPAMD for PET imaging the tracer was accumulated within the metastases (Fig. 11). Compared to the contralateral tibia (which served as an intraindividual control) the accumulation in the metastatic lesion was 3.96 times higher.

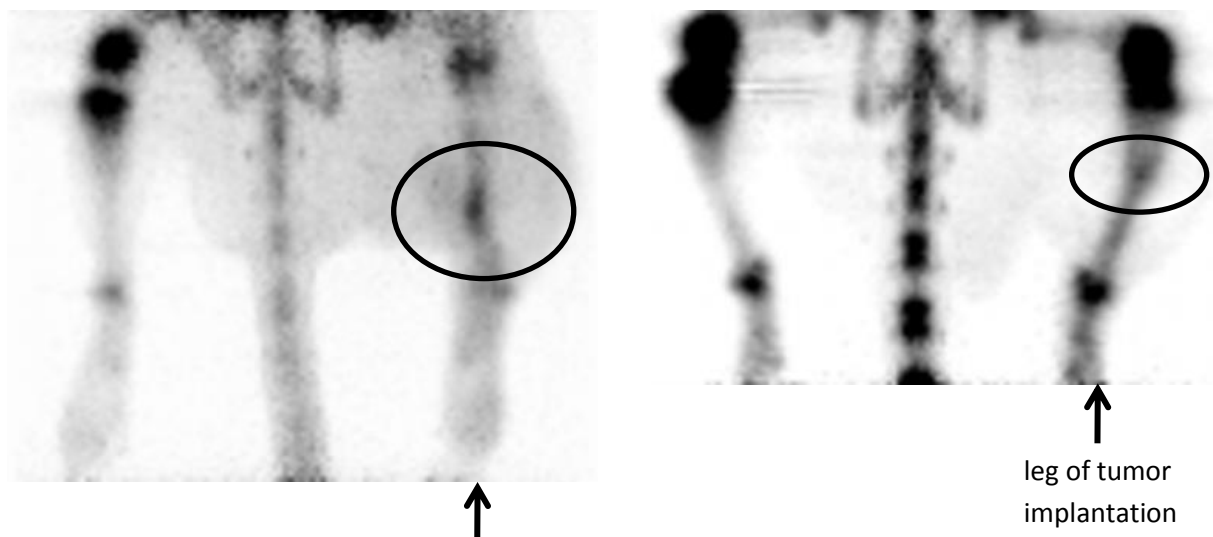


Fig. 11: Two examples of tracer accumulation in bone metastases (circles). Tumour cells were injected into the superficial caudal epigastric artery of the right leg. PET imaging was performed two weeks after tumour implantation.

Discussion

⁶⁸Ga-Complex formation, analysis and purification

Complex formation of [⁶⁸Ga]BPAMD is fast and results in high yields, however, it was not possible to gain the tracer in quantitative yield. Around 90% seems to be the maximum for 10 min reaction time with heating to 100 °C. Nevertheless the synthesis of [⁶⁸Ga]BPAMD is easy and followed by the purification method, the tracer can be obtained in 20-25 min starting from elution of the generator in 62% decay corrected yield, ready for further application. As important the fast and easy labelling procedure for a clinical adoption is, also the fast analysis and quality control of the final product is of great significance, not to have the product decaying while waiting for the analytics. Thus, the presented TLC and HPLC system, having the results ready in less than 10 min, is of great advantage.

Hydroxyapatite binding

Binding experiments with hydroxyapatite show a trend for the phosphonates and are an easy possibility to distinguish between compounds applicable for further studies for example in animals and those that will not be evaluated further. However, in literature one can find many different experimental setups [17-19]. Therefore this is only a hint for further experiments with a tracer like [⁶⁸Ga]BPAMD, it does not show any biological activity of the tracer, as it is proposed for the bisphosphonates, inhibiting the FPP synthase [10,14]. Under the same experimental conditions, this basic information indicates the purpose of additional experiments for a compound like [⁶⁸Ga]BPAMD.

Stability study

Investigation of the complex stability at 37 °C showed a small decrease over a time of 3 h in PBS buffer and against apo-transferrin. Nevertheless, this little decomposition of the [⁶⁸Ga]BPAMD is only of minor value (4.2 % in PBS; 9.1 % against apo-transferrin), if free ⁶⁸Ga will bind to transferrin *in vivo* which shows a fast blood clearance in general [20,21]. Therefore this slight decomposition is no problem for animal or human application.

μ -PET Small Animal Study

In the animal experiments it was shown that the new tracer basing on the macrocyclic bisphosphonate BPAMD labelled with ^{68}Ga is taken up into the bone especially in regions with a high remodelling activity. For this reason, in particular in the epiphysis of the bones close to joints and in the backbone high activity of the tracer was found. These regions could be visualized with a high spatial resolution (Fig. 10). The animal model used for induction of bone metastases by injecting tumour cells into the superficial caudal epigastric artery (a branch of the femoral artery) is known to lead to orthotopic metastases [22]. Using the cell line Walker 256 metastases were induced in 70% of the animals, a rate, which is comparable to previous results with the same model. In these experiments approximately 80% of the animals had osteolytic lesions, which were located mostly in the proximal shaft or the head of the tibia. For this reason, the animal model used is a realistic representation of bone metastases of breast or prostate cancers. It is important to point out that at the site of the bone tumour no additional injury was made leading to a forced remodelling in the bone. Activity changes in the bone were solely by the incorporation of the tumour cells.

In these experimental metastases the new tracer showed a significant accumulation (Fig. 11). In all animals exhibiting tumours in the leg, the lesions were clearly identifiable in the PET images. The relative activity of the tracer was approximately 4-times higher than in the cotralateral leg without a tumour. The imaging allowed to identify metastases with a diameter of 1-3 mm. These results clearly indicate that [^{68}Ga]BPAMD is suitable as a tracer for bone metastases in PET imaging.

Conclusion

Investigation of labelling kinetics of BPAMD with ^{68}Ga showed best efficiency at pH = 3-5 and 100 °C for 10 min with a radiochemical yield of 90 %. However, quantitative yield could not be achieved, therefore purification from uncomplexed ^{68}Ga was applied using strong cation exchanger columns. For quality control two systems by TLC and HPLC were developed, showing the high purity (>98 %) of the product [^{68}Ga]BPAMD in less than 10 min. Studies to hydroxyapatite revealed 81.5% binding of the tracer to the synthetic bone material. Decomposition of [^{68}Ga]BPAMD when challenged with transferrin was very small (9.1 % after 3h), leading to first *in vivo* experiments on a healthy rat with μ -PET. Images showed high accumulation on joints, implying high remodelling activity of these bone structures in rats. Consequently in further experiments Walker 256 carcinoma cells were injected on

the right leg of rats, developing osteolytic lesions, located mostly in the proximal shaft or the head of the tibia. Injection of [⁶⁸Ga]BPAMD and μ-PET imaging focused on the legs of the animals indicated high contrast between the bone lesion and healthy bone in the same animal (contrast factor = 3.96).

Finally [⁶⁸Ga]BPAMD is of great interest for nuclear medicine. By using the ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga generator the tracer can be obtained in a fast and easy process. Having the higher spatial resolution as well as quantification PET-technique is superior to SPECT with ^{99m}Tc-phosphonates and it is cyclotron independent.

Acknowledgement

Cooperation within COST D38 and COST BM0607 is gratefully acknowledged.

Literature

1. Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. *Cancer Statistics*, 2001. *CA Cancer J Clin.* 2001;51:15–36
2. Rubens RD. *Bone metastases--The clinical problem.* *Eur J Cancer.* 1998;34:210–3
3. Zettinig G, Dudczak R, Leitha T. *Nuklearmedizinische Diagnostik der Osteomyelitis.* *J Mineralstoffw.* 2003;10:20–3
4. C. L. Harmer CL, Burns JE, Sams A, Spittle M. *The value of fluorine-18 for scanning bone tumours.* *Clin Radiol.* 1969;20:204–12
5. Paula Gould. *Medical isotope shortage reaches crisis level.* *Nature.* 2009:312–3
6. James R. Ballinger. *⁹⁹Mo shortage in nuclear medicine: crisis or challenge?* *J Labelled Compd Rad.* 2010;53:167–8

-
7. Zhernosekov KP, Filosofov DV, Baum RP, Aschoff P, Bihl H, Razbash AA, Jahn M, Jennewein M, Rösch F. *Processing of Generator-Produced ^{68}Ga for Medical Application*. J Nucl Med. 2007;48:1741–8
 8. Asti M, Pietri G de, Fraternali A, Grassi E, Sghedoni R, Fioroni F, Roesch F, Versari A, Salvo D. *Validation of $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generator processing by chemical purification for routine clinical application of ^{68}Ga -DOTATOC*. Nuc Med Biol. 2008;35:721–4
 9. Fellner M, Riss P, Loktionova N, Zhernosekov KP, Thews O, Geraldès CFGC, Kovacs Z, Lukeš I, Rösch F. *Comparison of different phosphorus-containing ligands complexing ^{68}Ga for PET-imaging of bone metabolism*. Radiochim Acta. 2010 submitted
 10. Papapoulos SE. Bisphosphonates: how do they work? Best Pract Res Clin En. 2008;22:831–47
 11. Kubíček V, Rudovský J, Kotek J, Hermann P, Vander Elst L, Muller RN, Kolar ZI, Wolterbeek HT, Peters JA, Lukeš I. *A Bisphosphonate Monoamide Analogue of DOTA: A Potential Agent for Bone Targeting*. J Am Chem Soc. 2005;127:16477–85
 12. Vitha T, Kubíček V, Hermann P, Elst LV, Muller RN, Kolar ZI, Wolterbeek HT, Breeman WAP, Lukeš I, Peters JA. *Lanthanide(III) Complexes of Bis(phosphonate) Monoamide Analogues of DOTA: Bone-Seeking Agents for Imaging and Therapy*. J Med Chem. 2008;51:677–83
 13. Fellner M, Baum R, Kubíček V, Hermann P, Lukeš I, Prasad V, Rösch F. *PET/CT imaging of osteoblastic bone metastases with ^{68}Ga -bisphosphonates: first human study*. Eur J Nucl Med Mol Imag. 2010;37:834-834
 14. Ebetino FH, Rozé CN, McKenna CE, Barnett BL, Dunford JE, Russell RGG, Mielsing GE, Rogers MJ. *Molecular interactions of nitrogen-containing bisphosphonates within farnesyl diphosphate synthase*. J Organomet Chem. 2005;690:2679–87
 15. United Kingdom Co-ordinating Committee on Cancer Research (UKCCCR) *Guidelines for the Welfare of Animals in Experimental Neoplasia* (Second Edition). Br J Cancer. 1998;77:1–10
 16. Kostenuik PJ, Singh G, Suyama KL, Orr FW. *A quantitative model for spontaneous bone metastasis: evidence for a mitogenic effect of bone on Walker 256 cancer cells*. Clin Exp Metastasis. 1992;10:403–10
-

17. Mitterhauser M, Toegel S, Wadsak W, Lanzenberger RR, Mien L, Kuntner C, Wanek T, Eidherr H, Ettliger DE, Viernstein H, Kluger R, Dudczak R, Kletter K. *Pre vivo, ex vivo and in vivo evaluations of [⁶⁸Ga]-EDTMP*. Nuc Med Biol. 2007;34:391–7
18. Försterová M, Jandurová Z, Marques F, Gano L, Lubal P, Vanek J, Hermann P, Santos I. *Chemical and biological evaluation of ¹⁵³Sm and ¹⁶⁶Ho complexes of 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetrakis(methylphosphonic acid monoethylester) (H4dotpOEt)*. J Inorg Biochem. 2008;102:1531–40
19. Okamoto Y. *Accumulation of technetium-99m methylene diphosphonate: Conditions affecting adsorption to hydroxyapatite*. Oral Surg Oral Med O. 1995;80:115–9
20. Brunetti A, Blasberg RG, Finn RD, Larson SM. *Gallium-transferrin as a macromolecular tracer of vascular permeability*. Int J Rad Appl Instr. Part B. Nucl Med Biol. 1988;15:665–72
21. Ferreira CL, Lamsa E, Woods M, Duan Y, Fernando P, Bensimon C, Kordos M, Guenther K, Jurek P, Kiefer GE. *Evaluation of Bifunctional Chelates for the Development of Gallium-Based Radiopharmaceuticals*. Bioconj Chem. 2010;21:531–6
22. Bäuerle T, Adwan H, Kiessling F, Hilbig H, Armbruster FP, Berger MR. *Characterization of a rat model with site-specific bone metastasis induced by MDA-MB-231 breast cancer cells and its application to the effects of an antibody against bone sialoprotein*. Int. J. Cancer. 2005;115:177–86

3.6 PET/CT imaging of osteoblastic bone metastases with ^{68}Ga -bisphosphonates: first human study

PET/CT imaging of osteoblastic bone metastases with ^{68}Ga -bisphosphonates: first human study

