

30e jaargang 2008 nummer 4 issn 1381 - 4842

**T I J D S C H R I F T**  
**V O O R**  
**N U  L E A I R E**  
**G E N E E S K U N D E**

**Themanummer nieuwe radiofarmaca**

**Octreotide analogues for radionuclide therapy: current status and future outlook**

**Scintigraphic imaging of angiogenesis**

**Ontwikkeling van een nieuw radiofarmacon in een academische, niet-commerciële setting**



COVIDIEN

Formerly Tyco Healthcare/Mallinckrodt

# Octreoscan™

Your reliable diagnostic tool for diagnosis and staging of Neuro Endocrine Tumours  
Experience the high impact on your clinical patient management

- When a primary has been resected, SSRS may be indicated for follow up (grade D)<sup>1</sup>
- For assessing secondaries, SSRS is the most sensitive modality (grade B)<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Guidelines for the management of gastroenteropancreatic neuroendocrine (including carcinoid) tumours, J.K. Ramage et al, UKNET work for neuroendocrine tumours, GUT 2005, 54 (Suppl IV):iv1-iv16

For specific prescribing information of your country consult the local COVIDIEN office or its representative.

**MALLINCKRODT MEDICAL BV**  
a Covidien company

Westerduinweg 3  
1755 ZG Petten, The Netherlands  
Telephone +31(0) 224 567890  
Fax +31(0) 224 567008  
E-mail info.nuclear@covidien.com

**Trade name of the medicinal product:** Octreoscan™ | **Qualitative and quantitative composition:** Octreoscan™ is supplied as two vials which cannot be used separately. 1 vial 4920/A with 1.1 ml solution contains at activity reference time: (<sup>111</sup>In) Indium(III)chloride 122 MBq 1 vial 4920/B contains: Pentetreotide 10 µg. | **Indications:** <sup>111</sup>In pentetreotide specifically binds to receptors for somatostatin. Octreoscan™ is indicated for use as adjunct in the diagnosis and management of receptor bearing gastro-entero-pancreatic neuroendocrine (GEP) tumours and carcinoid tumours, by aiding in their localisation. Tumours which do not bear receptors will not be visualised. | **Posology and method of administration:** The dose for planar scintigraphy is 110 MBq in one single intravenous injection. Careful administration is necessary to avoid paravascular deposition of activity. For single photon emission tomography the dose depends on the available equipment. In general, an activity dose of 110 to 220 MBq in one single intravenous injection should be sufficient. No special dosage regimen for elderly patients is required. There is limited experience on administrations in paediatric patients, but the activity to be administered in a child should be a fraction of the adult activity calculated from the bodyweight. | **Contraindications:** No specific contraindications have been identified. | **Special warnings and special precautions for use:** Because of the potential hazard of the ionizing radiation <sup>111</sup>In-pentetreotide should not be used in children under 18 years of age, unless the value of the expected clinical information is considered to outweigh the possible damage from radiation. Administration of a laxative is necessary in patients not suffering from diarrhoea, to differentiate stationary activity accumulations in lesions in, or adjacent to, the intestinal tract from moving accumulations in the bowel contents. In patients with significant renal failure administration of

<sup>111</sup>In-pentetreotide is not advisable because the reduced or absent function of the principal route of excretion will lead to delivery of an increased radiation dose. Positive scintigraphy with <sup>111</sup>In-pentetreotide reflects the presence of an increased density of tissue somatostatin receptors rather than a malignant disease. Furthermore positive uptake is not specific for GEP- and carcinoid- tumours. Positive scintigraphic results require evaluation of the possibility that another disease, characterised by high local somatostatin receptor concentrations, may be present. An increase in somatostatin receptor density can also occur in the following pathological conditions: tumours arising from tissue embryologically derived from the neural crest, (paragangliomas, medullary thyroid carcinomas, neuroblastomas, pheochromocytomas), tumours of the pituitary gland, endocrine neoplasms of the lungs (small-cell carcinoma), meningiomas, mamma-carcinomas, lympho-proliferative disease (Hodgkin's disease, non-Hodgkin lymphomas), and the possibility of uptake in areas of lymphocyte concentrations (subacute inflammations) must be considered. Radiopharmaceutical agents should only be used by qualified personnel with the appropriate government authorization for the use and manipulation of radionuclides. | **Interaction with other medicaments and other forms of interaction:** No drug interactions have been reported to date. | **Effects on the ability to drive and use machines:** <sup>111</sup>In-pentetreotide does not affect the ability to drive or to use machines. | **Undesirable effects:** Adverse effects attributable to the administration of Octreoscan™ are uncommon. Specific effects have not been observed. The symptoms reported are suggestive of vasovagal reactions or of anaphylactoid drug effects. **MANUFACTURED AND RELEASED BY:** Mallinckrodt Medical B.V., Westerduinweg 3, 1755 LE Petten, The Netherlands

<b>OORSPRONKELIJK ARTIKEL</b>	
Octreotide analogues for radionuclide therapy: current status and future outlook	165
<i>Prof. dr. ir. M. de Jong</i>	
<b>OORSPRONKELIJK ARTIKEL</b>	
ImmunoSPECT and PET imaging: towards patient tailored targeted therapy	171
<i>Dr. M.N. Lub-de Hooge</i>	
<b>OORSPRONKELIJK ARTIKEL</b>	
Scintigraphic imaging of angiogenesis	177
<i>Prof. dr. O.C. Boerman</i>	
<b>OORSPRONKELIJK ARTIKEL</b>	
Ontwikkeling van een nieuw radiofarmacon in een academische, niet-commerciële setting	185
<i>Drs. M.G.G. Sturkenboom</i>	
<b>OORSPRONKELIJK ARTIKEL</b>	
Fibrose activiteit bij patiënten met longfibrose: mogelijkheden van molecular imaging	193
<i>Dr. J. Lavalaye</i>	
<b>OORSPRONKELIJK ARTIKEL</b>	
Amyloid imaging in Alzheimer's disease: a promising new direction in Nuclear Medicine	199
<i>Dr. B.N.M. van Berckel</i>	
<b>BESCHOUWING</b>	
Ruimtelijke voorzieningen bij de bereiding van radiofarmaca: welke regels gelden wanneer?	202
<i>Dr. K.J.M. Schimmel</i>	
<b>BESCHOUWING</b>	
Metabole PET tracers voor neuroendocriene tumoren: een verhalende beschrijving	205
<i>Dr.P.L. Jager</i>	
<b>CONGRESVERSLAG</b>	
14 <sup>th</sup> European Symposium on Radiopharmacy and Radiopharmaceuticals	209
<i>Dr. E.F.J. De Vries</i>	
<b>DIENST IN DE KIJKER</b>	
Het Radionuclidencentrum van het VUmc	212
<b>MOET JE NOU EENS KIJKEN</b>	
Skeletscintigrafie behulpzaam bij het diagnosticeren van recidief uterus adenosaroom	214
Boekbespreking	216
Mededelingen uit de verenigingen	217
Cursus- en Congresagenda	218

## Nieuwe radiofarmaca: samen meer mogelijk maken

Dat onderzoek naar nieuwe radiofarmaca zeer actueel is blijkt wel uit een PubMed search die ik eerder dit jaar deed: in 2007 werden in de medische literatuur meer dan 90 verschillende concept radiofarmaca beschreven. In dit themanummer heb ik geprobeerd een aantal sprekende artikelen bijeen te brengen om te illustreren dat onderzoek naar nieuwe radiofarmaca ook op eigen bodem zeer actueel is. Zo bevat dit themanummer zes oorspronkelijk artikelen over veelbelovende radiofarmaca waaronder F<sup>18</sup>-DOPA, Y<sup>90</sup>-DOTATOC, F<sup>18</sup>-PIB en F<sup>18</sup>-galacto-RGD.

Een onderzoeksrichting die ik graag apart wil noemen is het labelen van biologicals ten behoeve van het voorspellen en monitoren van de respons op deze middelen (artikelen van Boerman et al. en Lub-de Hooge). Een ontwikkeling die zeer goed kan gaan bijdragen aan het doelmatig inzetten van de 'dure' biologicals. Wellicht komt er ooit een themanummer over farmaco-economisch onderzoek rondom de plaatsbepaling van deze radiofarmaca.

Iets anders waar ik u graag op attent maak is het uitgebreide congresverslag van het 14e European Symposium on Radiopharmacy and Radiopharmaceuticals (de Vries et al.). Hoewel vaak nog in het stadium vóór klinisch onderzoek geeft dit wel prachtige voorbeelden van de richtingen waarin momenteel onderzoek naar nieuwe radiofarmaca plaatsvindt.

Met elkaar moeten we ook constateren dat het landschap waarin tegenwoordig onderzoek met radiofarmaca kan worden gedaan sterk verandert. Een actueel voorbeeld is de herziene GMP Annex 3 (manufacture of radiopharmaceuticals) die op 1 september jongstleden door de Europese Commissie is geaccordeerd. De eisen in deze norm zijn vanzelfsprekend strenger dan voorheen. Twee artikelen in dit themanummer gaan specifiek in op deze veranderende eisen (artikelen Sturkenboom et al. en Schimmel et al.).

Deze strengere regelgeving kan ook een rem betekenen op innovatief onderzoek. Maar dit hoeft niet zo te zijn. Juist door goede samenwerking tussen een beperkt aantal goed geoutilleerde laboratoria/bereidingsafdelingen en diverse klinisch werkende onderzoekers is het wat mij betreft goed mogelijk om innovatie én veiligheid voor onze patiënten maximaal mogelijk te maken. En hier bedoel ik met name samenwerking over de muren van de ziekenhuizen heen. Het artikel van Lavalaye et al. in dit themanummer is hier een goed voorbeeld van.

**Dr. Ewoudt M.W. van de Garde,**  
ziekenhuisapotheker-radiofarmaceut  
hoofdredacteur themanummer



# GALLIUM-68 GENERATOR

The iThemba GMP produced Ga-68 generator provides a positron emitter for the labelling of Peptides, monoclonals etc. Which is used chiefly in Nuclear medicine departments for diagnostic purposes.

**GMP – produced**

---

**Calibration in Ga-68 instead of Ge-68**

---

**Delivery time: 4 weeks**

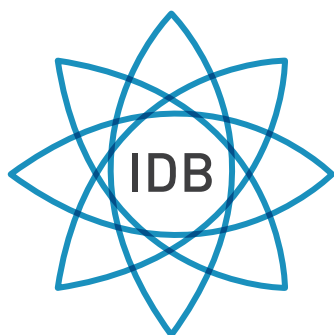
---

**Fully shielded**

---

**Ge-68 breakthrough  $\leftarrow$  0,002 % at the reference date**

**NOW  
SHIPPING  
ACROSS  
EUROPE**



**IDB Holland bv**  
*From Atom to Image*  
Exclusive European Distributor

Please visit our new Website  
for more information. [www.idb-holland.com](http://www.idb-holland.com)

Tel: +31 (0)13 507 9558  
Fax: +31 (0)13 507 9912  
Email: [sales@idb-holland.com](mailto:sales@idb-holland.com)

# Octreotide analogues for radionuclide therapy: current status and future outlook



Prof. dr. ir. M. de Jong



Prof. dr. E.P. Krenning

Department of Nuclear Medicine  
Erasmus MC Rotterdam  
The Netherlands

## Abstract

### De Jong M, Krenning EP. Octreotide analogues for radionuclide therapy: current status and future outlook

Radiolabelled somatostatin analogues have emerged as an important class of radiopharmaceuticals for molecular imaging and therapy of peptide receptor-overexpressing tumours. The somatostatin analogues DOTA, Tyr<sup>3</sup>-octreotide and DOTA, Tyr<sup>3</sup>-octreotate are being used successfully for both applications. As there are only few effective therapies for patients with inoperable or metastasised neuroendocrine tumours, radionuclide therapy using these radiopeptides is a promising novel treatment option for these patients. Symptomatic improvement and tumour regression can be obtained with both analogues and the median duration of the therapy response is more than 30 months. The side-effects of PRRT are few and mostly mild, certainly when using renal protective agents. These data compare favourably with the limited number of alternative treatment approaches, like chemotherapy. If more widespread use of PRRT is possible, such therapy might become the therapy of first choice in patients with metastasised or inoperable gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours.