**M. Fellner¹, R. P. Baum², V. Kubíček³, P. Hermann³,
I. Lukeš³, V. Prasad², F. Rösch¹**

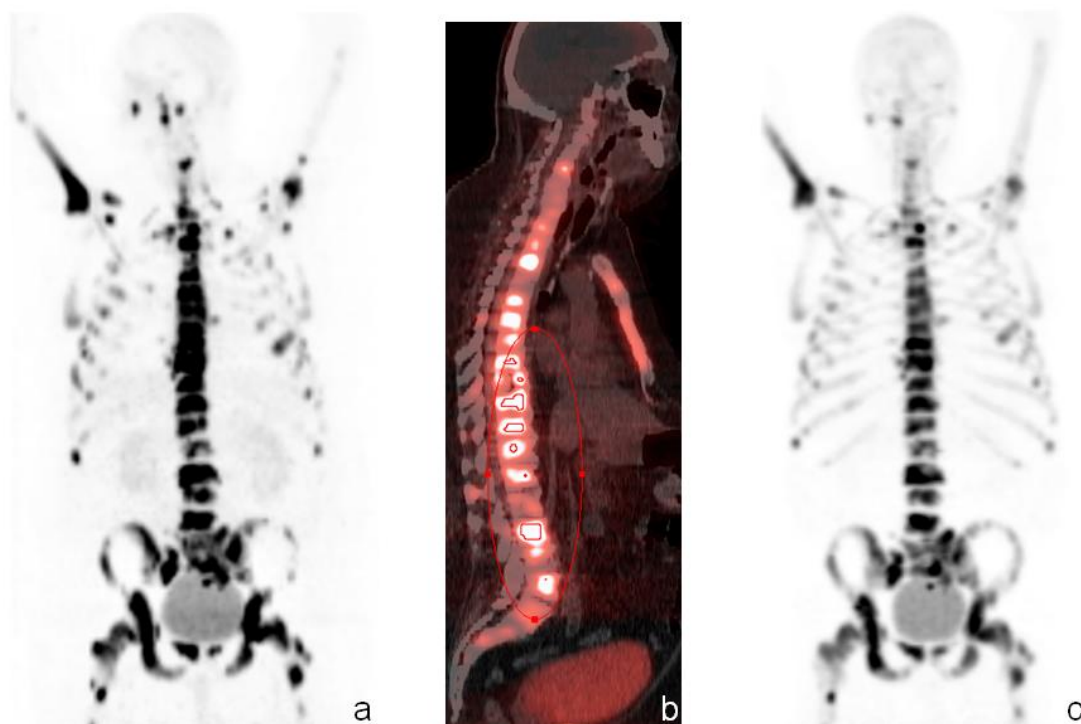
¹ Institute of Nuclear Chemistry, Johannes Gutenberg University Mainz, Germany

² Department of Nuclear Medicine, Center for PET/CT, Zentralklinik Bad Berka, Germany

³ Department of Inorganic Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Czech Republic

Bisphosphonates are well established ligands for $^{99\text{m}}\text{Tc}$ for planar and SPECT/CT imaging of osteoblastic metastases. A novel DOTA-based bisphosphonate, (4-[[bis-(phosphonomethyl) carbamoyl]methyl]-7,10-bis(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododec-1-yl)acetic acid (BPAMD) [1, 2], was labelled using the $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generator-derived positron emitter ^{68}Ga [3], resulting in the PET tracer [^{68}Ga]BPAMD.

[^{68}Ga]BPAMD was injected i.v. into a patient with known extensive bone metastases of prostate cancer. [^{68}Ga]BPAMD [maximum intensity projection (MIP) 50 min post-injection (p.i.), 462 MBq] revealed intense accumulation in multiple osteoblastic lesions in the central skeleton, ribs and proximal extremities: a = coronal PET, b = sagittal PET/CT. For comparison, c shows [^{18}F]fluoride PET (sagittal, MIP 90 min p.i., 270 MBq). Metastases were detected in the whole skeleton with a maximal standardized uptake value (SUV_{max}) of 77.1 and 62.1 in the 10th thoracic and L2 vertebra vs 39.1 and 39.2 for ^{18}F -fluoride, respectively.



The advantages of this new bone imaging PET tracer are the very high target to soft tissue ratios and fast clearance, its ease of use and the generator-based availability of ^{68}Ga which becomes especially important in these days of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ shortage.

While [^{18}F]fluoride is adsorbed on bone surface and is related to blood flow, the bisphosphonate [^{68}Ga]BPAMD is taken up also by osteoclasts reflecting the farnesyl diphosphate synthase enzyme dynamics in the HMG-CoA reductase pathway. Since this pathway is mainly responsible for the osteoclastic bone destruction, [^{68}Ga]BPAMD may be superior in osteoclastic lesions.

Finally, [^{68}Ga]BPAMD seems to be an ideal PET/CT tracer to plan and monitor bisphosphonate therapy in several bone disorders like osteoporosis, osteitis deformans, bone metastases, multiple myeloma, osteogenesis imperfecta, etc. and also to monitor radionuclide therapy for palliation of bone pain.

Acknowledgments

Support by the EC through COST actions D38 and BM0607 is gratefully acknowledged.

References

1. Kubicek V, Rudovsky J, Kotek J, Hermann P, Vander Elst L, Muller RN, Kolar ZI, Wolterbeek HT, Peters JA, Lukes I. *A Bisphosphonate Monoamide Analogue of DOTA: A Potential Agent for Bone Targeting*. J. Am. Chem. Soc. 2005;127(47):16477–85
2. Vitha T, Kubicek V, Hermann P, Vander Elst L, Muller RN, Kolar ZI, Wolterbeek HT, Breeman WAP, Lukes I, Peters JA. *Lanthanide(III) complexes of bis(phosphonate) monoamide analogues of DOTA: bone-seeking agents for imaging and therapy*. J. Med. Chem. 2008;51(3):677–83
3. Zhernosekov KP, Filosofov DV, Baum RP, Aschoff P, Bihl H, Razbash AA, Jahn M, Jennewein M, Roesch F. *Processing of Generator-Produced ⁶⁸Ga for Medical Application*. J. Nucl. Med. 2007;48(10):1741–8

3.7 [¹⁷⁷Lu]BPAMD: therapy of bone metastases with a highly potent DOTA-conjugated bisphosphonate ligand also usable for quantitative imaging via PET/CT

[¹⁷⁷Lu]BPAMD: therapy of bone metastases with a highly potent DOTA-conjugated bisphosphonate ligand also usable for quantitative imaging via PET/CT

M. Fellner¹, R. P. Baum², V. Kubíček³, P. Hermann³, F. Rösch¹

¹ Institute of Nuclear Chemistry, Johannes Gutenberg University of Mainz, Mainz, Germany

² Department of Nuclear Medicine/Center for PET-CT, Zentralklinik Bad Berka, Bad Berka, Germany

³ Department of Inorganic Chemistry, Charles University, Prague, Czech Republic

Keywords: Lu-177, macrocyclic ligand, DOTA, bisphosphonate, bone metastases

Abstract

Purpose: Bone metastases are a serious aggravation for patients suffering from cancer. To live as normal as possible, palliative pain treatment for these patients as well as the prolonging of their life expectancy is of great importance. Therefore treatment of bone lesions with therapeutic radionuclides such as ¹⁷⁷Lu together with highly potent bone seeking ligands comes into focus of medicine.

Methods: The bisphosphonate DOTA-like ligand BPAMD was labelled with ¹⁷⁷Lu and investigated concerning stability depending on activity per volume as well as the usage of radical scavengers such as ethanol and gentisic acid. Finally it leads to a method for preparing therapeutic doses for application of [¹⁷⁷Lu]BPAMD, applied to a first human trial.

Results: BPAMD shows high radiochemical yields in complexation with ¹⁷⁷Lu. However the final complex exhibits very low stability at high activity concentrations (>4 GBq/mL). Therefore adding gentisic acid to the reaction and dilute the final product to <1 GBq/mL yielded the stable complex

[¹⁷⁷Lu]BPAMD with more than 95 % intact complex after 24 h. A first human application showed high accumulation on bone lesions together with fast blood clearance.

Conclusions: [¹⁷⁷Lu]BPAMD is of great interest for radionuclide therapy on bone metastases. The stable final product can be applied in many clinics, as the complexation as well as the stabilization is very convenient. Together with a PET scan with the similar [⁶⁸Ga]BPAMD, dosimetry calculations can be enhanced to yield a better treatment of patients.

Introduction

Bone metastases occur in many cases at an early stage of the tumour disease, however their symptoms are recognized rather late [1,2]. Hence a diagnosis of bone metastases in an early state together with a subsequent therapy is of great importance for patients.

Recently we described a diagnosis of bone lesions adopting a generator derived PET nuclide, namely ⁶⁸Ga ($T_{1/2} = 67.7$ min, 89 % positron branching), together with a macrocyclic bisphosphonate BPAMD [3,4] (4-[[bis-(phosphonomethyl) carbamoyl]methyl]-7,10-bis(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododec-1-yl)acetic acid, which was labelled in nanomolar scale with ⁶⁸Ga in water after 10 min heating at 100 °C, and has successfully been applied for first human application [5]. The ligand used is illustrated in Fig. 1.

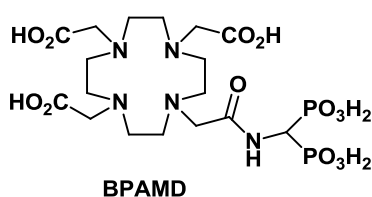


Fig. 1: macrocyclic bisphosphonate BPAMD investigated in this study

Bisphosphonates are known to show high and fast binding to apatite structures especially those of high biological activity [6] and are well established ligands for ^{99m}Tc-labelled SPECT tracers as well as some are directly used for therapy. In addition, bisphosphonates in general reveal a further benefit. Compounds like alendronate, risedronate or zoledronate do not only bind to the hydroxyapatite structure of the bone, they are also interacting in the HMG CoA reductase pathway and are inhibiting the farnesyl diphosphate synthase (FPPS) [6,7]. The bisphosphonates may mimic pyrophosphates and

thus inhibit the FPPS meaning that bisphosphonates have a biochemical target and not only a physical one by binding to hydroxyapatite. Therefore using a bisphosphonate ligand together with a therapeutic radionuclide appears to be of great interest.

Materials and Methods

Ligand BPAMD and Lutetium-177

BPAMD was prepared by published method [3,4] in previous studies. Lutetium-177 ($T_{1/2}=6.6$ d, mean β^- : 134 keV) was obtained from ITG Garching, where it was produced via the $^{176}\text{Yb}(n,\gamma)^{177}\text{Yb}\rightarrow^{177}\text{Lu}$ [8] reaction. All other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich and Merck.

[^{177}Lu]BPAMD complex formation

A stock solution of BPAMD (1 mg/mL water) was prepared and aliquots were used for labelling studies. ^{177}Lu labelling itself was performed in 250 μL 0.1 M sodium acetate by adding 200 μL $^{177}\text{LuCl}_3$ delivered in 0.04 M HCl, whereas the initial ^{177}Lu activity was diluted with 0.04 M HCl to yield different activity concentrations per volume (typically in GBq/mL). 10 μg (corresponding to 10 μL of stock solution) of BPAMD were added per GBq ^{177}Lu (ratio BPAMD: ^{177}Lu \sim 10:1). With a resulting pH of 5.2, the reaction mixture was heated for 30 min at 100 $^\circ\text{C}$.

Radioactive Analysis

Determination of radiochemical labelling yield and complex formation kinetics were carried out by TLC on Merck SG-60 silica plates developed with 0.25 M citrate buffer pH 4 using a Canberra Packard Instant Imager.

Stability study

The kinetics of decomposition of the ^{177}Lu -complex was monitored by TLC in the reaction mixture at room temperature. For further experiments ethanol (17 vol%) or gentisic acid (1 mg) was added as potential radical scavenger immediately after the reaction time of 30 min. In more detail, the addition of gentisic acid was investigated screening amounts of 0.01-2 mg, as well as the impact of gentisic acid addition prior to the labelling reaction.

Human Therapy Study

In a first in human trial a 71 year old male patient suffering from osseous metastases from a prostate carcinoma he was injected a typical therapeutic dose of 5 GBq of [^{177}Lu]BPAMD, prepared by the described method. SPECT images were taken 22 h post injection. A second trial was conducted with a 70 year old male patient. Here SPECT images were taken 0.5 h, 3 h and 23 h post injection.

Results

Complex formation, Analysis and Decomposition

The synthesis of [^{177}Lu]BPAMD yields almost quantitative complex formation (>97 %) after 30 min at 100 °C. However, especially at high activity volume concentrations (GBq/mL), the complex is not stable over time (cf. Fig. 2). For 15 GBq/mL there was no [^{177}Lu]BPAMD intact after 24 h (98.6 % of uncomplexed ^{177}Lu), and even for 1 GBq/mL it decreased to 70.4 % of [^{177}Lu]BPAMD.

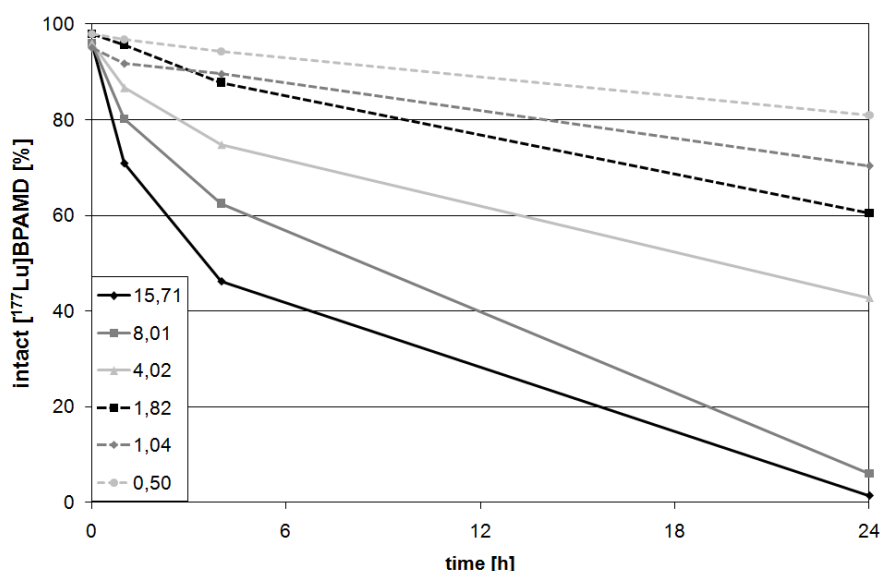


Fig. 2: Stability of [^{177}Lu]BPAMD by time depending on activity volume concentration [GBq/mL]

Therefore the influence of the known radical scavengers ethanol (17 Vol%) and gentisic acid (1 mg) was investigated. In the case of medium to high activity concentrations of 0.8 to 3.8 GBq/mL, indeed the addition of these stabilizing agents prevents the decomposition of the ^{177}Lu -complex partly (cf. Fig. 3), however not to a satisfying level. For ethanol at a ^{177}Lu activity concentration of 1.06 GBq/mL, the fraction of [^{177}Lu]BPAMD decreased to 85.0 % after 1 day. With gentisic acid the effect is even more promising, showing 88.5 % of intact complex after 24 h.

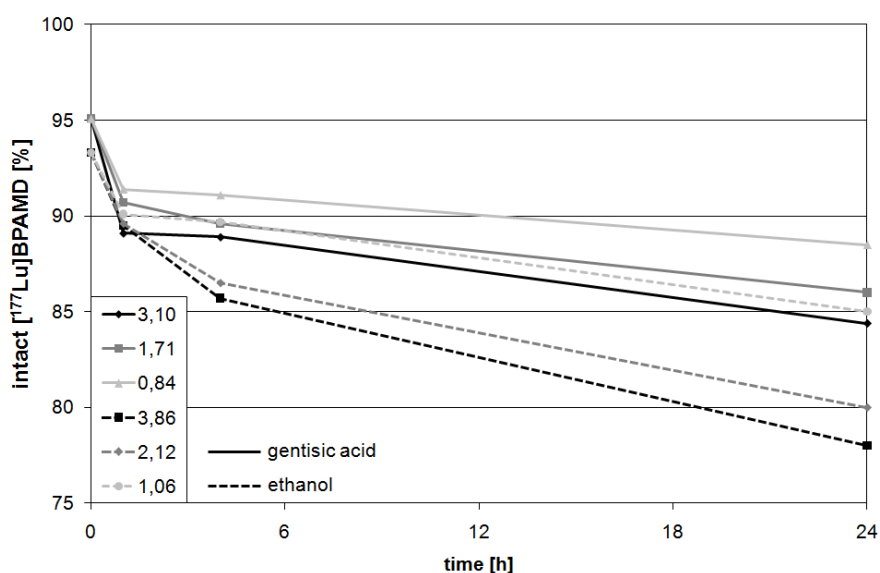


Fig.3: Stability of [^{177}Lu]BPAMD by time depending on activity volume concentration [GBq/mL] and on addition of stabilizing agents (gentisic acid, ethanol)

Nevertheless, the lower limit for a human application would be 95 % after 24 h. Further experimental setup thus investigated different amounts of gentisic acid (0.01-2 mg) and the effect of adding the scavenger prior (cf. Fig. 4) or after the complex formation reaction (cf. Fig. 5). These studies showed improved results at activity concentration of 1.07 GBq/mL. The stability of [^{177}Lu]BPAMD was checked for up to 72 h and found to be stable (95 % after 72 h) using adding 1 mg gentisic acid prior to the reaction. For lower amounts of gentisic acid (<0.5 mg) the stability of the product in both experiments adding the radical scavenger prior and after the reaction is not sufficient for human application of a therapeutic agent. For 1 mg gentisic acid there is almost no difference compared to the use of 0.5 mg. In general the addition of gentisic acid prior the the complex formation yields higher stability over time of 1 – 4 % compared between the two experiments evolving the same amounts of gentisic acid.

Interestingly, adding 2 mg gentisic acid prior to the complex formation induced lower [^{177}Lu]BPAMD yields. This can be explained by a pH drop of the reaction mixture (pH = 4.3, 1 mg gentisic acid corresponds to pH = 4.8, without gentisic acid pH = 5.2) and therefore it was not in the optimal range of the reaction pH. Moreover, there is no significantly improved effect of stabilisation in this case, especially as 0.5 mg is the lower limit for sufficiently stabilizing [^{177}Lu]BPAMD.

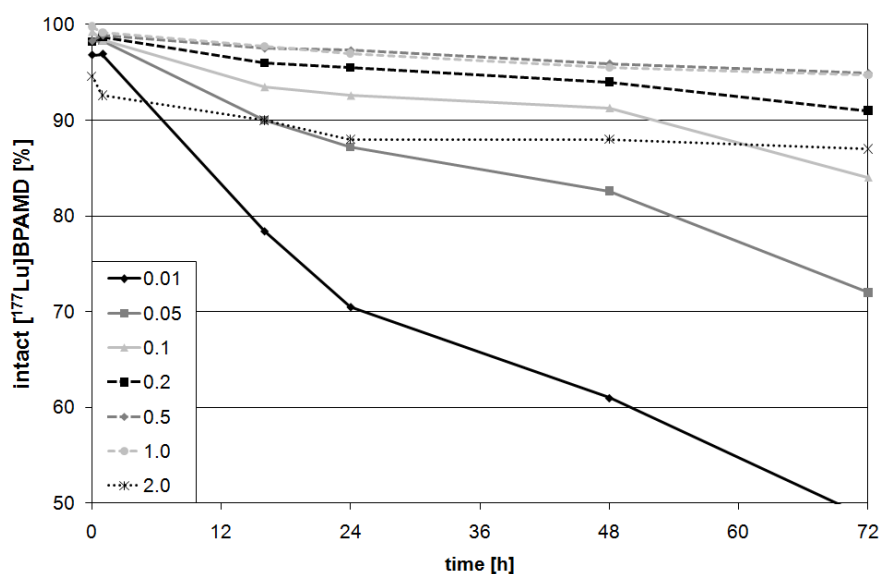


Fig. 4: Stability of [^{177}Lu]BPAMD up to 72 h depending on the amount of gentisic acid added (0.01-2 mg) prior to the complex formation with 1.07 GBq/mL.

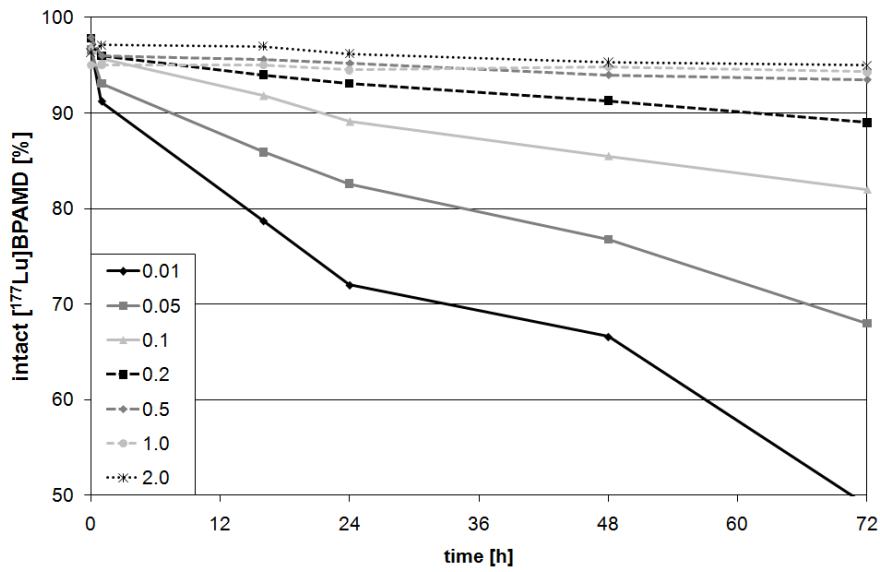


Fig. 5: Stability of [^{177}Lu]BPAMD up to 72 h depending on the amount of gentisic acid added (0.01-2 mg) after the complex formation with 1.07 GBq/mL.

Human Therapy Study

The patient with osseous metastases showed rapid accumulation of [^{177}Lu]BPAMD. The SPECT image taken 22 h post injection clearly demonstrates enrichment to bone lesions (c.f. Fig. 6).

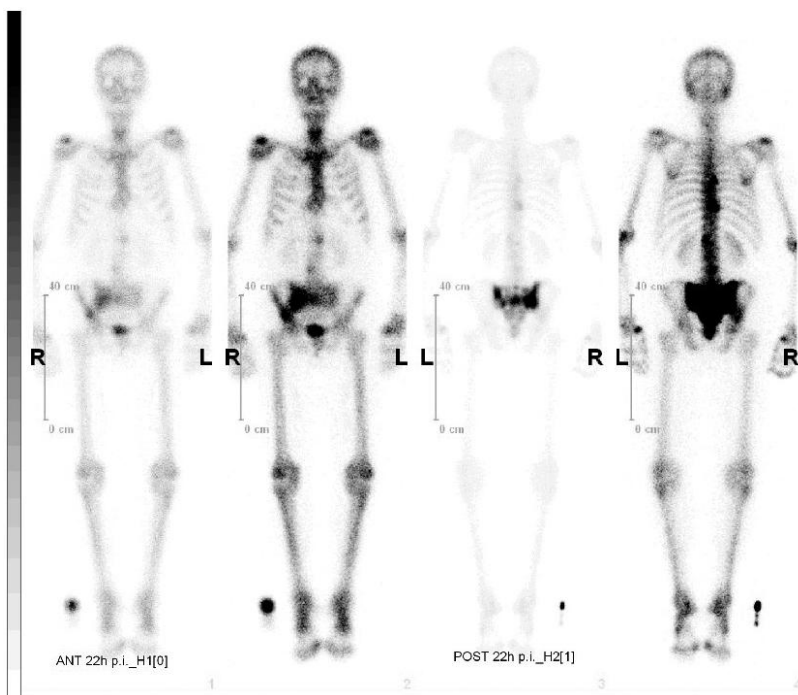


Fig. 6: first human trial with 5 GBq [^{177}Lu]BPAMD injected into a male patient suffering from osseous metastases using SPECT for imaging 22 h post injection.

The second patient also demonstrated rapid accumulation of [^{177}Lu]BPAMD and fast blood clearance. Already 3 h post injection, accumulation on bone lesions is evident, even enhancing the contrast 23 h post injection. (c.f. Fig. 7)

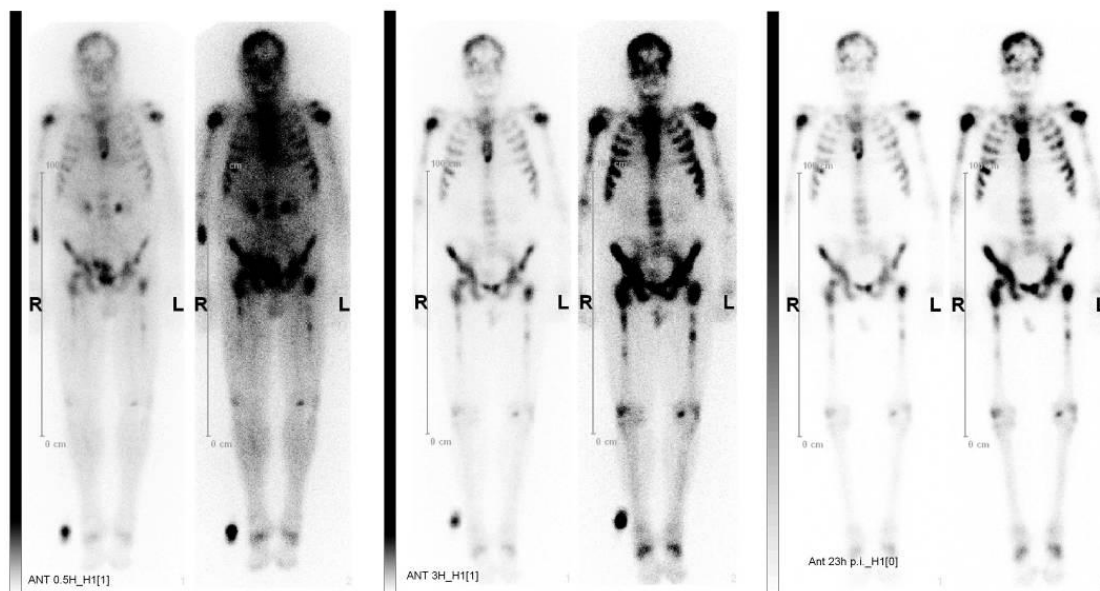


Fig. 7: second human trial with 5 GBq [^{177}Lu]BPAMD injected into a male patient using SPECT for imaging 0.5 h, 3 h and 22 h post injection.