**Tijdschr Nucl Geneesk 2008; 30(4):105-110**

## Introduction

Radiolabelled receptor-binding somatostatin analogues have emerged as an important class of radiopharmaceuticals for diagnosis and therapy of neuroendocrine tumours. These radiopeptides are derivatives of somatostatin, a hormone distributed throughout the body that acts as a regulator of endocrine and nervous system function by inhibiting

the secretion of several other hormones such as growth hormones, insulin and gastrin.

The discovery that certain tumour types overexpress receptors for peptide hormones dates back to the mid-1980s. There has been exponential growth in the development of radiolabelled peptides for diagnostic and therapeutic applications since, as peptides have fast clearance, rapid tissue penetration, low antigenicity and can be produced easily. The high affinity of the radiopeptides for the receptor facilitates retention of the radiolabel in receptor-expressing

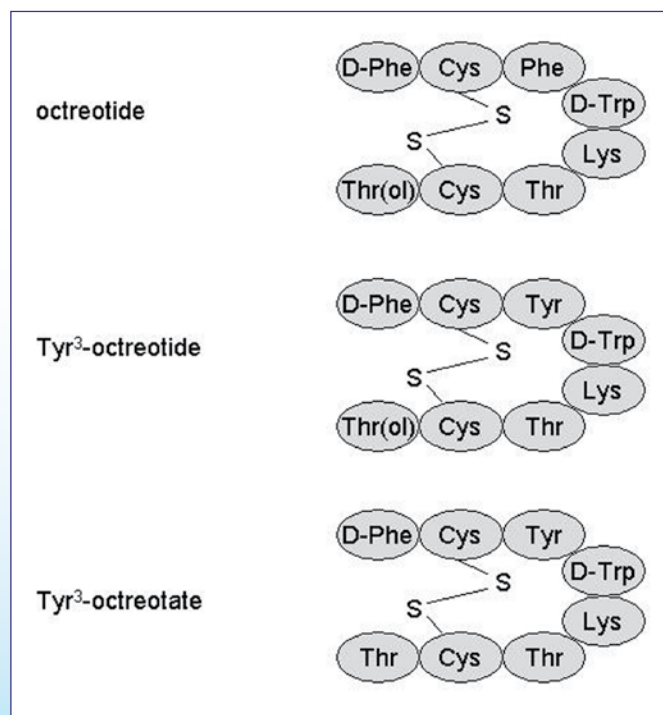


Fig. 1  
Structures of the somatostatin analogues octreotide, Tyr<sup>3</sup>-octreotide and Tyr<sup>3</sup>-octreotate.



tumours, while its relative small size facilitates rapid clearance from the blood.

The concept of targeting receptor-expressing cells *in vivo* with their radiolabelled ligands has proven its validity in the clinic using different radiolabelled somatostatin analogues, the most widely used being derivatives of octreotide, Tyr<sup>3</sup>-octreotide and Tyr<sup>3</sup>-octreotate (Fig. 1).

The aim of this overview is to describe the current status and future outlook of these radiolabelled somatostatin analogues for radionuclide therapy of receptor-positive tumours.

### Octreotide, Tyr<sup>3</sup>-octreotide and Tyr<sup>3</sup>-octreotate

The diagnostic radiolabelled somatostatin analogue [<sup>111</sup>In-DTPA]octreotide (OctreoScan, <sup>111</sup>In-pentetreotide) was approved by the FDA on June 2, 1994 for scintigraphy of patients with neuroendocrine tumours. In the intervening period it has been proven that this technique permits the localisation and staging of tumours that express the appropriate somatostatin receptors (1).

The most important of these is receptor subtype 2 (sst2), as octreotide has the highest affinity for this subtype (2). The next generation of modified somatostatin analogues, including DOTA, Tyr<sup>3</sup>-octreotide (DOTATOC), is being used for peptide receptor imaging (PRI) and peptide receptor radionuclide therapy (PRRT) as well. DOTATOC has a higher affinity for sst2 than octreotide itself (2), and has DOTA instead of DTPA as chelator, allowing stable radiolabeling with several radionuclides for PRI and PRRT, including <sup>111</sup>In, <sup>68</sup>Ga, <sup>67</sup>Ga, <sup>90</sup>Y and <sup>177</sup>Lu.

DOTA, Tyr<sup>3</sup>-octreotate (DOTATATE) is a third generation somatostatin analogue for PRI and PRRT. It differs from DOTATOC in that the C-terminal threoninol has been replaced with threonine. Compared with DOTATOC, it shows considerable improvement in binding to sst2-positive tissues *in vitro* and *in vivo* (2-4). The new analogue appeared most promising for both PRI and PRRT (see below).

### Imaging

Somatostatin analogues radiolabelled with <sup>111</sup>In, <sup>99m</sup>Tc and <sup>68</sup>Ga bind to their receptors on e.g. gastroenteropancreatic (GEP) neuroendocrine tumours (NETs). After binding nuclear imaging (SPECT and PET) has been shown to be able to visualize the presence of such peptide receptors *in vivo* (1,5-7).

Radiopeptide molecular imaging can visualize primary tumours and possible metastatic lesions and offer insight into the variability of receptor expression in tumour lesions within a patient. The use of receptor imaging before/during therapy can help in radionuclide therapy planning, because it is possible to take into account the specific biokinetics of the radiopeptide in each patient to determine how the treatment could be tailored. High tumour uptake on somatostatin receptor scintigraphy and limited amount of liver metastases were e.g. predictive factors for tumour remission using <sup>177</sup>Lu-

DOTATATE (8).

After therapy, imaging can be applied to detect progression of disease or relapse.

### Somatostatin receptor radionuclide therapy

Unfortunately, there are few therapies for metastatic or inoperable gastroenteropancreatic tumours and chemotherapy is rarely effective in the long term. Unlabelled octreotide can relieve symptoms, the tumour size is rarely reduced though. So, after the successful use of radiopeptides for PRI, PRRT using such analogues became an interesting next step. After successful therapeutic studies *in vitro* and in animal models showing the promise of PRRT using different somatostatin analogues (4,9-11), several clinical studies have been started using different analogues labelled with different radionuclides. Treatment with any of the various <sup>111</sup>In, <sup>90</sup>Y, or <sup>177</sup>Lu-labelled somatostatin analogues that have been used resulted in at least symptomatic improvement. Tumour size reduction was seldom achieved with <sup>111</sup>In-labelled somatostatin analogues (12,13). Therefore, radiolabelled somatostatin analogues with beta-emitting radionuclides like <sup>90</sup>Y and <sup>177</sup>Lu have been developed (12).

Most clinical papers have been based on the evaluation of <sup>90</sup>Y-DOTATOC, using different protocols and patient groups. Remission rates ranged from 7-33% (12,14-16). The dose-limiting factors for <sup>90</sup>Y-DOTATOC therapy were renal, liver and bone-marrow toxicity that limited the cumulative therapeutic dose to 5-6 GBq. Coinfusion of l-Arg/l-Lys amino-acid mixtures had a marked renoprotective effect, reducing the risk of therapy-related renal failure (17,18).

In patients with relapse after <sup>90</sup>Y-DOTATOC treatment <sup>177</sup>Lu-DOTATOC therapy appeared feasible, safe, and efficacious. No serious adverse events occurred (19).

Molecular Insight Pharmaceuticals (MIP) Inc. is developing this analogue (brand name Onalta) for the radiotherapeutic treatment of metastatic carcinoid and pancreatic neuroendocrine cancer in patients whose symptoms are not controlled by conventional somatostatin analogue therapy. Onalta has been granted Orphan Drug status by the FDA.

As for <sup>177</sup>Lu-DOTATATE treatment, more than 500 patients received more than 1700 treatments in our department (8). Patients were treated up to a cumulative dosage of 750 to 800 mCi (27.8-29.6 GBq), typically in 4 treatment cycles of 6 to 10 weeks' duration. The overall tumour response rate, including minor tumour responses, was 46%, with the lowest rates among patients with carcinoid tumours. In 2% and 28% of patients, complete and partial tumour responses, respectively, were found. In patients whose treatment outcome was not progressive disease, median time to progression was 40 months from onset of treatment. Patients with progressive disease as <sup>177</sup>Lu-DOTATATE treatment outcome clearly had a shorter survival than those who had

tumour remission or stable disease. Quality of life improves significantly after treatment with  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE (20). Side effects were few and mostly mild, certainly when using renal protective agents. Serious delayed side-effects, like myelodysplastic syndrome or renal failure, were rare (8).

The data about PRRT compare favourably with the limited number of alternative treatment approaches, like chemotherapy. The median time to progression for chemotherapy in most of the studies is less than 18 months, regardless of the varying percentages of objective responses. Therefore, PRRT might become the therapy of first choice in patients with metastasised or inoperable gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours if more widespread use of PRRT is possible. Also the role in somatostatin receptor expressing non-GEP tumours, like metastasised paraganglioma / pheochromocytoma and non-radioiodine-avid differentiated thyroid carcinoma might become more important. Further studies are needed to increase anti-tumour effects and to further reduce side effects.

Covidien Ltd. and BioSynthema Inc. will develop and commercialize this compound for PRRT of neuroendocrine cancer. DOTATATE has been granted Orphan Drug status by EMEA.

#### DOTATOC or DOTATATE?

Various preclinical studies have been performed comparing radiolabelled DOTATOC and DOTATATE in vitro and in vivo. From these studies it could be concluded that DOTATATE is a more suitable somatostatin analogue than DOTATOC for PRRT, because of the higher affinity of DOTATATE for the sst<sub>2</sub> than that of DOTATOC, leading to a higher uptake in sst<sub>2</sub>-positive tumours and resulting in a significantly higher tumour radiation dose (3,4,9,21).

To compare these two analogues in patients, Forrer et al. (22) used  $^{111}\text{In}$  as a surrogate for  $^{90}\text{Y}$  and  $^{177}\text{Lu}$  and examined whether one of the  $^{111}\text{In}$ -labelled DOTA-peptides had a more favourable biodistribution in patients with neuroendocrine tumours.  $^{111}\text{In}$ -DOTATATE showed a higher uptake in kidney and liver, whereas the amount of  $^{111}\text{In}$ -DOTATOC excreted into the urine was significantly higher than for  $^{111}\text{In}$ -DOTATATE.  $^{111}\text{In}$ -DOTATOC showed a higher tumour-to-kidney absorbed dose ratio in seven of nine evaluated tumours, so the authors concluded that there were minor advantages for  $^{111}\text{In}$ -DOTATOC over  $^{111}\text{In}$ -DOTATATE.