Discussion

Complex Formation, Analysis and Decomposition

Complex formation of [^{177}Lu]BPAMD occurs within 30 min with almost quantitative yield. However, the complex was not stable over longer periods, in particular at ^{177}Lu activity volume concentrations >0.5 GBq/mL. Consequently, a stabilizing agent as radical scavenger had to be added. Here gentisic acid was superior compared to ethanol at 17 Vol% and 0.01 – 2 mg concentrations, respectively. In addition, 1 mg of gentisic acid added prior to the syntheses appears to be superior to the post-synthesis addition with 97.0 % of [^{177}Lu]BPAMD intact after 24 h compared to 94.5 %. The use of 1 mg gentisic acid is more than the minimum amount of 0.5 mg investigated in the stability study, however 0.5 mg was the lower limit. To guaranty the stabilization 1 mg of gentisic acid is advised.

This all corresponds to activity concentrations of 1.07 GBq/mL. Knowing that lower activity concentrations together with radical scavengers help sufficiently to prevent the final compound from decompensation, the recommended concentration should be below 1.0 GBq/mL. This in turns means the lower the activity concentration is, the easier the stabilization of the product is. On the other hand to keep the volume low, the final procedure is as follows:

A typical starting activity of 15 GBq ^{177}Lu delivered in 200 μL 0.04 M HCl is added to a solution of 150 μg BPAMD (which corresponds to 150 μL of our stock solution) and 1 mg gentisic acid in 250 μL 0.1 M sodium acetate, heated for 30 min at 100 °C. Typical synthesis yields are 98.5 – 99.8 %.

After the reaction is finished, the mixture is diluted to 20 mL with saline. This leads to an activity concentration of 0.75 GBq/mL, which is in accordance to the dilution recommended above, and a volume, perfect for routine application in most clinics using automated syringe injection systems.

Human Therapy Study

Injection of a typical dose of 5 GBq [^{177}Lu]BPAMD into two male patients revealed high uptake on bone lesions. Together with a fast blood clearance a high contrast in SPECT as well as a low dosimetry to healthy organs can be achieved. Using the same ligand labelled with the positron emitter ^{68}Ga and applying PET-visualization and ^{177}Lu for therapy, dosimetry calculations for the patient can be improved.

Conclusion

The labelling of the DOTA-conjugated bisphosphonate bis-(phosphonomethyl) carbamoyl]methyl forms [^{177}Lu]BPAMD in high yield (>98 %) after 30 min of heating at 100 °C. By addition of 1 mg gentisic acid directly to the reaction mixture and following dilution to an activity volume concentration <1 GBq/mL after the reaction, the complex is stabilized. More than 95 % of the complex remain intact for at least 24 h. Consequently, this therapeutic agent was investigated in a human trial, showing high accumulation in bone lesions as well as fast blood clearance, yielding in high contrast SPECT images.

Acknowledgement

The authors thank ITG Garching for providing no-carrier-added ^{177}Lu for researching complex formation and stability study free of charge. Cooperation within COST D38 and COST BM0607 is gratefully acknowledged.

Literature

- 1 Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. *Cancer Statistics*, 2001. CA Cancer J Clin. 2001;51:15–36
- 2 Rubens RD. *Bone metastases - The clinical problem*. Eur J Cancer. 1998;34:210–3
- 3 Kubíček V, Rudovský J, Kotek J, Hermann P, Vander Elst L, Muller RN, Kolar ZI, Wolterbeek HT, Peters JA, Lukeš I. *A Bisphosphonate Monoamide Analogue of DOTA: A Potential Agent for Bone Targeting*. J Am Chem Soc. 2005;127:16477–85
- 4 Vitha T, Kubíček V, Hermann P, Elst LV, Muller RN, Kolar ZI, Wolterbeek HT, Breeman WAP, Lukeš I, Peters JA. *Lanthanide(III) Complexes of Bis(phosphonate) Monoamide Analogues of DOTA: Bone-Seeking Agents for Imaging and Therapy*. J Med Chem. 2008;51:677–83
- 5 Fellner M, Baum R, Kubíček V, Hermann P, Lukeš I, Prasad V, Rösch F. *PET/CT imaging of osteoblastic bone metastases with ^{68}Ga -bisphosphonates: first human study*. Eur J Nucl Med Mol Imag. 2010;37:834-834
- 6 Papapoulos SE. *Bisphosphonates: how do they work?* Best Pract Res Cl En. 2008;22:831–47
- 7 Ebetino FH, Rozé CN, McKenna CE, Barnett BL, Dunford JE, Russell RGG, Mielsing GE, Rogers MJ. *Molecular interactions of nitrogen-containing bisphosphonates within farnesyl diphosphate synthase*. J Organomet Chem. 2005;690:2679–87
- 8 Lebedev NA, Novgorodov AF, Misiak R, Brockmann J, Rösch F. *Radiochemical separation of no-carrier-added ^{177}Lu as produced via the process*. Appl Rad Isot. 2000;53:421–5

4 Zusammenfassung und Ausblick

4.1 p-Glykoprotein-Aktivität *in vivo* im Zusammenhang mit dem Versagen einer Chemotherapie

Legt man die Prognosen der WHO für die kommenden 20 Jahre zu Grunde, zeigt sich, dass die absolute Zahl der Tumorerkrankungen mit Todesfolge weiter steigen wird, wenn kein Durchbruch in der Therapie zu verzeichnen ist. Bisherige Therapiemodalitäten umfassen den operativen Eingriff, eine Strahlentherapie oder eine Chemotherapie. Vor allem für letzteres gilt festzustellen, dass jeder Patient unterschiedlich auf diese reagiert. So versagt die Chemotherapie in vielen Fällen, verursacht durch die Multi-Drug-Resistance (MDR). Die MDR, verursacht unter anderem durch eine Überexprimierung und -funktion von pGP in Malignomen, stellt somit eine wesentliche Komplikation in der Tumorthherapie dar. Die Identifizierung solcher Patienten und eine entsprechende Anpassung der Therapie an die gefundenen Ergebnisse sowie eine Verbesserung der Therapie durch gezieltes Regulieren der pGP-Aktivität sind somit wichtige Angriffspunkte für die eine Heilung oder palliative Therapie der Patienten.

Mit Hilfe neuer ^{68}Ga -markierter Schiff'sche-Base-Moleküle konnte das Verhalten von pGP untersucht werden. Hierzu wurden verschiedene Markierungsvorläufer dargestellt und in der Folge evaluiert. Aus der Literatur war die Markierung über den sekundären Markierungsvorläufer $^{68}\text{Ga}(\text{acac})_3$ bekannt, dies ist allerdings durch die kurze Halbwertszeit von ^{68}Ga nicht von Vorteil. So zeigten die dargestellten Schiff'schen Basen keinen Markierungserfolg unter Beachtung des Standardprotokolls zur Markierung von ^{68}Ga -DOTA-peptiden in 5 mL Wasser mit dem aufgereinigten Generatoreluat. Durch Zuhilfenahme eines 0,12 M HEPES Puffers im geeigneten pH-Bereich um 4,3 konnten hingegen ohne die Darstellung von $^{68}\text{Ga}(\text{acac})_3$ direkt im Puffer mit der ^{68}Ga -Fraktion des Generators die Schiff'schen Basen innerhalb von nur 10 min bei 80 °C in >92 % markiert werden, ausgenommen ein sterisch stark gehinderter Ligand, der eine geringere radiochemische Ausbeute von 55 % zeigte.

Anschließende *in vitro*-Untersuchungen der ^{68}Ga -Komplexe an pGP-exprimierenden Tumorzellen des Dunning Prostata-Karzinoms der Ratte (Sublinie AT 1) zeigten unter Einwirkung einer Blocksubstanz (Verapamil) für pGP, dass die Schiff'sche Base-Komplexe durch pGP transportiert werden mit unterschiedlicher Zellaufnahme, bedingt wohl im Wesentlichen durch die Lipophilie der Verbindungen.

Der Tracer [⁶⁸Ga]MFL6.MZ zeigte hier die besten Ergebnisse für weitere *in vivo*-Untersuchungen durch eine vielversprechende Anreicherung in den Tumorzellen (24,9%/34,5% natürlich/geblockt) und einen daraus resultierenden ausreichenden Kontrast. μ PET-Experimente an tumortragenden Ratten zeigten die Aufnahme in den Tumor und einen guten Kontrast zum Referenzgewebe im „Field of View“ während der Dynamikmessungen. So konnte auch das Blocken von pGP mit Verapamil *in vivo* beobachtet werden und ergab eine Erhöhung der der Tracerkonzentration von 30 %. In weiteren Untersuchungen konnten durch den Einsatz von [⁶⁸Ga]MFL6.MZ mehrere Studien zur Aktivitätsbeeinflussung von pGP durchgeführt werden. So konnte gezeigt werden, dass sich unter azidotischen Bedingungen im Tumor die Aktivität von pGP erhöhte und somit die gefundene Aktivität des Tracers im Zielgewebe sank (20% im Vergleich zum Referenztumor des gleichen Tieres). Dies entspricht dem Auftreten in vielen Tumoren, die durch glykolytischen Stoffwechsel vermehrt Milchsäure bilden und somit den Tumor-pH absenken. Durch die stärkere Aktivierung von pGP werden somit Substrate, unter die zahlreiche Chemotherapeutika fallen, maßgeblich aus den Tumoren abtransportiert.

Die Aktivierung von pGP durchläuft eine Signalkaskade. Die zwei MAP-Kinasen p38 und ERK1/2 spielen hierbei eine Rolle - wie groß diese *in vivo* ist, war jedoch bisher nicht bekannt. Durch weitere μ PET-Untersuchungen konnte hier gezeigt werden, dass die p38-MAPK einen größeren Einfluss auf die pGP-Aktivierung hat als die ERK1/2-MAPK. So war die Traceranreicherung bei einem Block der p38-MAPK um 70 % höher als im Vergleichstumor des gleichen Tieres, während für die ERK1/2-MAPK nur eine Erhöhung um 29 % gefunden wurde. Mit [⁶⁸Ga]MFL6.MZ konnte somit erstmals *in vivo* die Aktivierung von pGP beobachtet werden.

Darüber hinaus bietet der Tracer allerdings noch einen weiteren interessanten Angriffspunkt der pGP-Forschung. So kann auch die Chiralität einer Verbindung eine Rolle im Transportvermögen spielen. Auch die Schiff'schen Basen weisen als Metallkomplex eine Spiegelisomerie auf. Daher wurde der Einfluss der Chiralität auf den Transport durch pGP hin untersucht. So konnte das in der Markierung dargestellte Racemat von [⁶⁸Ga]MFL6.MZ mittels chiraler HPLC sowohl vom inaktiven Liganden abgetrennt, als auch die beide Isomere voneinander separiert werden. In *in vitro* Experimenten zeigte sich im Anschluss ein Unterschied in der Zellaufnahme mit 11,6 % für das (+)-Isomer gegenüber 14,4 % für das (-)-Isomer. Dies bedeutet, dass (+)-[⁶⁸Ga]MFL6.MZ offensichtlich stärker durch pGP transportiert als das (-)-Isomer. Weiterhin konnte durch Competition des (+)-Isomers mit dem freien Liganden gezeigt werden, dass nicht nur die Komplexe durch pGP transportiert werden, sondern auch der Ligand selbst ein Substrat für pGP darstellt. Erwartungsgemäß sollte in Biodistributionen der beiden Isomere an tumortragenden Ratten im Tumor eine geringere Anreicherung von (+)-[⁶⁸Ga]MFL6.MZ gegenüber seinem Spiegelbildisomer

gefunden werden. Die Experimente zeigten hingegen ein gegenteiliges Bild. So war die Anreicherung des (+)-Isomers in den meisten Organen, wie z.B. Blut, Milz, Niere und Tumor höher als die des (-)-Isomers. Lediglich in der Leber konnte für das (+)-Isomer ein niedrigerer Wert gegenüber dem (-)-Isomer gefunden werden mit 1,75 gegenüber 2,31 % ID/g Gewebe. Dies macht deutlich, dass das *in vitro*- nicht direkt auf ein *in vivo*-Modell übertragen werden kann. Hier müssen noch weitere Transportproteine beispielsweise aus der ABC-Familie oder der Gruppe der organischen Kationentransporter (OCT in der SLC 22 Familie) in Betracht gezogen werden für ein erweitertes Kompartiment-Modell. So zeigen die Ergebnisse deutlich, dass auch die Chiralität der Schiff'schen Basen und allgemein von pGP-Substraten in die Forschung mit einbezogen werden müssen.

Durch die gewonnenen Resultate kann nun auch nach neuen Chemotherapeutika gezielter gesucht werden, bzw. potentielle Kandidaten können mit Hilfe des Tracers evaluiert werden auf ihre Eigenschaft als Substrat für pGP. Durch kompetitive Zellstudien oder auch *in vivo*-Versuche können geeignete neue Zytostatika identifiziert werden, ohne deren Affinität zu pGP selbst zu kennen.

Für zukünftige Schiff'sche Basen, die eine weitere Untersuchung von pGP ermöglichen können, können einige Randbedingungen gefunden werden. Bisher wurden insgesamt folgende Verbindungen synthetisiert und evaluiert:

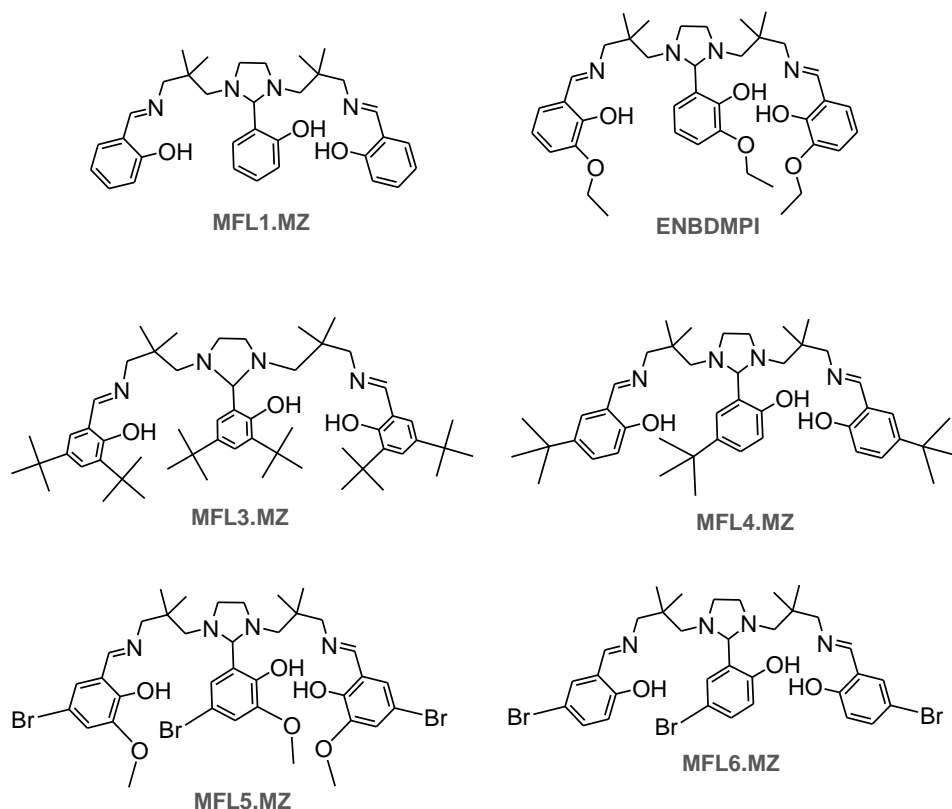


Abb. 20: Dargestellte Schiff'sche Basen zur Markierung mit ^{68}Ga

Die gezeigten Schiff'schen Basen wurden dabei ausschließlich am Aromaten variiert. So zeigte sich, dass bei fast identischer Lipophilie die Tracer [⁶⁸Ga]MFL4.MZ und [⁶⁸Ga]MFL6.MZ unterschiedlich stark in den Zellstudien aufgenommen wurden (5,0 % respektive 25,0 %). Dabei erfolgte die Substitution an der gleichen Stelle des Aromaten, so dass hier vor allem der Einfluss von Brom gegenüber eines Tertbutyl-Rests den Ausschlag gibt. Daher sollte in zukünftigen Verbindungen der Einfluss von Halogensubstituenten in para-Position zur Hydroxyfunktion näher untersucht werden, Brom hat hier offensichtlich eine große Bedeutung in der Aufnahme der Tracer in die Zelle. Von minderer Bedeutung scheint hingegen der Substituent an ortho-Position zur phenolischen Hydroxyfunktion. So zeigte [⁶⁸Ga]MFL5.MZ im Vergleich zu [⁶⁸Ga]MFL6.MZ, die sich um eine Methoxygruppe in ortho-Position unterscheiden, keine wesentliche Änderung der Zellaufnahme, sie ist sogar geringer (21,9 %) als für [⁶⁸Ga]MFL6.MZ obwohl [⁶⁸Ga]MFL5.MZ eine höhere Lipophilie besitzt (log D = 2,7 respektive 2,5 für [⁶⁸Ga]MFL6.MZ), was eine Zellaufnahme begünstigen sollte. Die Lipophilie der Verbindungen sollte weiterhin einen Wert von 3 nicht überschreiten, da für [⁶⁸Ga]MFL3.MZ hier eine sehr hohe Aufnahme in die Zelle gemessen wurde, es aber keinen Transport mehr durch pGP zeigt.

Neue Tracer können auch an der Grundstruktur der Schiff'schen Basen variiert werden. Grundbausteine sind hierbei immer Tetraamine, die anschließend mit Hydroxybenzaldehyden zu den Schiff'schen Basen umgesetzt werden. Durch Variation der Aminketten, kann der Einfluss dieser Substitutionsmuster auf das Transportvermögen von pGP hin untersucht werden. So stehen für zukünftige Evaluierungen und Verbesserung des pGP-Verständnisses weitere lineare Amine zur Verfügung. Die Darstellung dieser Amine ist in nachfolgendem Syntheschema dargestellt.

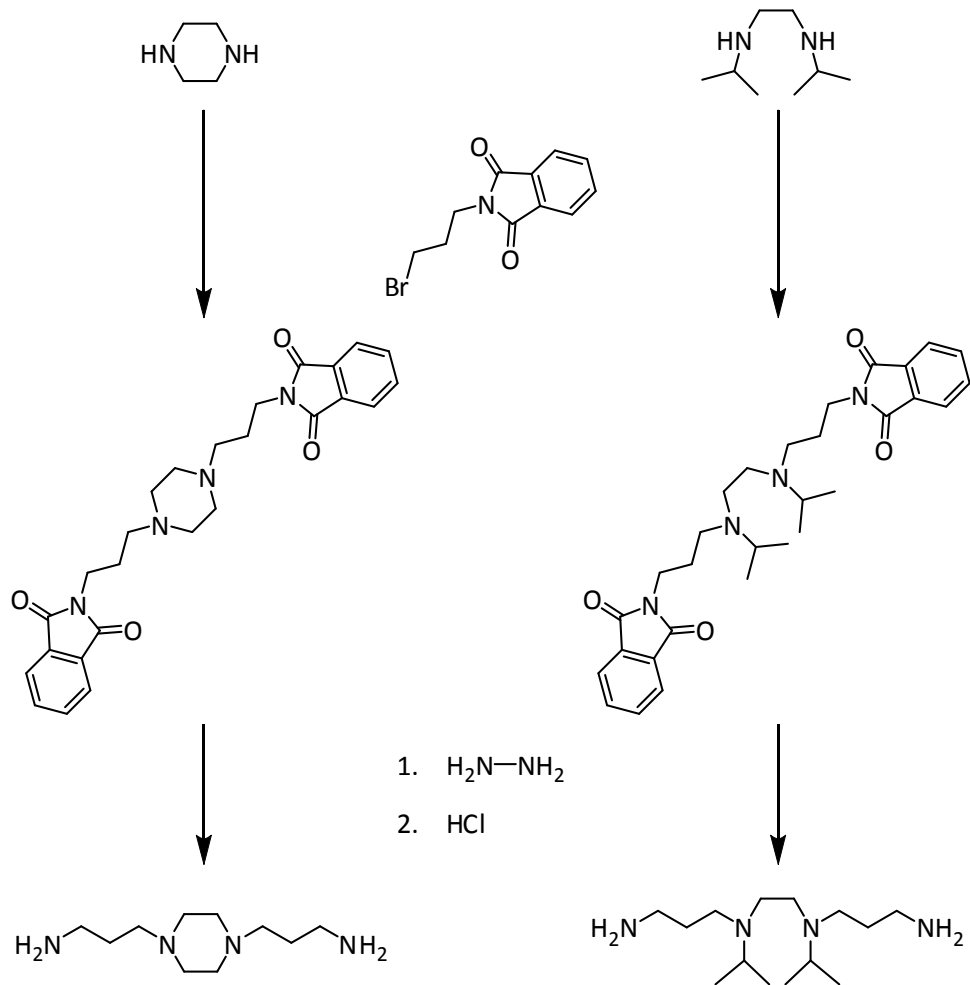


Abb. 21: Aufbau weiterer Tetraamgrundkörper zur Darstellung von Schiff'schen Basen

Dabei ist die Synthese und Aufreinigung der Amine das größte Problem, da der Verteilungskoeffizient bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion nach Entschützung mit Hydrazin aus Wasser mit Dichlormethan stark auf Seiten der wässrigen Phase liegt. Durch den Einsatz kontinuierlicher Extraktoren konnten die Tetraamine allerdings isoliert werden. Die nachfolgende Kopplung zu Schiff'schen Basen gleicht einer Click-Reaktion und läuft im Allgemeinen innerhalb weniger Minuten in Dichlormethan quantitativ ab.

Durch Kombination der gewonnenen Daten aus dem Substitutionsmuster der Aromaten und der Tetraamine können geeignete Liganden für zukünftige Untersuchungen dargestellt werden, die einerseits sehr gut in die Zellen aufgenommen, aber auch durch pGP transportiert werden. Bei allen Verbindungen dieser generellen N_4O_2 -Donorstruktur sollte die Chiralität der entstandenen ^{68}Ga -Komplexe allerdings berücksichtigt werden, wie die Ergebnisse gezeigt haben.

4.2 Diagnose und Therapie von Knochenmetastasen mittels ^{68}Ga und ^{177}Lu -markierter Phosphonate

Das zweite Projekt der Dissertation, die Diagnose und Therapie von Knochenmetastasen mittels ^{68}Ga - und ^{177}Lu -markierter Phosphonate, stellt einen wichtigen Ansatz für die palliative Therapie von Patienten dar. Knochenmetastasen sind eine massive Beeinträchtigung für den Patienten, durch Knochenschmerzen, Frakturen, Wirbelsäulenkompression und Hyperkalzämie wird das Leben der Patienten stark erschwert, vor allem da Knochenmetastasen selbst häufig erst sehr spät im Krankheitsverlauf erkannt werden, oftmals erst durch das Auftreten von schmerzenden Knochen beim Patienten. Durch eine frühzeitige Diagnose, vor allem bei Primärtumoren mit einer hohen Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Knochenmetastasen, könnte eine rechtzeitige Therapie die Lebensqualität der erkrankten Menschen verbessern. Der Standard in der Diagnose sind bisher $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Phosphonate für die SPECT. Ziel war es daher die verbesserte räumliche wie zeitliche Auflösung der PET zusammen mit der Möglichkeit der Quantifizierung der Daten durch Einsatz von ^{68}Ga -Phosphonaten für die Kliniken zu erforschen.