On the other hand, Esser et al. (23) compared the two analogues under therapeutic conditions in the same patients; 3700 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC and 3700 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE (with corresponding peptide amounts of hundreds of mgs) was administered in separate therapy sessions (Fig. 2). Amino acids were co-administered as well. Comparing  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE with  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC, the mean residence time ratio was 2.1 for tumour, 1.5 for spleen and 1.4 for kidneys.

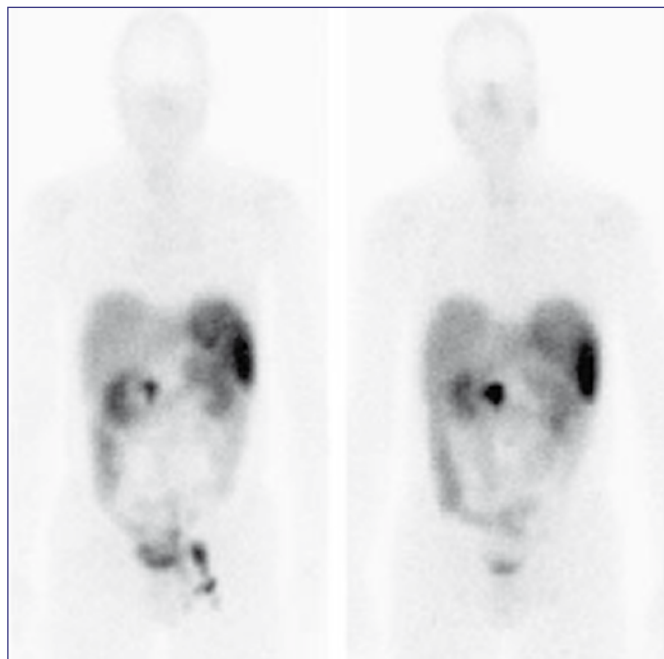


Fig. 2  
Planar anterior whole body scans of the same patient 1 day post therapy, after  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC (left) and after  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE (right). Adapted from (23).

Plasma radioactivity after  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE was comparable to that after  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC, whereas  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE had a longer tumour residence time than  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC. Despite a longer residence time in kidneys after  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE, the tumour radiation dose was always higher.

Therefore, the authors concluded that the better peptide for PRRT is DOTATATE.

#### Reduction of radiotoxicity in normal organs

Most peptide analogues, including radiolabelled somatostatin analogues, are rapidly cleared from the body via the kidneys and partly reabsorbed in these organs, making the kidneys are first critical organs in PRRT. A possibility to improve the results of the treatment with radiolabelled somatostatin analogues is to reduce the amount of radiation to the normal tissues, especially kidneys, or to reduce its unwanted effects, allowing an increase of the cumulative administered activity. In clinical practice, PRRT with radiolabelled somatostatin analogues should always be administered with renal protective agents, either lysine and arginine or a commercially available mixture of amino acids. These amino acids cause a reduced renal uptake of radioactivity in the proximal tubuli (17,18,24). Animal studies indicate that the addition of gelofusin to lysine and arginine can further decrease the renal uptake (25). Another possible way to reduce the toxic effects of radiation on both kidneys and bone marrow could be to administer amifostine. Amifostine is used in patients treated with external beam radiation therapy and reduces

side effects. In animal studies using high activity of  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE, co-administration of amifostine clearly reduced the functional renal damage (26).

To investigate distribution of radioactivity in the human kidney for renal radiation dose estimations, patients received an intravenous injection of  $^{111}\text{In}$ -DTPA-octreotide before nephrectomy because of renal cancer (27). SPECT scanning was performed before and kidney ex vivo autoradiography was performed after surgery. Radioactivity appeared to be localized predominantly in the cortex of the kidney in a striped pattern, with most of the radioactivity centered in the inner cortical zone.

The consequences of these radioactivity distribution inhomogeneities have been evaluated for PRRT with  $^{90}\text{Y}$ -DOTATOC and  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE by calculating dose distributions and dose-volume histograms (DVHs) for the kidneys (28). It appeared that isodose curves for the high-energy  $\beta$ -emitter  $^{90}\text{Y}$  did not show a sign of the real inhomogeneous activity distribution, apart from the cortex-medulla boundaries. On the other hand, the  $^{177}\text{Lu}$  isodose curves followed the autoradiographic activity distribution exactly. The DVHs showed that the inhomogeneous activity distribution creates considerable volumes within the kidney and within the cortex with lower doses than the average kidney dose, together with volumes receiving much higher doses. So, it was concluded that kidney dosimetry for radionuclide therapy can be based on average MIRD-based dose models for high-energy  $\beta$ -emitters, such as  $^{90}\text{Y}$ . In contrast, low-energy  $\beta$ -emitters, such as  $^{177}\text{Lu}$ , produce dose distributions in the kidneys that are very dependent on the radioactivity distribution pattern in the kidney or renal cortex. To further investigate differences in  $^{90}\text{Y}$ - and  $^{177}\text{Lu}$ -radiation effects in the kidney, we analyzed the time course of decline in creatinine clearance (CLR) in patients with metastasized neuroendocrine tumours during at least 18 months after the start of PRRT with  $^{90}\text{Y}$ -DOTATOC or  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE (29). All patients were infused with renoprotective amino acids during the administration of the radioactive peptides. For  $^{90}\text{Y}$ -DOTATOC renal radiation doses were 5.9-26.9 Gy per cycle with a total of 18.3-38.7 Gy.  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE renal radiation doses were 1.8-7.8 Gy per cycle with a total of 7.3-26.7 Gy. The median decline in CLR was 7.3% per year in patients treated with  $^{90}\text{Y}$ -DOTATOC and 3.8% per year in patients treated with  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE. So, the average rate of decline in CLR was less in patients treated with  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE, who received a lower renal radiation dose. However, with the chosen administered activities, both treatments are effective in patients with neuroendocrine tumours.

The average distance from the tubules (i.e. the source) and the glomerulus (the relevant target) in the kidney cortex is important for the effects of the different radionuclides applied. The range of  $\beta$ -particles from  $^{90}\text{Y}$  is maximally 12 mm, long enough to reach the glomeruli from the tubular cells, whereas the range of the  $^{177}\text{Lu}$  electrons is maximally 2.1 mm, thus the

sensitive glomeruli may be partially spared. This may be an additional explanation for the much lower average decline in CLR in the  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE patients than in the  $^{90}\text{Y}$ -DOTATOC patients.

#### Future outlook of PRRT: combination therapies

The use of several different radiolabelled somatostatin analogues in the same patient can be considered interesting because of the different physical properties of  $^{90}\text{Y}$  and  $^{177}\text{Lu}$ . From animal experiments, it became clear that  $^{90}\text{Y}$ -labelled somatostatin analogues may be more effective for larger tumours,  $^{177}\text{Lu}$ -labelled somatostatin analogues may be more effective for smaller tumours and their combination may be the most effective: in a study in animals each bearing tumours of different sizes, therapy with both  $^{90}\text{Y}$ - and  $^{177}\text{Lu}$ -labelled DOTATATE had better remission rates than either  $^{90}\text{Y}$ - or  $^{177}\text{Lu}$ -labelled DOTATATE alone (30). Therefore, in future PRRT studies not only different radiolabelled peptide analogues and different radionuclides should be evaluated, but also PRRT with several combinations, preferably in a randomised clinical trial.

Using radiosensitising chemotherapeutic agents (e.g. 5-fluorouracil [5-FU] or capecitabine) may also be one of the future directions to improve therapeutic effects. PRRT using  $^{111}\text{In}$ -octreotide combined with 5-FU resulted in a symptomatic response in 71% of patients with neuroendocrine tumours (31), which is more frequent than in other studies using only  $^{111}\text{In}$ -octreotide as treatment (12). More recent trials used capecitabine, a prodrug of 5-FU, which has the advantage of oral administration. If capecitabine is used in relatively low doses, grade 3 haematologic or other toxicity such as hand-foot syndrome is rare. We recently finished a pilot trial using capecitabine and  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE to evaluate if this new combination is safe and feasible. Seven patients were treated and 26 cycles of the combination were administered. Haematological toxicity was rare and capecitabine specific side effects were rare as well (32). With this knowledge, we recently started a randomised, clinical, multi-centre trial comparing treatment with  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE with and without capecitabine in patients with GEP tumours.

In future studies, we plan to investigate other agents, e.g. those targeting the vascular endothelial growth factor pathway and mammalian targets of rapamycin, as well.

#### Conclusions


The majority of malignant gastroenteropancreatic tumours are metastatic at discovery; effective therapeutic regimens are necessary in patients with symptomatic or progressive disease or both.

Chemotherapy has not been satisfactory and prolonged treatment is limited because of potential toxic effects. The use of radiolabelled somatostatin analogues represents an important new therapeutic option with promising efficacy, low toxicity and the potential to become a first-line treatment option.



## References

- Krenning EP, Kwekkeboom DJ, Bakker WH, Breeman WA, Kooij PP, Oei HY et al. Somatostatin receptor scintigraphy with [111In-DTPA-D-Phe1]- and [123I-Tyr3]-octreotide: the Rotterdam experience with more than 1000 patients. *Eur J Nucl Med* 1993;20:716-31
- Reubi JC, Schar JC, Waser B, Wenger S, Heppeler A, Schmitt JS et al. Affinity profiles for human somatostatin receptor subtypes SST1-SST5 of somatostatin radiotracers selected for scintigraphic and radiotherapeutic use. *Eur J Nucl Med* 2000;27:273-82
- de Jong M, Breeman WA, Bakker WH, Kooij PP, Bernard BF, Hofland LJ et al. Comparison of (<sup>111</sup>In)-labeled somatostatin analogues for tumor scintigraphy and radionuclide therapy. *Cancer Res* 1998;58:437-41
- de Jong M, Breeman WA, Bernard BF, Bakker WH, Schaar M, van Gameren A et al. [177Lu-DOTA(0),Tyr3] octreotate for somatostatin receptor-targeted radionuclide therapy. *Int J Cancer* 2001;92:628-33
- Antunes P, Ginj M, Zhang H, Waser B, Baum RP, Reubi JC et al. Are radiogallium-labelled DOTA-conjugated somatostatin analogues superior to those labelled with other radiometals? *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2007;34:982-93
- Decristoforo C, Maina T, Nock B, Gabriel M, Cordopatis P, Moncayo R. 99mTc-Demotate 1: first data in tumour patients- results of a pilot/phase I study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003;30:1211-9
- Gabriel M, Decristoforo C, Maina T, Nock B, vonGuggenberg E, Cordopatis P et al. 99mTc-N4-[Tyr3]Octreotate Versus 99mTc-EDDA/HYNIC-[Tyr3]Octreotide: an inpatient comparison of two novel Technetium-99m labeled tracers for somatostatin receptor scintigraphy. *Cancer Biother Radiopharm* 2004;19:73-9
- Kwekkeboom DJ, de Herder WW, Kam BL, van Eijck CH, van Essen M, Kooij PP et al. Treatment with the radiolabeled somatostatin analog [177 Lu-DOTA 0,Tyr3]octreotate: toxicity, efficacy, and survival. *J Clin Oncol* 2008;26:2124-30
- Capello A, Krenning EP, Breeman WA, Bernard BF, Konijnenberg MW, de Jong M. Tyr3-octreotide and Tyr3-octreotate radiolabeled with 177Lu or 90Y: peptide receptor radionuclide therapy results in vitro. *Cancer Biother Radiopharm* 2003;18:761-8
- de Jong M, Breeman WA, Bernard BF, Bakker WH, Visser TJ, Kooij PP et al. Tumor response after [(90Y-DOTA(0),Tyr(3))] octreotide radionuclide therapy in a transplantable rat tumor model is dependent on tumor size. *J Nucl Med* 2001;42:1841-6
- Stolz B, Weckbecker G, Smith-Jones PM, Albert R, Raulf F, Bruns C. The somatostatin receptor-targeted radiotherapeutic [90Y-DOTA-DPhe1, Tyr3]octreotide (90Y-SMT 487) eradicates experimental rat pancreatic CA 20948 tumours. *Eur J Nucl Med* 1998;25:668-74
- Kwekkeboom DJ, Mueller-Brand J, Paganelli G, Anthony LB, Pauwels S, Kvols LK et al. Overview of results of peptide receptor radionuclide therapy with 3 radiolabeled somatostatin analogs. *J Nucl Med* 2005;46 Suppl 1:62S-6S
- Valkema R, De Jong M, Bakker WH, Breeman WA, Kooij PP, Lugtenburg PJ et al. Phase I study of peptide receptor radionuclide therapy with [In-DTPA]octreotide: the Rotterdam experience. *Semin Nucl Med* 2002;32:110-22
- Bodei L, Cremonesi M, Zoboli S, Grana C, Bartolomei M, Rocca P et al. Receptor-mediated radionuclide therapy with 90Y-DOTATOC in association with amino acid infusion: a phase I study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003;30:207-16
- Chinol M, Bodei L, Cremonesi M, Paganelli G. Receptor-mediated radiotherapy with Y-DOTA-DPhe-Tyr-octreotide: the experience of the European Institute of Oncology Group. *Semin Nucl Med* 2002;32:141-7
- Waldherr C, Pless M, Maecke HR, Schumacher T, Crazzolara A, Nitzsche EU et al. Tumor response and clinical benefit in neuroendocrine tumors after 7.4 GBq (90Y-DOTATOC. *J Nucl Med* 2002;43:610-6
- de Jong M, Rolleman EJ, Bernard BF, Visser TJ, Bakker WH, Breeman WA et al. Inhibition of renal uptake of indium-111-DTPA-octreotide in vivo. *J Nucl Med* 1996;37:1388-92
- Rolleman EJ, Valkema R, de Jong M, Kooij PP, Krenning EP. Safe and effective inhibition of renal uptake of radiolabelled octreotide by a combination of lysine and arginine. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003;30:9-15
- Forrer F, Uusijarvi H, Storch D, Maecke HR, Mueller-Brand J. Treatment with 177Lu-DOTATOC of patients with relapse of neuroendocrine tumors after treatment with 90Y-DOTATOC. *J Nucl Med* 2005;46:1310-6
- Teunissen JJ, Kwekkeboom DJ, Krenning EP. Quality of life in patients with gastroenteropancreatic tumors treated with [177Lu-DOTA0,Tyr3]octreotate. *J Clin Oncol* 2004;22:2724-9
- Lewis JS, Lewis MR, Srinivasan A, Schmidt MA, Wang J, Anderson CJ. Comparison of four 64Cu-labeled somatostatin analogues in vitro and in a tumor-bearing rat model: evaluation of new derivatives for positron emission tomography imaging and targeted radiotherapy. *J Med Chem* 1999;42:1341-7
- Forrer F, Uusijarvi H, Waldherr C, Cremonesi M, Bernhardt P, Mueller-Brand J et al. A comparison of (111)In-DOTATOC and (111)In-DOTATATE: biodistribution and dosimetry in the same patients with metastatic neuroendocrine tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2004;31:1257-62
- Esser JP, Krenning EP, Teunissen JJ, Kooij PP, van Gameren AL, Bakker WH et al. Comparison of [(177)Lu-DOTA(0),Tyr(3)] octreotate and [(177)Lu-DOTA(0),Tyr(3)]octreotide: which peptide is preferable for PRRT? *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2006;33:1346-51
- Melis M, Krenning EP, Bernard BF, Barone R, Visser TJ, de Jong M. Localisation and mechanism of renal retention of radiolabelled somatostatin analogues. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2005;32:1136-43
- Rolleman EJ, Bernard BF, Breeman WA, Forrer F, de Blois E, Hoppin J et al. Molecular imaging of reduced renal uptake of radiolabelled [DOTA0,Tyr3]octreotate by the combination of lysine and Gelofusine in rats. *Nuklearmedizin* 2008;47:110-5
- Rolleman EJ, Forrer F, Bernard B, Bijster M, Vermeij M, Valkema R et al. Amifostine protects rat kidneys during peptide receptor radionuclide therapy with [177Lu-DOTA0,Tyr3]octreotate. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2007;34:763-71

27. de Jong M, Barone R, Krenning E, Bernard B, Melis M, Visser T et al. Megalin is essential for renal proximal tubule reabsorption of (111)In-DTPA-octreotide. *J Nucl Med* 2005;46:1696-700
28. Konijnenberg M, Melis M, Valkema R, Krenning E, de Jong M. Radiation dose distribution in human kidneys by octreotides in peptide receptor radionuclide therapy. *J Nucl Med* 2007;48:134-42
29. Valkema R, Pauwels SA, Kvols LK, Kwekkeboom DJ, Jamar F, de Jong M et al. Long-term follow-up of renal function after peptide receptor radiation therapy with (90)Y-DOTA(0), Tyr(3)-octreotide and (177)Lu-DOTA(0), Tyr(3)-octreotate. *J Nucl Med* 2005;46 Suppl 1:83S-91S
30. de Jong M, Breeman WA, Valkema R, Bernard BF, Krenning EP. Combination radionuclide therapy using 177Lu- and 90Y-labeled somatostatin analogs. *J Nucl Med* 2005;46 Suppl 1:13S-7S
31. Kong G, Lau E, Ramdave S, Hicks RJ. High-dose In-111 octreotide therapy in combination with radiosensitizing 5-FU
32. van Essen M, Krenning EP, Kam BL, de Herder WW, van Aken MO, Kwekkeboom DJ. Report on short-term side effects of treatments with 177Lu-octreotate in combination with capecitabine in seven patients with gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2008;35:743-8 

**Titel: Aanbevelingen Nucleaire Geneeskunde 2007**

**Eindredactie: Drs. P.C. Barneveld - Dr. P van Urk**

**ISBN: 978-90-78876-01-4**

**Uitgever: Kloosterhof acquisitie services - uitgeverij**

**Omvang 480 pagina's**

**Uitvoering garengenaaid**

**Prijs € 53,- (leden NVNG exclusief verzendkosten)**

**€ 74,20 (exclusief verzendkosten)**

**Stuur uw aanvraag naar [info@kloosterhof.nl](mailto:info@kloosterhof.nl)**

Deze Aanbevelingen beschrijven vrijwel alle gangbare patiëntonderzoeken en therapieën die op een afdeling Nucleaire Geneeskunde kunnen worden uitgevoerd. De nadruk ligt op de kwaliteit van de procedures en de daarvoor noodzakelijke apparatuur en radiofarmaca.

Het merendeel van de patiëntonderzoeken betreft diagnostische verrichtingen, maar ook therapeutische handelingen met behulp van radioactieve stoffen worden besproken. Verder komen in de Aanbevelingen fysische en farmaceutische aspecten aan de orde.

Het boek is vooral bedoeld als handboek en naslagwerk op een afdeling Nucleaire Geneeskunde en voor degenen die nog in opleiding zijn. Het is echter geen leerboek en het is niet gebaseerd op evidence based medicine methodiek omdat daarvoor te weinig tijd en onderzoek beschikbaar was.

De in deze Aanbevelingen opgenomen protocollen zijn onder regie van de Commissie Kwaliteitsbevordering van de Nederlandse Vereniging voor Nucleaire Geneeskunde (NVNG) opgesteld door leden van de NVNG met medewerking van de NVKF (Nederlandse Vereniging voor Klinische Fysica) en NVZA (Nederlandse Vereniging voor Ziekenhuisapothekers).

De Aanbevelingen werden vastgesteld op een algemene ledenvergadering van de NVNG. Met deze publicatie worden de huidige inzichten binnen de Nucleaire Geneeskunde met betrekking tot kwalitatief goede patiëntenzorg vastgelegd.

Aanbevelingen Nucleaire Geneeskunde 2007



## Aanbevelingen Nucleaire Geneeskunde

Commissie  
Kwaliteitsbevordering

# ImmunoSPECT and PET imaging: towards patient tailored targeted therapy



<sup>1</sup>Department of Hospital and Clinical Pharmacy

<sup>2</sup>Department of Nuclear Medicine and Molecular Imaging  
University Medical Center Groningen

Dr. M.N. Lub-de Hooge<sup>1,2</sup> The Netherlands

## Abstract

### Lub-de Hooge MN. ImmunoSPECT and PET imaging: towards patient tailored targeted therapy

With the availability of innovative targeted drugs that rapidly enter the market, it is currently becoming more and more important to select the patients that might benefit from the targeted therapy. Initiating patient tailored therapy would improve treatment efficacy and reduce costs. Currently there are only a few biomarkers available to help the physician select the appropriate targeted drug for solid tumours in the individual patient. However, tumour tissue is required for most biomarker assays. In an ongoing search for new methods that can assist in predicting therapy response, non-invasive molecular imaging with immunoscintigraphy (providing a whole body image) is a potentially interesting approach. To illustrate this approach, a way towards individualized therapy, this paper gives an overview of our work, performed with radiolabelled trastuzumab for HER2/neu imaging and radiolabelled bevacizumab and ranibizumab for in-vivo Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) imaging.

**Tijdschr Nucl Geneesk 2008; 30(4):111-116**

## Introduction

It is an exciting time to work in the field of oncology! In recent years, many new anticancer drugs have been developed and numerous others are in the pipeline. Most of these belong to the category of the so-called 'targeted drugs': compounds aimed at tumour-specific targets. In order for these drugs to be effective, the tumour target has to be present during treatment. Currently there are only a few biomarkers available to help the physician select the appropriate targeted drug for solid tumours in the individual patient. However, tumour tissue is required for most

biomarker assays. In an ongoing search for new methods that can assist in predicting therapy response, non-invasive molecular imaging with immunoscintigraphy, providing a whole body image, is a potentially interesting approach (1,2). To illustrate this approach, a way towards individualized therapy, this paper gives an overview of our work, performed with radiolabelled trastuzumab for HER2/neu imaging and radiolabelled bevacizumab and ranibizumab for in-vivo Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) imaging.

## Immunoscintigraphy: ImmunoPET and immunoSPECT

Immunoscintigraphy could be defined as scintigraphic imaging of a lesion using radiolabelled monoclonal antibodies or antibody fragments specific for antigen associated with the lesion.

Antibodies are highly specific targeting agents, the most important class of Abs is the IgG: Y-shaped molecules, composed of two heavy (50 kDa) and two light polypeptide chains (25 kDa), linked together by disulfide bonds. The amino-terminal variable domains of the heavy and light chains are responsible for antigen binding.