Einfache Phosphonate wie EDTMP und DOTP oder die NOTA-Phosphonat Derivate zeigten, dass solche Phosphonate im Allgemeinen leicht mit ^{68}Ga Komplexe ausbilden, lediglich DOTP lieferte hier nur radiochemische Ausbeuten von 51 %. Bindungsversuche an Apatit verdeutlichten schnell einige Grundvoraussetzungen für die Affinität zu Knochenstrukturen. Die NOTA-Phosphonate zeigten eine steigende Bindung an Apatit in Abhängigkeit der steigenden Zahl der Phosphonatgruppen. Jedoch wurde auch ersichtlich, dass Phosphonat-Funktionalitäten, die zur Komplexbildung des ^{68}Ga benötigt werden, nicht für die Bindung an Apatit zur Verfügung stehen und daher keine favorisierte Struktur darstellen. DOTP und EDTMP hingegen zeigten hohe Bindung an Apatit und wurden anschließend *in vivo* an gesunden Ratten untersucht. Durch die deutliche höhere radiochemische Ausbeute von ^{68}Ga EDTMP gegenüber ^{68}Ga DOTP mit 92 % respektive 51 % wäre dieser Tracer interessanter für eine Anwendung. Jedoch zeigte sich schnell, dass der geformte Komplex *in vivo* nicht stabil ist und sich schnell zersetzt. Nur durch große Mengen inaktiven Ligand (>1,5 mg/kg Körpergewicht) konnte der Tracer stabilisiert werden. Ein offenkettiger Ligand wie EDTMP zeigt als Metallkomplex nicht ausreichende Stabilitäten *in vivo*, wie es auch für das therapeutische ^{153}Sm EDTMP mit einem $\log K=14,44$ berichtet wird [74,75]. So wurde gezeigt dass bei einer Stöchiometrie von 600:1 von Ligand zu Metall eine erhöhte Zersetzung des Tracers auftritt, bei einem Verhältnis von 7500:1, was bei den angegebenen Versuchen einer Injektion von 2,5 mg EDTMP pro kg Körpergewicht entspricht, konnte das Therapeutikum stabilisiert werden.

Hier sind makrozyklische Chelatoren zu bevorzugen, da sie sehr stabile Komplexe unter anderem mit ^{68}Ga formen können. Die in Abb. 22 gezeigten Liganden BPAMD, BPAPD und BPPED besitzen daher ein großes Potential, da sie einen makrozyklischen Kern sowie die sehr knochenaffinen Bisphosphonate enthalten. Der DOTA-Kern erweist hier generell eine ausreichend hohe Stabilität mit Gallium ($\log K = 21,33$ [76]). Die Kombination eines stabilen Chelators mit der Bisphosphonatstruktur stellt damit eine Analogie zu den vielfach verwendeten Bisphosphonaten $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{MDP}$, $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{DPD}$ und $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{HDEP}$ Tracern dar.

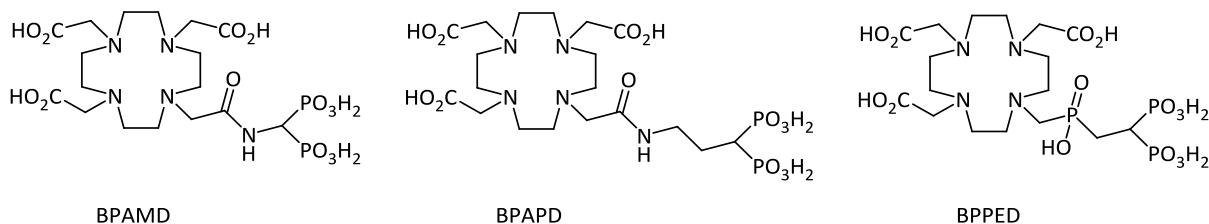


Abb. 22: Bisphosphonat-Liganden BPAMD, BPAPD und BPPED

Die Markierung der Liganden mit ^{68}Ga erfolgte nach dem Standardprotokoll in Wasser bei verschiedenen pH-Werten. Bei einem pH-Wert zwischen 3 und 4 konnten die Liganden BPAMD und BPAPD mit den höchsten zu erreichenden radiochemischen Ausbeuten von 89 % erfolgreich markiert werden. Der Ligand BPPED konnte erst bei einem pH-Wert von 5 zu 68 % mit ^{68}Ga komplexiert werden, wie Abb. 23 zeigt. Hier stellt das Phosphinat, das wahrscheinlich auch zur Komplexierung des Galliums beiträgt, das Hindernis für eine Markierung bei niedrigeren pH-Werten dar. Phosphonate benötigen höhere pH-Werte (normalerweise pH = 7-9) zur Komplexbildung, das beispielsweise auch von DOTP bekannt ist [77,78]. Dies deckt sich mit der in Abschnitt 3.4 untersuchten Komplexbildung von $[^{68}\text{Ga}]\text{DOTP}$, die auch bei einem pH-Wert von 4 lediglich Ausbeuten von 51 % lieferte.

Eine Abtrennung des noch freien ^{68}Ga aus der Reaktionslösung konnte für alle Komplexe mittels Fixierung auf einer Strata-X-C Kartusche realisiert werden, während die Phosphonatkomplexe den Kationenaustauscher passierten.

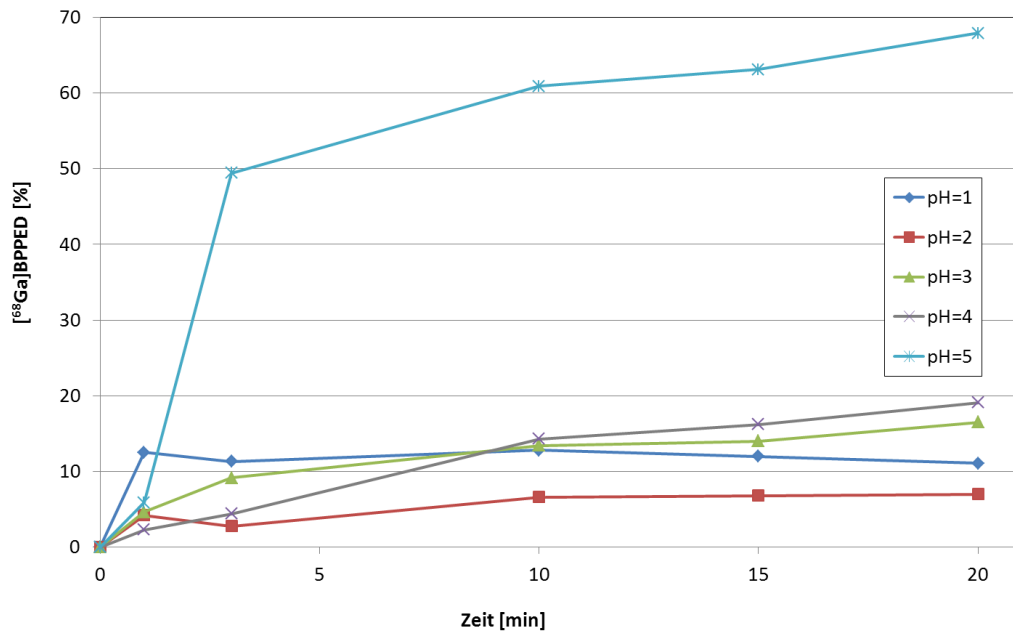


Abb. 23: Radiochemische Ausbeute von $[^{68}\text{Ga}]\text{BPPED}$ in Abhängigkeit des pH-Werts bei 100 °C

Bindungsversuche an Hydroxylapatit zeigten praktische keine Unterschiede der drei ^{68}Ga -Bisphosphonate in der Bindung an das synthetische Knochenmaterial mit Werten zwischen 79 % und 82 % gebunden an Hap.

Für biologische Studien wurde $[^{68}\text{Ga}]\text{BPPED}$ wegen der geringeren radiochemischen Ausbeute nicht weiter berücksichtigt. In einer ersten *in vivo*-Untersuchung wurden $[^{68}\text{Ga}]\text{BPAMD}$ und $[^{68}\text{Ga}]\text{BPAPD}$ verglichen, wobei $[^{68}\text{Ga}]\text{BPAMD}$ eine höhere Anreicherung an den Knochen im Tierversuch im Vergleich zum BPAPD Komplex zeigte. Bei beiden Tieren wurde jeweils am darauffolgenden Tag eine $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ PET-Aufnahme zum Vergleich durchgeführt.

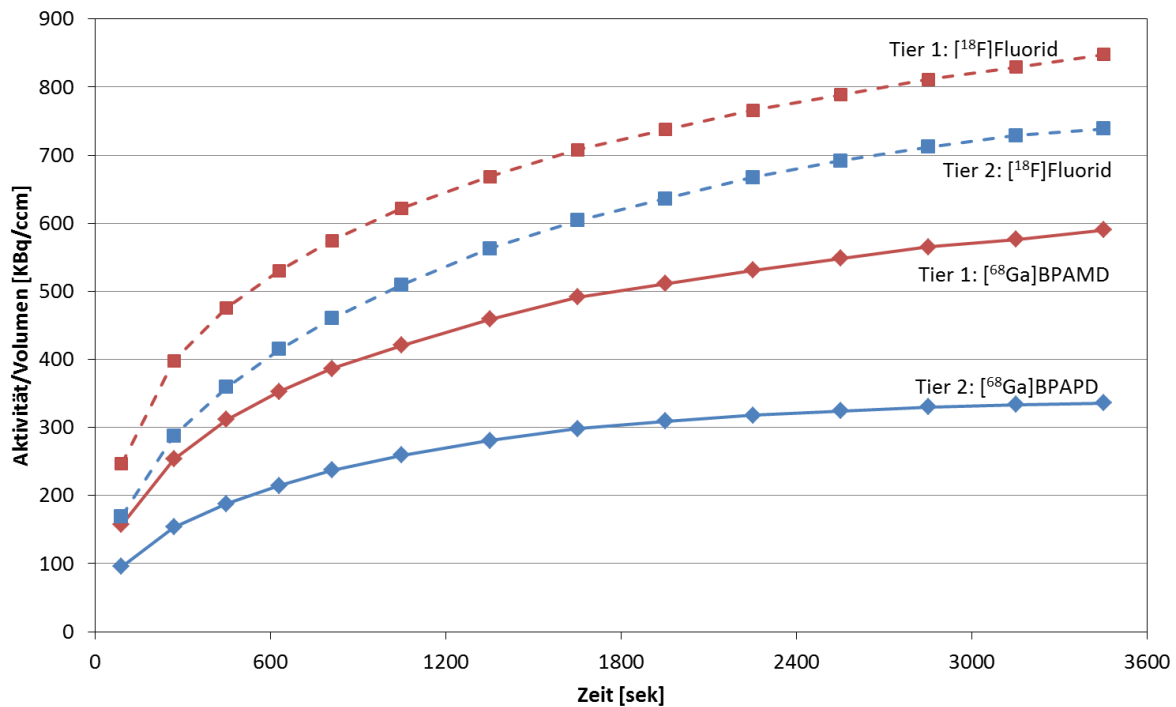


Abb. 24: Vergleich der Anreicherung von [⁶⁸Ga]BPAMD zu [¹⁸F]Fluorid und [⁶⁸Ga]BPAPD zu [¹⁸F]Fluorid im Knie zweier Versuchstiere

Bei gleichen injizierten Aktivitäten von 20-22 MBq des jeweiligen Tracers zeigt sich, dass im Knie als Referenzsystem die Bisphosphonate eine geringere Anreicherung zeigen als ¹⁸F-Fluorid. Für die ⁶⁸Ga-Bisphosphonate ist der Ligand BPAMD dem BPAPD überlegen. Vergleicht man das jeweilige Bisphosphonat mit ¹⁸F-Fluorid, zeigt sich, dass [⁶⁸Ga]BPAMD einen geringeren prozentualen Unterschied in der Anreicherung zeigt mit 590 kBq/ccm respektive 848 kBq/ccm für ¹⁸F-Fluorid (Faktor 1,4) gegenüber 336 kBq/ccm für [⁶⁸Ga]BPAPD im Vergleich zu 739 kBq/ccm für ¹⁸F-Fluorid (Faktor 2,2).

Weitere Evaluierungen *in vivo* wurden an Ratten mit Knochenmetastasen durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sich [⁶⁸Ga]BPAMD signifikanter an den Knochenmetastasen anreichte, während der gesunde Knochen nur eine geringe Aktivität des Tracers aufwies, wie Abschnitt 3.5 zeigt.

Diese Verbindung wurde in der Folge auch erstmals in einer Humanstudie in der Zentralklinik Bad Berka erprobt. Einem Patient, der zuvor ebenfalls eine [¹⁸F]Fluorid-Scan sowie eine [¹⁵³Sm]EDTMP-Therapie durchlaufen hat, wurde der Tracer appliziert und die Daten mittels PET aufgenommen. Die hervorragenden Aufnahmen zeigten eine nahezu identische Qualität und Aufnahme wie das

[¹⁸F]Fluorid, allerdings wurde in einigen ausgewählten Bereichen der Wirbelsäule deutlich höhere SUV_{max} Wert für [⁶⁸Ga]BPAMD ermittelt im Vergleich zu [¹⁸F]Fluorid (77,1 und 62,1 im zehnten Brustwirbel und L2 Wirbel gegenüber 39,1 and 39,2). Somit konnte auch das klinische Potential dieses Tracers bewiesen werden. Weitere Human-Untersuchungen wurden am Klinikum Dresden durchgeführt. Hier zeigte sich vor allem der Vorteil des ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga-Generators. Im Zuge der weltweiten Verknappung an ⁹⁹Mo/^{99m}Tc kann der ⁶⁸Ga-Generator hier eine immer wichtigere Rolle spielen und z.B. durch [⁶⁸Ga]BPAMD den Mangel an ^{99m}Tc teilweise kompensieren.

Zusätzlich bietet der Ligand BPAMD einen weiteren Vorteil. Indem man das diagnostische Nuklid durch ein geeignetes therapeutisches wie ¹⁷⁷Lu ersetzt, kann mit einem Molekül sowohl PET-Diagnostik als auch Radionuklidtherapie durchgeführt werden.

Die Komplexbildung von ¹⁷⁷Lu mit BPAMD läuft in Acetatpuffer quantitativ. Dennoch ergab sich ein Stabilitätsproblem des Komplexes. Durch hohe Aktivitätsvolumenkonzentrationen (>4 GBq/mL) kam es zur Zerstörung des Komplexes innerhalb weniger Stunden, so dass beispielsweise bei 4,0 GBq/mL nach 24 h nur noch 43 % intakter Komplex vorhanden war. Für höhere Aktivitätskonzentrationen sank dieser Wert unter 10 %. Durch den Einsatz von Radikalfängern wie Gentisinsäure und einer Verdünnung der Reaktionslösung nach der Komplexbildung auf Aktivitätskonzentrationen <1 GBq/mL konnte eine Stabilisierung des [¹⁷⁷Lu]BPAMD auf mehr als 95 % intakter Komplex nach 24 h erreicht werden. Durch diese Maßnahme war es möglich, erste Patientenstudien durchzuführen. Hier zeigte sich mittels SPECT-Aufnahmen eine schnelle Beseitigung der Aktivität aus dem Blut bei gleichzeitiger Anreicherung an den Knochenmetastasen und geringer Dosis für gesunde Organe.

Durch den Einsatz des gleichen Liganden sowohl für die Bildgebung mittels ⁶⁸Ga-PET als auch für die Endoradiotherapie mit ¹⁷⁷Lu kann darüber hinaus die prätherapeutische Dosisberechnung verbessert werden.

Der Ligand BPAMD hat gezeigt, dass solche Bisphosphonate eine hervorragende Möglichkeit für die Diagnose und Therapie darstellen. An der Struktur des Liganden können allerdings noch Verbesserungen vorgenommen werden. So zeigen Hydroxybisphosphonate im Vergleich zu Bisphosphonaten höhere Anreicherungen am Knochen. Verschiedene ^{99m}Tc-, ¹⁸⁶Re- und auch ⁹⁰Y-Derivate zeigen hier für Therapie und Bildgebung sehr gute Ansätze [79,80,81,82].

Zur Anbindung solcher Zielstrukturen an geeignete Liganden sollten verschiedene aminfunktionalisierte Hydroxybisphosphonate dargestellt werden, um diese an bifunktionelle Chelatoren zu koppeln. Hier bietet sich z.B. die Isothiocyanatgruppe an, um so über einen Thioharnstoff das betreffende Amin anzubinden, wie BURCHARDT et al. gezeigt haben [83].

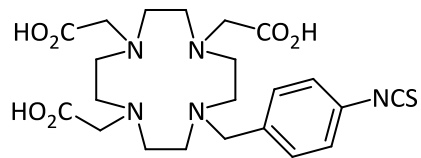


Abb. 25: Bifunktionaler Chelator DO3A-NCS

Ebenfalls auf Arbeiten von BURCHARDT et al. [83,84] basiert der Ansatz, zwei biologisch aktive Moleküle an ein DOTA-Molekül zu binden, was auch ein Ziel mit den Hydroxybisphosphonaten ist, um damit die Bindungsfähigkeit an Hydroxylapatit weiter zu verbessern.

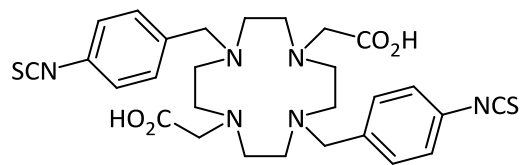


Abb. 26: Bifunktionaler divalenter Chelator DO2A-(NCS)₂

Die Synthese der in Abb. 27 gezeigten Verbindungen gelang noch nicht. So warf die eigentliche Kopplung der dargestellten Aminobisphosphonate an die Isothiocyanatgruppe viele Probleme auf und konnte abschließend nicht erfolgreich durchgeführt werden. Der Grund, warum diese Kopplung nicht funktionierte, bleibt dabei unklar. Möglicherweise muss der bifunktionelle Chelator immer wieder frisch synthetisiert werden, da sich mittels NMR eine zeitliche Zersetzung zeigte.

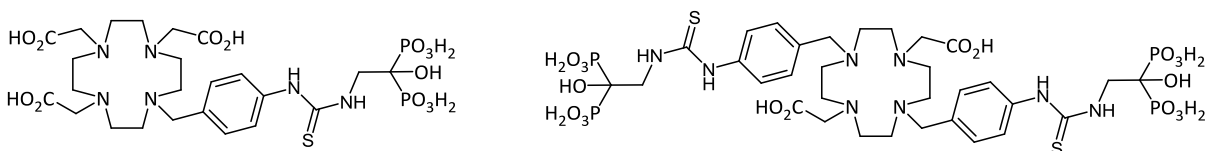


Abb. 27: Beispiele von Zielstrukturen der Hydroxybisphosphonate

Um diese Problematik zu umgehen, könnte der in Abb. 28 dargestellte Syntheseweg gewählt werden. So beinhalten die Zielverbindungen ein aromatisches System für die spätere Analytik und Aufreinigung mittels HPLC und setzen dabei auf Amidbindungen sowie die Reaktion von organischen Bromderivaten zur Anbindung der Hydroxybisphosphonate an den Cyclenring.

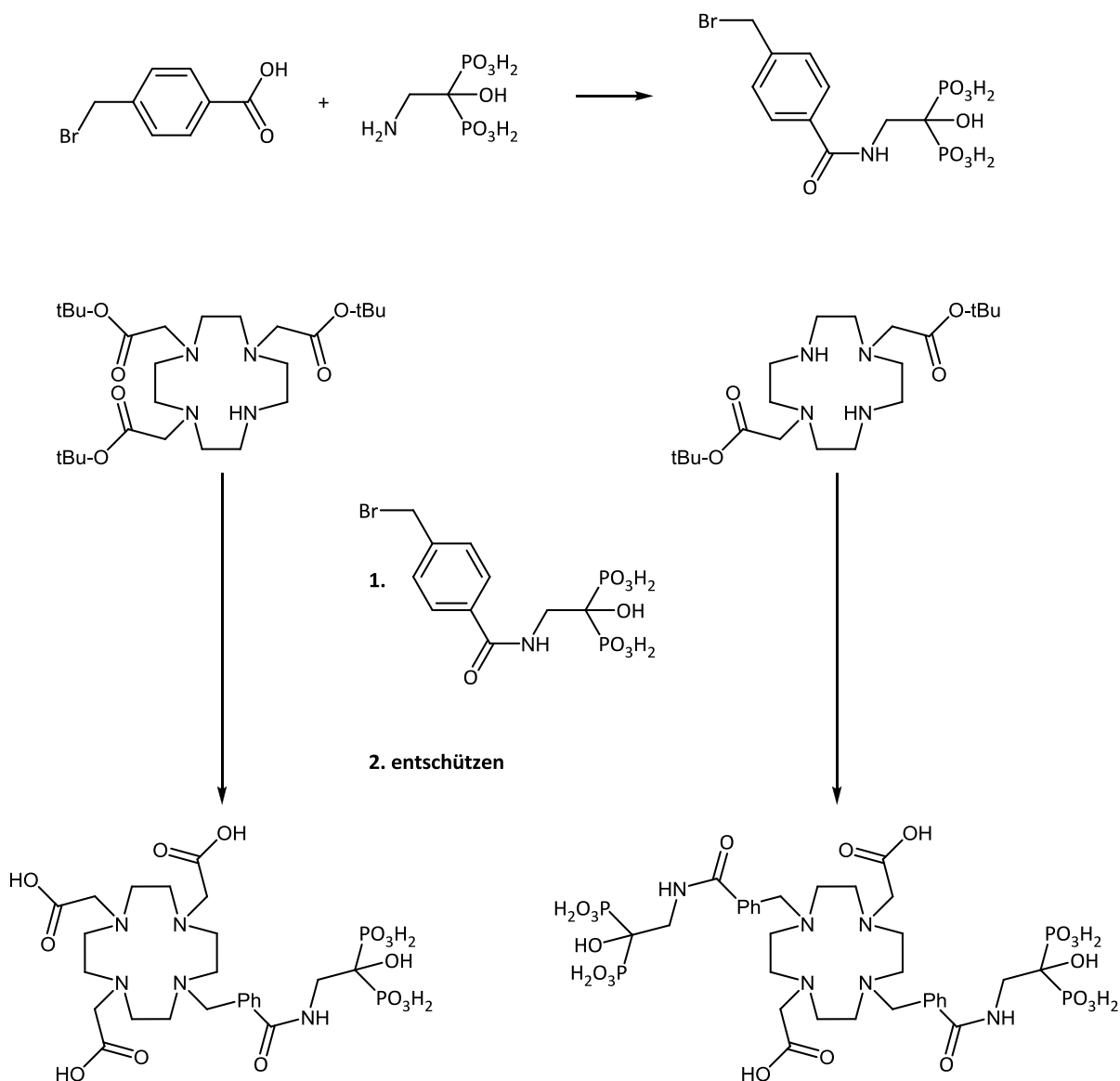


Abb. 28: Mögliche Syntheseroute für mono- und divalente DOTA-Hydroxybisphosphonate

4.3 Zusammenfassung

Krebs ist eine der großen Volkskrankheiten mit sehr unterschiedlicher Ausprägung, verschiedenem Krankheitsverlauf und stellt eine der wichtigsten medizinischen Herausforderungen des 21. Jahrhunderts dar. Die Therapie und Heilung der vielen Varianten von Malignomen steht hierbei im Vordergrund für eine effizientere Gesundheitsversorgung und Verbesserung der Lebensqualität der Patienten. Essentiell für die erfolgreiche Therapie ist eine frühzeitige und aussagekräftige Diagnose. Hierbei kommen der $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generator und das daraus resultierende PET-Nuklid ^{68}Ga immer stärker in den Fokus von Wissenschaft und Medizin.

Die vorliegende Dissertation hat sich mit zwei ausgewählten, wesentlichen, klinisch relevanten Aspekten beschäftigt.

Die Entwicklung ^{68}Ga -markierter Schiff'scher Basen erscheint vielversprechend, die Funktionen des Transportproteins pGP aufzuklären. Dieses spielt eine wichtige Rolle in der Multi-Drug-Resistance und der damit verbundenen Resistenz einiger Tumore gegen eine Chemotherapie. Mit Hilfe des Tracers [^{68}Ga]MFL6.MZ konnte die Aktivitätsänderung von pGP unter verschiedener Beeinflussung erstmals *in vivo* beobachtet werden. So zeigte sich, dass sich unter azidotischen Bedingungen in Tumoren die Aktivität des pGP erhöht und somit vermehrt auch Zytostatika, die pGP-Substrate sind, aus den Tumoren transportiert werden. Durch Aufklärung der Abhängigkeit der pGP-Aktivität von dessen Signalkaskade konnte gezeigt werden, dass durch eine Blockade der MAP-Kinase p38 eine Erniedrigung der pGP-Aktivität zu verzeichnen ist. Die ebenfalls in der Signalkaskade eingebundene MAP-Kinase ERK1/2 hingegen spielt hier nur eine untergeordnete Rolle wie *in vivo* Versuche mit [^{68}Ga]MFL6.MZ aufwiesen. Ziel weiterer Anwendungen könnte hier das gezielte Ausschalten oder Einschränken der pGP-Aktivität während einer Chemotherapie sein. Mit Hilfe der gewonnenen Ergebnisse können nun einerseits neue Substanzen zur Beeinflussung von pGP über die p38 MAPK gesucht werden, andererseits können durch Wettbewerbsversuche mit [^{68}Ga]MFL6.MZ neue Chemotherapeutika auf ihre Eigenschaft als pGP-Substrat hin untersucht werden.