Fragment antigen binding (Fab) fragments (50 kDa) consist of one of the two identical arms of the antibody molecule, and therefore contain the complete light chain and part of the heavy chain, with a single antigen-binding site. These molecules are obtained by enzymatic cleavage of the Fc receptor with papain. Cleavage with pepsin results in divalent antibody fragments (F(ab')<sub>2</sub>, 100 kDa) in which both antigen-binding sites are retained. Minibodies (80 kDa), single chain Fragment variables (ScFvs, 2 x 28 kDa), diabodies (55 kDa) and affibodies (15 kDa), on the contrary, are not obtained by enzymatic procedures, but derived by genetic engineering (3,4).

Intact Abs display a long serum half-life (normally >10 days) and are predominantly excreted through hepatic clearance, due to their large molecular weight (150 kDa), which is well above the kidney threshold of approximately 50 kDa. Large,

intact Abs penetrate slowly but constant into solid tumour tissue, because there is little serum clearance, ultimately resulting in high tumour accumulation. Small proteins, on the contrary, swiftly penetrate into tumour tissue, but because they are cleared much more rapidly, the resulting tumour uptake is limited.

Most of the current clinical (and preclinical) immunoscintigraphic studies have been performed with SPECT imaging because these isotopes have a longer history of clinical use than positron emitters, although an increasing number of recently published preclinical studies are performed with PET isotopes (1-3). ImmunoPET combines the highly specific antibodies with the resolution and quantification possibilities of PET, what makes it an attractive option to improve tumour detection and mAb quantification (1).

For adequate visualization with slowly accumulating mAbs, the use of isotopes with long half-lives (like  $^{111}\text{In}$ ,  $^{89}\text{Zr}$  or  $^{124}\text{I}$ ) is a necessity. Small proteins, on the contrary, can be radiolabelled with shorter living isotopes (e.g.  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{123}\text{I}$  and  $^{18}\text{F}$ ), due to their swift tumour uptake and fast excretion (3). In order to minimize bone marrow, thyroid, liver or kidney toxicity, the half-life of the isotope should generally not exceed the half-life of protein distribution. Table 1. summarises the characteristics of antibody (based) radiopharmaceuticals.

Abs and proteins can be labelled in two ways: either directly or by use of a chelator. Under mild oxidative conditions, iodine radiohalogens are covalently bound to the protein tyrosine residues. Radiometals can only be labelled indirectly to the

protein lysine or tyrosine residues by means of a bifunctional chelator, such as diethylene triamine pentaacetic acid (DTPA), 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTA) or desferal. Even though DTPA and DOTA have been successfully used in radiolabelling, the introduction of the p-isothiocyanatobenzyl-derivatives (e.g. CHX-A''-DTPA and SCN-Bn-DTPA or SCN-Bn-DOTA) has clearly improved labelling characteristics. Modified desferal has been successfully applied in the labelling of Abs with the PET isotope  $^{89}\text{Zr}$  (5). Another important parameter influencing the tumour accumulation of a radiopharmaceutical is internalization. Upon cell surface receptor binding, Abs or fragments can be internalized by the tumour cell and subsequently degraded. Residualising labels (including all chelated radioisotopes) are trapped in the cell upon internalization, due to their lipophilicity. Non-residualising radiopharmaceuticals (e.g. covalently bound radiohalogens), on the contrary, are degraded and the radioactive isotope is released in the extracellular compartment. The latter results in a decrease in intracellular tumour uptake and a lower signal-to-noise ratio (1,2).

### Radiolabelled trastuzumab for HER2 imaging

HER2/*neu* belongs to the ErbB tyrosine kinase receptor family, which consists of four receptors: HER1-4. These receptors are composed of an extracellular binding domain, a transmembrane segment and an intracellular protein tyrosine kinase domain. Members of the HER family have growth stimulating activity, and play an important role in regulating cell growth, survival and differentiation. HER2/*neu* is

Table 1. Characteristics of antibody (based) radiopharmaceuticals

Ligand	Molecular weight (kDa)	Half-life time (hours)	Clearance organ	Relative tumor uptake	Optimal accumulation time	Technique	Isotopes suitable for imaging	Half-life (hr)
IgG	150	48-72	Liver	Highest	Days	SPECT	$^{111}\text{In}$ , $^{131}\text{I}$	67, 193
						PET	$^{64}\text{Cu}$ , $^{86}\text{Y}$ , $^{76}\text{Br}$ , $^{89}\text{Zr}$ , $^{124}\text{I}$	13, 15, 16, 78, 100
F(ab') <sub>2</sub>	100	24-48	Liver		Day	SPECT	$^{123}\text{I}$ , $^{111}\text{In}$ , $^{131}\text{I}$	13, 67, 193
						PET	$^{64}\text{Cu}$ , $^{86}\text{Y}$ , $^{76}\text{Br}$ , $^{89}\text{Zr}$ , $^{124}\text{I}$	13, 15, 16, 78, 100
Fab'	50	4	Kidney		Hours	SPECT	$^{99\text{m}}\text{Tc}$ , $^{123}\text{I}$	6, 13
						PET	$^{68}\text{Ga}$ , $^{18}\text{F}$ , $^{64}\text{Cu}$ , $^{86}\text{Y}$ , $^{76}\text{Br}$	1.1, 1.8, 13, 15, 16
Diabody	40	<4	Kidney		Hours	SPECT	$^{99\text{m}}\text{Tc}$	6
						PET	$^{68}\text{Ga}$ , $^{18}\text{F}$ , $^{64}\text{Cu}$	1.1, 1.8, 13
ScFv	20	1	Kidney	Lowest	Hour	SPECT	$^{99\text{m}}\text{Tc}$	6
						PET	$^{11}\text{C}$ , $^{68}\text{Ga}$ , $^{18}\text{F}$	0.3, 1.1, 1.8



genetically encoded by the *HER2/neu* proto-oncogene (*HER2/neu* or *c-erbB-2*) (6).

In normal cells, two copies of the *HER2/neu* gene are present. *HER2/neu*-overexpression (an increased number of receptors on the cell surface) and/or amplification (an increased number of copies of the *HER2/neu* gene per cell, resulting in *HER2/neu*-overexpression) has been detected in a wide range of human cancers, including breast (incidence 20-30%), colon, lung, and ovarian cancers. *HER2/neu* overexpression and amplification are associated with oncogenic transformation and in case of breast cancer, worse prognosis and more aggressive tumour behaviour in the clinic (7,8).

Trastuzumab is a recombinant humanized IgG1 monoclonal antibody directed against HER2, manufactured from a Chinese hamster ovary cell line. Trastuzumab is approved for treatment of patients with HER2 overexpressing breast cancer, both in the adjuvant and metastatic setting.

To allow in-vivo HER2 imaging, we developed radiolabelled trastuzumab. We started with trastuzumab, radiolabelled with  $^{111}\text{In}$  using DTPA as a chelator (9).  $^{111}\text{In}$ -DTPA-trastuzumab (labelling yield  $92.3 \pm 2.3\%$ , radiochemical purity  $97.0 \pm 1.5\%$ ) is stable in PBS when stored at  $4^\circ\text{C}$  for more than 14 days. The immunoreactive fraction determined by cell-binding assays, using the HER2-overexpressing human ovarian SK-OV-3 tumour cell line, was  $0.87 \pm 0.06$ . Biodistribution and tumour targeting were studied in HER2 receptor-positive and -negative tumour-bearing athymic mice. The HER2-positive tumour showed ( $9.77 \pm 1.14\%$  injected dose per gram (ID/g)) substantial uptake of the labelled antibody already after 5 h. The difference in uptake between HER2-positive versus -negative tumours was even more pronounced 3 days after injection ( $16.30 \pm 0.64\%$  ID/g), and was visualised by radioimmunoscintigraphy. Liver, spleen and kidney showed marked tracer uptake. In summary, trastuzumab can be efficiently radiolabelled with  $^{111}\text{In}$  with high labelling yields and high stability.  $^{111}\text{In}$ -DTPA-trastuzumab selectively binds to the human HER2 receptor both in vitro and in vivo in animals. Therefore,  $^{111}\text{In}$ -DTPA-trastuzumab appeared suitable for clinical use (9).

Trastuzumab can induce cardiotoxicity, particularly when combined with anthracyclines. Myocardial *HER2/neu* expression may be upregulated by a compensatory mechanism following cardiac stress, potentially explaining the cardiotoxicity which can occur following trastuzumab treatment (10).

Behr et al. suggested in a preliminary report that scanning with  $^{111}\text{In}$ -labelled trastuzumab could predict cardiotoxicity and therapeutic efficacy of trastuzumab in 20 patients with *HER2/neu* overexpressing metastatic breast cancer (11).

In the first clinical study from our group in *HER2*-positive metastatic breast cancer patients,  $^{111}\text{In}$ -DTPA-trastuzumab scintigraphy could not predict trastuzumab related cardiotoxicity; myocardial uptake was shown in only 1 of the 15 anthracycline-pre-treated patients (12). Because

the median time interval between the last anthracycline administrations in these patients was 11 months, it might well be that no uptake in the heart was seen because of the large time span between anthracycline administration and the immunoSPECT scan (12).

In a new study, we therefore performed  $^{111}\text{In}$ -DTPA-trastuzumab scans shortly after completion of anthracycline treatment in breast cancer patients and in patients with non anthracycline-related heart failure (13). Myocardial  $^{111}\text{In}$ -DTPA-trastuzumab uptake was observed in 5 out of 10 (50%) anthracycline-treated patients, who all were without symptoms. In addition in 10 non-oncological heart failure patients, no myocardial uptake was seen.  $^{111}\text{In}$ -DTPA-trastuzumab scintigraphy shortly after anthracycline therapy

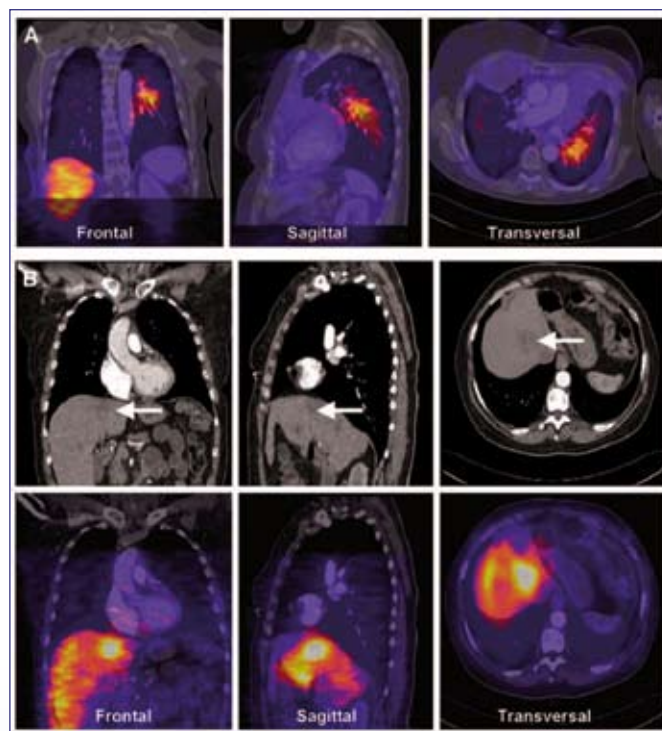


Figure 1. (A) Fused computed tomography (CT) with  $^{111}\text{In}$ -diethylenetriaminepenta-acetic acid anhydride ( $^{111}\text{In}$ -DTPA)-trastuzumab single-photon emission tomography (SPECT) image (96 hours after tracer injection). (B) CT images (top) of a patient with a large liver metastasis (4). Fusion with  $^{111}\text{In}$ -DTPA-trastuzumab SPECT (bottom) shows correspondence of liver metastases and SPECT hot spot. Reprinted with permission from the *American Journal of Clinical Oncology* from Perik PJ et al. (12) Figure 2.

potentially reflects a stress response. It potentially identifies patients susceptible for trastuzumab-related cardiotoxicity and thus may facilitate the optimal timing of trastuzumab therapy.  $^{111}\text{In}$ -DTPA-trastuzumab scintigraphy discovered new tumour lesions in 13 of 15 patients (figure 1), and may therefore be



of value for clinical staging with HER2/neu positive metastatic breast cancer (12).

In an attempt to further optimize HER2/neu imaging, PET was used instead of conventional nuclear medicine techniques, because of its higher spatial resolution and better signal-to-noise ratio (14). Zirconium-89 ( $^{89}\text{Zr}$ ), was considered a suitable PET isotope, since it has a sufficiently long half-life to match the relatively slow pharmacokinetics of an intact antibody and has been successfully used in humans. GMP produced  $^{89}\text{Zr}$  oxalate (>99.99% pure) is expected to be commercially available by the third quarter of 2008.

Trastuzumab has essentially been radiolabeled as described by Verel et al. (5). Radiochemical purity (rcp) and stability were determined by SEC-HPLC, immunoreactivity with a Lindmo assay. Biodistribution was performed in nude mice bearing HER2 positive (SKOV3) or HER2 negative (GLC4) xenografts. Five animals per group were co-injected with  $^{111}\text{In}$ -ITC-DTPA-trastuzumab and  $^{89}\text{Zr}$ -trastuzumab, imaged on a microPET (Focus 220) and sacrificed 144 hours post injection. The immunoreactive fraction of  $^{89}\text{Zr}$ -trastuzumab was 0.96, labelling efficiency > 90% and rcp > 95%.  $^{89}\text{Zr}$ -trastuzumab was stable for 7 days in buffer at 4 °C and in human serum at 37 °C. MicroPET imaging showed excellent tumour uptake and could easily detect metastases with a size approximating the spatial resolution of the microPET scanner.  $^{89}\text{Zr}$ - and  $^{111}\text{In}$ -ITC-DTPA-trastuzumab showed similar biodistribution. Highest uptake was found in HER2 positive tumours at 144 hours post injection (40% ID/g tissue for  $^{89}\text{Zr}$ -trastuzumab and 47% ID/g for  $^{111}\text{In}$ -ITC-DTPA-trastuzumab) compared to 8% ID/g tissue in HER2 negative control tumours. Liver uptake was low (8-12% ID/g tissue). Therefore it was concluded that  $^{89}\text{Zr}$ -trastuzumab is stable, shows excellent and specific tumour uptake and is suitable for clinical use (14).

In a clinical feasibility study,  $^{89}\text{Zr}$ -trastuzumab immunoPET is used to visualize HER2/neu positive lesions and to determine the minimal required trastuzumab dose for optimal imaging (14). HER2/neu positive metastatic breast cancer patients are eligible for the study. Patients are injected with  $^{89}\text{Zr}$ -trastuzumab at a total dose of 10, 50 or 200 mg trastuzumab and undergo PET-scanning, which is compared with available conventional imaging. In this ongoing feasibility study, so far eight patients with HER2/neu positive metastatic breast cancer have been included.  $^{89}\text{Zr}$ -trastuzumab uptake is strongly correlated with known tumour lesions in the brain, lung, liver and bone. The preliminary clinical data indicate excellent tumour uptake and a resolution unapproachable by  $^{111}\text{In}$ -DTPA-trastuzumab (14).

#### **In-vivo VEGF imaging with radiolabelled bevacizumab and ranibizumab**

Several factors are involved in the development and growth of tumours. Angiogenesis, the forming of new blood vessels, is one of these factors. New vasculature allows tumour cells to execute their critical growth by supplying the tumour with nutrients and oxygen, enabling disposal of metabolic waste

products and providing a route for metastatic spreading (15).

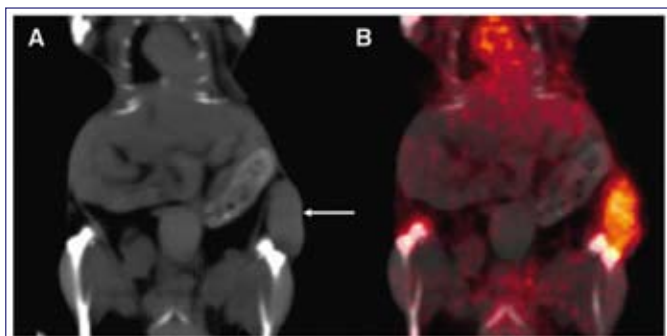
An important factor involved in angiogenesis is vascular endothelial growth factor A (hereafter referred as VEGF). VEGF consists of at least 4 splice variants, containing 121, 165, 189, and 206 amino acids. It is produced by tumour cells and induces tumour neovascularisation (16).

Overexpression of VEGF occurs in many human tumour types, which makes VEGF a rational target for antiangiogenic therapy. Antibodies binding to VEGF and its receptors, and chemical molecules that can block the tyrosine kinase function of VEGF receptors, have been developed.

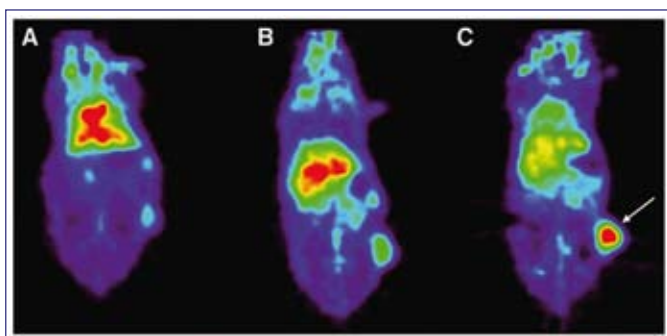
The drug that is currently most widely used in the clinic is the humanized monoclonal antibody bevacizumab (17). It blocks VEGF-induced endothelial cell proliferation, permeability, and survival, and it inhibits human tumour cell line growth in preclinical models. The likely mechanism is that bevacizumab binds to VEGF—both soluble and bound to the extracellular matrix—and thereby prevents VEGF binding to its receptors. Bevacizumab is approved for clinical use in metastatic colon carcinoma, breast carcinoma and non-small cell lung cancer. Approval for several other tumour types is expected soon. Despite the success of antiangiogenic therapy, a large percentage of patients does not benefit from this targeted therapy. Currently, it is impossible to predict which patient will benefit from antiangiogenic therapy. Reasons for treatment failure may be that the target for the drug is not present or that the drug may not reach the target. Non-invasive measurement of VEGF in the tumour might give insight to the available target for VEGF-dependent antiangiogenic therapy and thus assist in tumour response prediction. To allow in vivo VEGF imaging, we set up bevacizumab labelling with the relatively new long-lived PET isotope  $^{89}\text{Zr}$  and the widely available single -emitting isotope  $^{111}\text{In}$  (18).

In our preclinical study, we described the development and the in vivo evaluation of  $^{89}\text{Zr}$ -bevacizumab and  $^{111}\text{In}$ -bevacizumab in a tumour-bearing mouse model (18). Labelling, stability, and binding studies were performed. Nude mice with a human SKOV-3 ovarian tumour xenograft were injected with  $^{89}\text{Zr}$ -bevacizumab,  $^{111}\text{In}$ -bevacizumab, or human  $^{89}\text{Zr}$ -IgG. Human  $^{89}\text{Zr}$ -IgG served as an aspecific control antibody. Small-animal PET and microCT studies were obtained at 24, 72, and 168 h after injection of  $^{89}\text{Zr}$ -bevacizumab and  $^{89}\text{Zr}$ -IgG ( $3.5 \pm 0.5$  MBq,  $100 \pm 6$   $\mu\text{g}$ , 0.2 mL (mean  $\pm$  SD)). Small-animal PET and microCT images were fused to calculate tumour uptake and compared with ex vivo biodistribution at 168 h after injection (figure 2).

$^{89}\text{Zr}$ - and  $^{111}\text{In}$ -bevacizumab ex vivo biodistribution was compared at 24, 72, and 168 h after injection ( $2.0 \pm 0.5$  MBq each,  $100 \pm 4$   $\mu\text{g}$  in total, 0.2 mL). Labelling efficiencies, radiochemical purity, stability, and binding properties were optimal for the radioimmunoconjugates. Small-animal PET showed uptake in well-perfused organs at 24 h and clear tumour localization from 72 h onward (figure 3). Tumour uptake determined by quantification of small-animal PET images was higher for  $^{89}\text{Zr}$ -bevacizumab—namely,  $7.38 \pm$



**Figure 2.** Coronal CT image (A) with clear subcutaneous localization of SKOV-3 tumour (arrow). Fusion of microPET and CT images (B) (168 h after injection) enables adequate quantitative measurement of  $^{89}\text{Zr}$ -bevacizumab in the tumour. Reprinted by permission of the Society of Nuclear Medicine from Nagengast WB et al. (18) Figure 1.



**Figure 3.** Coronal planes of microPET images 24 h (A), 72 h (B), and 168 h (C) after injection of  $^{89}\text{Zr}$ -bevacizumab. At 24 h, most uptake is in well-perfused organs. In time, relative uptake in the tumour (arrow) increases. Reprinted by permission of the Society of Nuclear Medicine from Nagengast WB et al. (18) Figure 2.

2.06 %ID/g compared with  $3.39 \pm 1.16$  %ID/g (percentage injected dose per gram) for human  $^{89}\text{Zr}$ -IgG ( $P = 0.011$ ) at 168 h and equivalent to ex vivo biodistribution studies. Tracer uptake in other organs was seen primarily in liver and spleen.  $^{89}\text{Zr}$ - and  $^{111}\text{In}$ -bevacizumab biodistribution was comparable. In conclusion, radiolabelled bevacizumab showed higher uptake compared with radiolabelled human IgG in a human SKOV-3 ovarian tumour xenograft. Non-invasive quantitative small-animal PET was similar to invasive ex vivo biodistribution. Radiolabelled bevacizumab is a new tracer for non-invasive in vivo imaging of VEGF in the tumour microenvironment (18). A feasibility study in patients with recurrent melanoma and metastatic colon cancer has been started. Preliminary results of SPECT imaging using  $^{111}\text{In}$ -bevacizumab revealed tumour lesions in both recurrent melanoma and metastatic colon cancer patients (19).