Die Metastasierung eines Malignoms ist mit großen Belastungen und teils massiven Einschnitten in der Lebensqualität von Erkrankten verbunden. Befallen die Metastasen das Skelett eines Menschen, wird dies zumeist erst spät registriert. Eine frühzeitige Diagnose mit anschließender Therapie ist hier von großer Bedeutung. ^{68}Ga -markierte Bisphosphonate bieten nun eine Möglichkeit, Patienten quantitativ auf Knochenmetastasen hin untersuchen zu können. Zwar konnten einfache Phosphonate wie EDTMP und DOTP nicht die nötige *in vivo* Stabilität bzw. hohe radiochemische Ausbeuten liefern und sind damit für die Anwendung am Menschen uninteressant, aber die DOTA-basierten

Bisphosphonate allen voran der Ligand BPAMD zeigen hier ein großes Potential. So konnte in *in vivo*-Versuchen an Ratten mit Knochenmetastasen gezeigt werden, dass sich [^{68}Ga]BPAMD an den Metastasen anreichert und einen sehr guten Kontrast zum gesunden Knochen darstellt. Ein entsprechendes Syntheseprotokoll mit Qualitätskontrolle lieferte die Grundlage für erste Studien am Menschen. Der Tracer zeigte in ausgewählten Regionen eines Patienten eine höhere Anreicherung als eine zuvor durchgeführte PET-Aufnahme mit [^{18}F]Fluorid. Der Ligand BPAMD bietet außerdem den Vorteil, dass er neben ^{68}Ga auch therapeutisch relevante dreiwertige Radionuklide wie ^{177}Lu komplexieren kann. Durch den Zusatz des Radikalfängers Gentisinsäure und einer Verdünnung nach der Komplexbildungsreaktion wurde das Problem der Zersetzung von [^{177}Lu]BPAMD gelöst und ermöglichte ebenfalls die klinische Anwendung des Therapeutikums. Es zeigte sich, dass dieses schnell aus dem Blutkreislauf entfernt wird und sich an den Knochenmetastasen anreichert. So ist es nun möglich, abseits eines Zyklotrons zur [^{18}F]-Produktion Knochenmetastasen mittels ^{68}Ga -PET zu diagnostizieren, eine entsprechende Dosisberechnung anzustellen und anschließend mit dem gleichen Liganden eine Therapie mit [^{177}Lu]BPAMD durchzuführen. Durch die Unkompliziertheit der Verwendung des $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generators kann diese Diagnose an jedem Ort der Welt mit einem Radionuklidlabor durchgeführt werden.

4.4 Literatur

- [74] Bai H, Jin H, Fan H, Du J, Wang F, Chen D, Cheng Z. *Study on analysis of ^{153}Sm -EDTMP stability in vitro and vivo by HPLC.* J. Radioanal. Nucl. Chem. (1998), 236, 87-95
- [75] Jarvis NV, Wagener JM, Jackson GE. *Metal-ion speciation in blood plasma as a tool for elucidating the in vivo behavior of radiopharmaceuticals containing ^{153}Sm and ^{166}Ho .* Dalton Trans. (1995), 9, 1411-5
- [76] *Handbook of Radiopharmaceuticals: Radiochemistry and Applications.* Edited by Michael J. Welch, 2003 John Wiley & Sons, Ltd. ISBN: 0-471-49560-3
- [77] Das T, Chakraborty S, Unni PR, Banerjee S, Samuel G, Sarma HD, Venkatesh M, Pillai MRA. *^{177}Lu -labeled cyclic polyaminophosphonates as potential agents for bone pain palliation.* Appl. Radiat. Isot. (2002), 57, 177-84

- [78] Geraldine CFGC, Sherry AD, Kiefer GE. *The solution structure of Ln(DOTP)⁵⁻ complexes. A comparison of lanthanide-induced paramagnetic shifts with the MMX energy-minimized structure.* J. Magn. Reson. (1992), 97, 290-304
- [79] Ogawa K, Mukai T, Inoue Y, Ono M, Saji H. *Development of a Novel ^{99m}Tc-Chelate-Conjugated Bisphosphonate with High Affinity for Bone as a Bone Scintigraphic Agent.* J. Nucl. Med. (2006), 47, 2042-7
- [80] Ogawa K, Mukai T, Arano Y, Ono M, Hanaoka H, Ishino S, Hashimoto K, Nishimura H, Saji H. *Development of a Rhenium-186-Labeled MAG3-Conjugated Bisphosphonate for the Palliation of Metastatic Bone Pain Based on the Concept of Bifunctional Radiopharmaceuticals.* Bioconj. Chem., (2005), 16 (4), 751-7
- [81] Uehara T, Jin ZL, Ogawa K, Akizawa H, Hashimoto K, Nakayama M, Arano Y. *Assessment of ¹⁸⁶Re chelate-conjugated bisphosphonate for the development of new radiopharmaceuticals for bones.* Nucl.Med.Biol. (2007), 34, 79-87
- [82] Ogawa K, Kawashima H, Shiba K, Washiyama K, Yoshimoto M, Kiyono Y, Ueda M, Mori H, Saji H. *Development of [⁹⁰Y]DOTA-conjugated bisphosphonate for treatment of painful bone metastases.* Nucl.Med.Biol. (2009), 36, 129-35
- [83] Burchardt C, Riss PJ, Peters J, Rösch F. *Multigram scale synthesis of various functionalized, divalent DO2A-based chelators for ⁶⁸Ga-PET.* Bioconj.Chem. (2010), eingereicht
- [84] Rösch F, Riss P, Burchardt C. *Verbindung aus einem Metallion und einem Markierungsvorläufer mit zwei oder mehreren Targetingvektoren und Verwendung der Verbindung.* PCT Int. Appl. (2009), 40pp. CODEN: PIXXD2 WO 2009124764 A1 20091015

5 Anlage

5.1 Abkürzungsverzeichnis

% ID	% injizierte Dosis	KI	Kaliumiodid
μPET	Kleintier-PET	KO	Knock Out
ABC	ATP-Binding Cassette	KOH	Kaliumhydroxid
acac	Acetylaceton	L	Liter
ATP	Adenosinriphosphat	M	Molar
BHS	Blut-Hirn-Schranke	m	Multipllett
Bq	Bequerel	MAP	Mitogen-Activated Protein
bs	breites Singulett	MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
CAM	zelluläres Adhäsionsmolekül	MDP	Methylen-Diphosphonat
CDCl ₃	Deuteriochloroform	MDR	Multi-Drug Resistance
CPM	Counts Per Minute	MEK	Methylethylketon
CsA	Cyclosporin A	min	Minute
CT	Computer-Tomographie	MIP	Maximum Intensity Projection
d	Tag	MRP	Multidrug Resistance-Related Proteine
d	Dublett (NMR-Analytik)	MRT	Magnetresonanztomographie
D ₂ O	deutiertes Wasser	NaOH	Natriumhydroxid
DC	Dünnschichtchromatographie	NBD	Nukleotid-Bindungs-Domäne
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum	NH ₄ PF ₆	Ammoniumhexafluorophosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid	NMR	Nuclear Magnetic Resonance
DOTATOC	DOTA(0)-Phe(1)-Tyr(3)octreotid	Octreoscan	Eingetragene Marke eines Pentetreotids
DOTP/ DOTMP	1,4,7,10-tetraazacyclododecane- 1,4,7,10-tetra(methylene phosphonic acid)	OSEM	Ordered Subset Expectation Maximization
		PBS	Phosphate Buffered Saline
DPD	Diphosphon-Propan-Dicarbonsäure	PET	Positronen-Emissions-Tomographie
EDTMP	Ethylendiamin-tetra(methylenphosphorsäure)	pGP	p-Glykoprotein
EtOH	Ethanol	ppm	Chemische Verschiebung im NMR
eV	Elektronenvolt	q	Quartett
FCS	Fetal Calf Serum	RPMI	Spezielles Zellmedium
[¹⁸ F]FDG	[¹⁸ F]-2-Fluor-2-deoxy-D-glucose	s	Singulett
FVB	Bestimmter Mäusestamm	sek	Sekunde
g	Gramm	SEM	Standard Error of the Mean
h	Stunde	SPECT	Einzel-Photonen-Emissions-Tomographie
Hap	Hydroxyapatit	SUV	Standard Uptake Value
HCl	Salzsäure	TLC	thin layer chromatography
HDP	Hydroxy-Ethylen-Diphosphonat	UKCCCR	UK Co-ordinating Committee on Cancer Research
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure		
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography	VOI	Volume of Interest
Hz	Hertz	VPL	Verapamil
kDa	kilo-Dalton	WHO	World Health Organisation

5.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Prozentualer Anteil der Todesursache verschiedener Erkrankungen in Deutschland; wiedergegeben nach Daten des Statistischen Bundesamtes für das Jahr 2009	11
Abb. 2:	Prozentualer Anteil der Todesursache verschiedener Erkrankungen weltweit; Wiedergabe aus den Berichten (The Global Burden of Diseases) der WHO.....	12
Abb. 3:	Molekulares Model von pGP in planarer Ansicht in der Zellmembran mit den beiden Nukleotid-Bindungs-Domänen (NBD) im intrazellulären Raum (unten links gelb, rechts blau).....	14
Abb. 4:	Schematische Funktion von pGP in der Zellmembran zum Transport von Toxinen aus der Zelle unter ATP-Verbrauch: Substratmoleküle (rot) gelangen in eine Kavität umgeben von Aminosäuren (cyan), die eine große Bandbreite von Molekülen binden. ATP (gelb) bindet an die NBDs und verursacht eine Konformationsänderung, wodurch das Substrat der Außenseite der Zelle exponiert wird.	15
Abb. 5:	[¹¹ C]Verapamil	17
Abb. 6:	μPET einer Ratte in transversaler Schnittebene durch den Kopf: Vor (links) und nach (rechts) der Gabe von 25 mg/kg CsA ist zu sehen, dass pGP [¹¹ C]Verapamil aus dem Gehirn transportiert. Die Konzentration von [¹¹ C]Verapamil ist im umgebenden Gewebe höher als im Gehirn	18
Abb. 7:	PET-Aufnahmen eines gesunden menschlichen Gehirns nach [¹¹ C]Verapamil-Gabe in Abwesenheit bzw. Anwesenheit von CsA zeigen eine erhöhte lokalen Aufnahme (grüne zu roten Gebieten) von ¹¹ C-Radioaktivität bei Anwesenheit von CsA. Die Aufnahmen sind als SUV-Werte (Standard Uptake Value) über eine Zeit von 5 bis 25 Minuten summiert.	19
Abb. 8:	[¹¹ C]Colchicin, [¹¹ C]Daunorubicin und [¹¹ C]Paclitaxel.....	19
Abb. 9:	[^{99m} Tc]Sestamibi, [^{99m} Tc]Tetrofosmin und [^{99m} Tc]Q12.....	20
Abb. 10:	[⁶⁸ Ga]DOTATOC.....	21
Abb. 11:	Visualisierung neuroendokriner Tumore mit [¹⁸ F]FDG (links), [¹¹¹ In]Octreoscan und [⁶⁸ Ga]DOTATOC (rechts) (Katharinenhospital Stuttgart, Bihl et al.).....	22
Abb. 12:	[^{67/68} Ga]3-ethoxy-ENBDMPI.....	23
Abb. 13:	Kleintier-PET von [⁶⁸ Ga]3-ethoxy-ENBDMPI von FVB-Wildtypmäusen (links) und pGP 1a/1b (-/-)-Mäusen (rechts) 5 Minuten p.i. [53].....	23

Abb. 14:	Prozentuale Zusammensetzung des Knochens.....	25
Abb. 15:	Phasen der Knochenbildung.....	26
Abb. 16:	Schematische Übersicht über die derzeitige Diagnose und Therapie von Knochenmetastasen.....	29
Abb. 17:	^{99m} Tc-Liganden MDP, DPD und HDP.....	30
Abb. 18:	SPECT-Aufnahme mit ^{99m} Tc-MDP	31
Abb. 19:	offenkettige und makrozyklische polyamino-Phosphonatliganden EDTMP und DOTP.....	31
Abb. 20:	Dargestellte Schiff'sche Basen zur Markierung mit ⁶⁸ Ga	154
Abb. 21:	Aufbau weiterer Tetraamingrundkörper zur Darstellung von Schiff'schen Basen	156
Abb. 22:	Bisphosphonat-Liganden BPAMD, BPAPD und BPPED	158
Abb. 23:	Radiochemische Ausbeute von [⁶⁸ Ga]BPPED in Abhängigkeit des pH-Werts bei 100 °C..	159
Abb. 24:	Vergleich der Anreicherung von [⁶⁸ Ga]BPAMD zu [¹⁸ F]Fluorid und [⁶⁸ Ga]BPAPD zu [¹⁸ F]Fluorid im Knie zweier Versuchstiere	160
Abb. 25:	Bifunktionseller Chelator DO3A-NCS.....	162
Abb. 26:	Bifunktionseller divalenter Chelator DO2A-(NCS) ₂	162
Abb. 27:	Beispiele von Zielstrukturen der Hydroxybisphosphonate	162
Abb. 28:	Mögliche Syntheseroute für mono- und divalente DOTA-Hydroxybisphosphonate	163

5.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Hochrechnung der prozentualen Todeshäufigkeit aus 2004 für die Jahre 2008 und 2030; Ausschnitt wiedergegeben aus den Tabellen der WHO	12
---------	--	----

*„Wir müssen die Natur nicht als unseren Feind betrachten,
den es zu beherrschen und überwinden gilt,
sondern wieder lernen, mit der Natur zu kooperieren.
Sie hat eine viereinhalb Milliarden lange Erfahrung.
Unsere ist wesentlich kürzer.“*

Hans-Peter Dürr (*1929)