Ranibizumab is a humanized Fab-fragment (48 kDa) with

high affinity for all VEGF-A isoforms. Being a Fab-fragment, ranibizumab is faster cleared from the circulation compared to bevacizumab. We hypothesize that this characteristic could lead to earlier imaging follow up after administration, allow serial imaging and result in a lower radiation dose for the patients compared to radiolabelled bevacizumab (20). Ranibizumab is radiolabelled with either  $^{111}\text{In}$ ,  $^{89}\text{Zr}$  or  $^{18}\text{F}$ . Labelling, stability and in-vitro immunoreactivity studies were performed. Thereafter, nude mice were inoculated with VEGF producing human SKOV-3 ovarian tumour cells. After tumour size reached 6-8 mm in diameter, a dose escalation study was performed using 3, 8 and 40  $\mu\text{g}$  of ranibizumab per mice. Radiolabelled Fab-IgG served as a control. MicroPET-, MicroCT and ex-vivo biodistribution studies were obtained at 1, 3, 6 and 24 hr post injection. Radiolabelling of ranibizumab resulted in adequate labelling efficiencies. The tracers were stable > 24 hr at 37°C in serum with preserved immunoreactivity. MicroPET images ( $^{18}\text{F}$ -ranibizumab and  $^{89}\text{Zr}$ -ranibizumab) showed rapid renal clearance with high kidney uptake of the Fab-fragment (>100% ID/g). Kidney uptake could be lowered by a co-injection of lysine. Tumour uptake was already high 6 hr post injection. The highest tumour uptake was seen with a low dose of ranibizumab (3  $\mu\text{g}$ ). Tumour uptake was significantly higher for radiolabelled ranibizumab compared to Fab-IgG with a tumour/blood (T/B) ratio of respectively  $5.72 \pm 0.93$  vs  $1.92 \pm 0.23$  ( $p=0.034$ ) 24 hr post injection, which is higher compared to radiolabelled bevacizumab (T/B ratio  $2.85 \pm 1.63$  at 168hr). Maximal tumour uptake (%ID/gram) was not affected by the fast clearance, with comparable uptake between  $^{89}\text{Zr}$ -ranibizumab (24 hr) and  $^{89}\text{Zr}$ -bevacizumab (168 hr), respectively  $5.49 \pm 1.42$  vs  $6.82 \pm 1.80$  %ID/g. Thus, radiolabelling of an anti-VEGF Fab-fragment with PET isotopes permits high resolution MicroPET imaging. Due to the fast biodistribution of radiolabelled ranibizumab, images could be made earlier after injection compared to radiolabelled bevacizumab. These results demonstrate that ranibizumab, an anti-VEGF Fab-fragment, could be a new tracer to visualize VEGF-levels for the evaluation of anti-VEGF targeted therapy (20).

Currently (clinical) studies are designed with the above described radiopharmaceuticals to evaluate the effect of other targeted drugs on VEGF levels.

### Summary and discussion

With the availability of innovative targeted drugs that rapidly enter the market, it is currently becoming more and more important to select the patients that might benefit from the targeted therapy. Initiating patient tailored therapy would improve treatment efficacy and reduce costs. The importance of patient selection offers a potential role for imaging with radiolabelled variants of these targeted drugs. For several reasons molecular radionuclide imaging is a great challenge.


The technique is non-invasive and might give important

information about disease activity and efficacy of therapeutic intervention. Furthermore imaging enables us to illustrate whether the drug reaches the target and allows the analysis of whole body pharmacokinetic behaviour. This approach is illustrated with two examples of our work with radiolabelled trastuzumab and radiolabelled bevacizumab for HER2 imaging and VEGF imaging, respectively.

## Acknowledgements

The work reviewed in this paper is supported by grants from the Dutch Cancer Society and performed as close collaboration between the departments of Medical Oncology (prof. dr. EGE de Vries, dr. GA Hospers, WB Nagengast, T. Oude Munnik), Nuclear Medicine and Molecular Imaging (prof. dr. RA Dierckx, dr. AH Brouwers, dr. JR de Jong) and Hospital and Clinical Pharmacy (dr. JGW Kosterink, ECF Dijkers).

## References

- van Dongen GA, Visser GW, Lub-De Hooge MN, de Vries EG, Perk LR. Immuno-PET: A Navigator in Monoclonal Antibody Development and Applications. *Oncologist* 2007; 12:1379-89.
- Dijkers ECF, de Vries EGE, Kosterink JGW, Brouwers AH, Lub-de Hooge MN. Immunoscintigraphy as potential tool in the clinical evaluation of HER2/neu targeted therapy. *Curr Pharm Des* 2008; in press.
- Wu AM, Olafsen T. Antibodies for molecular imaging of cancer. *Cancer J* 2008;14:191-7.
- Holliger P, Hudson PJ. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol* 2005;23:1126-36.
- Verel I, Visser GW, Boellaard R, Stigter-van WM, Snow GB, van Dongen GA. 89Zr immuno-PET: comprehensive procedures for the production of 89Zr-labelled monoclonal antibodies. *J Nucl Med* 2003; 44:1271-81.
- Gross ME, Shazer RL, Agus DB. Targeting the HER-kinase axis in cancer. *Semin Oncol* 2004; 31(1 Suppl 3):9-20.
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987; 235:177-82.
- Pegram MD, Pauletti G, Slamon DJ. HER-2/neu as a predictive marker of response to breast cancer therapy. *Breast Cancer Res Treat* 1998;52:65-77.
- Lub-De Hooge MN, Kosterink JG, Perik PJ, Nijhuis H, Tran L, Bart J et al. Preclinical characterisation of <sup>111</sup>In-DTPA-trastuzumab. *Br J Pharmacol* 2004; 143:99-106.
- Chien KR. Herceptin and the heart—a molecular modifier of cardiac failure. *N Engl J Med* 2006;354:789-90.
- Behr TM, Béhé M, Wörmann B. Trastuzumab and breast cancer. *N Engl J Med* 2001;345:995-6.
- Perik PJ, Lub-De Hooge MN, Gietema JA, van der Graaf WT, de Korte MA, Jonkman S et al. Indium-111-labelled trastuzumab scintigraphy in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24:2276-82.
- de Korte MA, de Vries EG, Lub-De Hooge MN, Jager PL, Gietema JA, van der Graaf WT et al. 111Indium-trastuzumab visualises myocardial human epidermal growth factor receptor 2 expression shortly after anthracycline treatment but not during heart failure: a clue to uncover the mechanisms of trastuzumab-related cardiotoxicity. *Eur J Cancer* 2007; 43:2046-51.
- Dijkers ECF, Lub-De Hooge MN, Kosterink JG, Jager PL, Brouwers AH, Perk LR et al. Characterization of 89Zr-trastuzumab for clinical HER2 immunoPET imaging. *J Clin Oncol* 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition) 2007; 25(18S):Abstract # 3508.
- Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990;82:4-6.
- Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004;25:581-611.
- Wang Y, Fei D, Vanderlaan M, Song A. Biological activity of bevacizumab, a humanized anti-VEGF antibody in vitro. *Angiogenesis* 2004;7:335-45.
- Nagengast WB, de Vries EG, Hospers GA, Mulder NH, de Jong JR, Hollema H et al. In vivo VEGF imaging with radiolabeled bevacizumab in a human ovarian tumor xenograft. *J Nucl Med* 2007;48:1313-9.
- Nagengast WB, Lub-de Hooge MN, Hospers GA, Brouwers AH, Hoekstra HJ, Elsinga PH et al. Towards clinical VEGF imaging using the anti-VEGF antibody bevacizumab and Fab-fragment ranibizumab. *J Clin Oncol* 2008; (May 20 suppl; abstr 3547).
- Nagengast WB, De Vries EG, Warnders F, Hospers GAP, Mulder NH, De Jong JR et al. In vivo VEGF imaging with an anti-VEGF Fab-fragment in a human ovarian tumor xenograft model using MicroPET and MicroCT. In: Proceedings of the 99th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 2008 Apr 12-16; San Diego, CA. Philadelphia (PA): AACR; 2008. Abstract 3161. 

# Scintigraphic imaging of angiogenesis



Prof.dr. O.C. Boerman<sup>1</sup>



Drs. T. Stollman<sup>2</sup>



Prof.dr. W.J.G. Oyen<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Nuclear Medicine

<sup>2</sup>Department of Surgery

Radboud University Nijmegen Medical Centre  
The Netherlands

## Abstract

### Boerman OC, Stollman T, Oyen WJ. Scintigraphic imaging of angiogenesis

Angiogenesis, the formation of new blood vessels, is a multi-step process regulated by pro- and anti-angiogenic factors. In order to grow and metastasize, tumors need a constant supply of oxygen and nutrients. For their growth beyond the size of 1-2 mm tumors are dependent on angiogenesis. Recently, various new anti-cancer agents (e.g. bevacizumab, sorafenib and sunitinib) have become available that specifically inhibit angiogenesis in tumors. To evaluate the effects of these new anti-angiogenic agents it would be of interest to scintigraphically to image the process of angiogenesis in tumors.

Several markers have been described that are preferentially expressed on newly formed blood vessels in tumors ( $\alpha_v\beta_3$  integrin, vascular endothelial growth factor and its receptor, prostate-specific membrane antigen) and in the extracellular matrix surrounding newly formed blood vessels (extra domain B of fibronectin, Tenascin-C, matrix metalloproteinases, Robo-4). Several ligands targeting these markers have been tested as a radiotracer for imaging angiogenesis in tumors.

The potential of some of these tracers such as radiolabeled cyclic RGD peptides and radiolabeled anti-PSMA antibodies has already been tested in cancer patients, while for markers such as Robo-4 the ligand has not yet been identified. Here the preclinical and clinical studies with these new tracers to image angiogenesis in tumors are reviewed.

**Tijdschr Nucl Geneesk 2008; 30(4):117-123**

## Introduction

Angiogenesis is defined as the formation of new blood vessels from existing ones. This process is essential if solid tumors are to grow beyond 2 to 3 mm<sup>3</sup>, at which size diffusion is no longer sufficient to supply the tissue with oxygen and nutrients (1). A growing tumor is able to initiate angiogenesis. Tumor-induced angiogenesis is a complex multistep process that follows a characteristic sequence of events mediated and controlled by growth factors, cellular receptors and adhesion molecules (2-4). In this process, five phases can be distinguished: 1. endothelial cell activation, 2. basement membrane degradation, 3. endothelial cell migration, 4. vessel formation, and 5. angiogenic remodeling (5). The activation of pre-existing quiescent vessels can be triggered by hypoxia. Hypoxia induces the expression of hypoxia inducible factor (HIF), which binds to the hypoxic response element. As a result, the expression of hypoxia inducible genes, such as vascular endothelial growth factor (VEGF), carbonic anhydrase IX (CAIX), platelet derived growth factor (PDGF), transforming growth factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), a.o. is induced (6). Activated endothelial cells express the dimeric transmembrane integrin  $\alpha_v\beta_3$ , which interacts with extracellular matrix proteins (vitronectin, tenascin, fibronectin, a.o.) and regulates migration of the endothelial cell through the extracellular matrix during vessel formation (7;8). The activated endothelial cells synthesize proteolytic enzymes, such as matrix metalloproteinases (MMPs), used to degrade the basement membrane and the extracellular matrix (9). Initially, endothelial cells assemble as solid cords. Subsequently, the inner layer of endothelial cells undergoes apoptosis leading to the formation of the vessel lumen. Finally this primary, immature vasculature undergoes extensive remodeling during which the vessels are stabilized by pericytes and smooth muscle cells. This step is often incomplete in tumors resulting in the characteristic, increased permeability of tumor vessels.

Based on a balance between proangiogenic and



antiangiogenic factors, a tumor can stay dormant for a very long time period until the so-called 'angiogenic switch' occurs. In most tissues tumors can only grow to a life threatening size if the tumor is able to trigger angiogenesis. In tissues with high vessel densities, tumors may also progress via angiogenesis-independent co-option of the pre-existent vasculature (10).

### Anti-angiogenic therapy

The initial recognition of angiogenesis being a therapeutically interesting process began in the area of oncology in the early 1970s, when Folkman and Denekamp put forward the idea that tumors are highly vascularized and thereby vulnerable at the level of their blood supply. In those early years, it was already hypothesized that the process of angiogenesis might be a target for therapy. It was only after the discovery of the first compounds with specific angiostatic effects in the early 1990s that the research field of angiogenesis rapidly expanded and provided an increasing body of evidence that inhibition of angiogenesis could attenuate tumor growth. It is estimated that currently more than 300 compounds are being investigated for their potential anti-angiogenic effect, and a large series of inhibitors of angiogenesis have shown great potential in the treatment of cancer in (pre)clinical studies. Three agents have recently been registered as cancer therapeutics:

- Bevacizumab, the humanized anti-VEGF monoclonal antibody was registered for the treatment of colon, lung and breast cancer when used in combination with chemotherapeutics (11-13)
- Sorafenib and Sunitinib, two inhibitors of the tyrosine kinase activity of the VEGF and PDGF receptor were registered for the treatment of metastasized renal cell carcinoma (14;15).

In summary, tumor-induced angiogenesis is a multi-step process and a key feature of a tumor lesion that has major impact on the biologic behavior of the lesion. Inhibition of angiogenesis is a new cancer treatment strategy that is now widely investigated clinically. Researchers have begun to search for objective measures that indicate pharmacological responses to anti-angiogenic drugs.

Therefore there is a great interest in techniques to visualize angiogenesis in growing tumors *in vivo*. During the past decade several markers of angiogenesis have been identified and specific tracers targeting these markers have been developed. Here, the characteristics of these tracers are reviewed.

### Markers and scintigraphic tracers of angiogenesis

Several (glyco)proteins have been identified that are specifically expressed on activated endothelial cells or in the extracellular matrix surrounding the tumor vasculature. Most of these markers have been tested as targets for imaging probes.

### $\alpha_v\beta_3$ Integrin

Integrins are a family of glycoproteins, that function in cellular adhesion, migration and signal transduction. Each member of this large family consists of two non-covalently bound transmembrane polypeptides ( $\alpha$  and  $\beta$ ). Up till now more than 20 different integrins have been identified. The term integrin is derived from the ability of these proteins to link the extracellular matrix proteins with the intracellular cytoskeleton (16). The integrin  $\alpha_v\beta_3$  binds to a variety of extracellular matrix proteins (e.g. vitronectin, fibrinogen, laminin, collagen) through their exposed Arginine-Glycine-Aspartic acid (RGD) amino acid sequence (17).  $\alpha_v\beta_3$  is minimally expressed on normal quiescent endothelial cells, but significantly upregulated on proliferating endothelium (18). It was found that peptides and antibodies that specifically bind  $\alpha_v\beta_3$  induced endothelial cell apoptosis, indicating that this integrin plays a vital role in endothelial cell survival during angiogenesis (19).

The tripeptidic sequence, Arg-Gly-Asp (RGD), naturally present in extracellular matrix proteins, is the primary binding site of the  $\alpha_v\beta_3$  integrin. Based on the RGD tripeptide sequence, a series of small peptides have been designed as ligands to target the  $\alpha_v\beta_3$  integrin. Kessler et al. showed that particularly cyclic pentapeptides containing the RGD sequence have a relatively high affinity for the  $\alpha_v\beta_3$  integrin. The cyclic pentapeptide Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val (cRGDfV) was a 100-fold better inhibitor of cell adhesion to vitronectin than the linear variant and had an affinity for  $\alpha_v\beta_3$  in the nanomolar range (20). For the first *in vivo* evaluation of cyclic RGD peptides as a scintigraphic tracer, Haubner et al. synthesized a series of radioiodinated RGD peptides using cyclo(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Val) as the lead compound. These peptides were lipophilic and were cleared via the hepatobiliary route, resulting in high activity concentration in liver and intestines (21). Several compounds were synthesized with the aim to improve the pharmacokinetic characteristics of the peptides. By glycosylation with glucose (22) or galactose (23) and by including more hydrophilic amino acid residues in the peptides (24) a series of RGD peptides were developed that were eliminated almost exclusively via the kidneys. Evaluation of these peptides was performed in mice using a xenotransplanted human melanoma model (M21). Initial liver uptake of the glycosylated  $^{125}\text{I}$ -cRGDyV peptide was 10-fold lower than that of the non-glycosylated  $^{125}\text{I}$ -cRGDyV (at 10 min post injection, uptake was  $22 \pm 2.8\%$  ID/g and  $2.6 \pm 0.2\%$  ID/g, respectively). The blood clearance of the glycosylated peptide was approximately threefold faster. Tumor uptake of the glycosylated peptide was higher at all time points. At 240 min after tracer injection, tumor uptake was  $1.7 \pm 0.5\%$  ID/g, whereas it was only  $0.4 \pm 0.2\%$  ID/g for the non-glycosylated peptide.

While most cyclic RGD-peptides are monomers, Janssen et al. were the first to synthesize a dimeric RGD-peptide. Two cyclic pentapeptides c(RGDfK) were linked via a glutamic acid residue resulting in the peptide E-[c(RGDfK)]<sub>2</sub>. In a xenograft mouse model, the cRGD-peptides specifically accumulated in



$\alpha_v\beta_3$  expressing tumors (25). Dimerization resulted in higher uptake, presumably due to the bivalent interaction with the target cell (26). The same group compared the  $\alpha_v\beta_3$  binding characteristics of monomeric, dimeric and tetrameric RGD peptides *in vitro* and *in vivo*.

Multimerization resulted in enhanced affinity for  $\alpha_v\beta_3$  *in vitro*. *In vivo* evaluation was performed in mice with SK-RC-52 xenografts. The monomeric, dimeric and tetrameric compounds all cleared rapidly from the blood. At 8 hours post injection, tumor uptake of the tetramer ( $7.4 \pm 1.1\%$  ID/g) was significantly higher than that of the monomer ( $2.3 \pm 0.3\%$  ID/g) and the dimer ( $5.2 \pm 1.2\%$  ID/g) (27).

The compound  $^{99m}\text{Tc-NC100692}$  is one of the few cyclic RGD peptides for SPECT that has been tested in patients thus far. Nineteen of 22 malignant breast lesions in humans (86%) could be detected by scintigraphic imaging after administration of  $^{99m}\text{Tc-NC100692}$ . The use of this tracer has been proved to be safe and well tolerated in subjects with breast cancer, but further studies are warranted to assess the clinical potential (28).

In clinical practice PET has higher resolution than SPECT imaging and images can be accurately analyzed quantitatively (29). The group in Munich has developed an  $^{18}\text{F}$ -labeled cyclic RGD compound using a galactose group as a pharmacokinetic modifier. Initial *in vivo* evaluation was done using the human melanoma M21 model. Using this model,  $^{18}\text{F}$ -galacto-RGD demonstrated receptor selective accumulation. PET imaging studies showed that non-invasive determination of  $\alpha_v\beta_3$  expression with radiolabeled RGD peptides was feasible in mice with s.c. melanomas (22;23).

DOTA-conjugated RGD peptides were also labeled with the positron emitters  $^{64}\text{Cu}$  and  $^{68}\text{Ga}$ . Chen et al. used PEGylation and polyvalency to optimize the tumor targeting efficiency and pharmacokinetics of the  $^{64}\text{Cu}$  labeled RGD peptides. In lung cancer models these peptides gave high-quality lung tumor images due to the minimal non-specific activity accumulation in normal lung tissue and the heart (30). Decristoforo et al. demonstrated that  $\alpha_v\beta_3$  expression in tumors could be imaged with  $^{68}\text{Ga}$ -galacto-RGD (31). The much easier radiosynthesis compared to  $^{18}\text{F}$ -galacto-RGD would make it an attractive alternative. However, due to higher blood pool activity,  $^{18}\text{F}$ -galacto-RGD remains superior for imaging  $\alpha_v\beta_3$  expression.  $^{18}\text{F}$ -galacto-RGD was extensively characterized in various groups of cancer patients. A study in nine patients showed that  $\alpha_v\beta_3$  expression in human tumors can be imaged with good tumor/background ratios (32). The compound cleared predominantly via the kidneys, resulting in low background activity in most regions of the body. The same group also studied, if  $^{18}\text{F}$ -galacto-RGD uptake in tumors correlated with  $\alpha_v\beta_3$  expression levels. Nineteen patients with solid tumors were examined with PET before resection of the tumor lesions. SUVs and tumor/blood ratios were found to correlate significantly with the intensity of immunohistochemical staining and microvessel density (33).

### VEGF and VEGF-receptors

The most prominent mediator of tumor angiogenesis is VEGF-A, usually referred to as VEGF (34). The human VEGF-A gene is organized in nine exons, separated by eight introns and localized on chromosome 6p21.3 (35). Alternative splicing results in the generation of six isoforms, having 121, 145, 165, 183, 189 and 206 amino acids, respectively, after signal-sequence cleavage. VEGF165 is the most predominant isoform: it is secreted, but a significant portion is bound to heparin sulphate proteoglycans on the cell surface and in the extracellular matrix (36). VEGF signals through the VEGF receptor 2 (VEGFR-2) (37).

Bevacizumab is a humanized variant of the anti-VEGF-A monoclonal antibody (mAb) A.4.6.1. It is directed against a common epitope encoded by exon 4, present on all VEGF-isoforms, and prevents interaction with VEGFR-1 and VEGFR-2 (38). Nagengast et al. were the first to demonstrate non-invasive VEGF imaging using radiolabeled bevacizumab. They illustrated the potential of  $^{89}\text{Zr}$ -bevacizumab and  $^{111}\text{In}$ -bevacizumab as a specific VEGF tracer in nude mice with human SKOV-3 ovarian tumor xenografts (39). At the same time, our group showed specific imaging of VEGF-A expression using  $^{111}\text{In}$ -bevacizumab in mice with s.c. human colon carcinoma xenografts LS174T (40). We were the first to investigate the potential of  $^{111}\text{In}$ -labeled bevacizumab to image the expression of VEGF-A in tumors clinically. In a study in colorectal cancer patients with liver metastases, the liver metastases in nine out of 12 patients were visualized with  $^{111}\text{In}$ -bevacizumab. In this study, the liver metastases were resected after scintigraphic imaging allowing further immunohistochemical analysis. The VEGF-A expression in these resected liver metastases was determined by *in situ* hybridization and by ELISA. Surprisingly, no correlation was found between the level of antibody accumulation and expression of VEGF-A. This may be due to the inability to visualize the soluble VEGF121 isoform and the enhanced vascular permeability in tumors (41).

Cai et al. labeled VEGF121 with  $^{64}\text{Cu}$  for PET imaging of VEGFR-2 expression (42). Small-animal PET imaging revealed rapid, specific, and prominent uptake of  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-VEGF121 in highly vascularized small U87MG human glioblastoma tumors, but significantly lower and sporadic uptake in large U87MG tumors.

### Prostate-specific membrane antigen (PSMA)

Prostate-specific membrane antigen (PSMA) is a transmembrane protein first characterized in prostate cancer. The PSMA antibody, capromab pendetide, labeled with  $^{111}\text{In}$  is marketed as ProstaScint, an FDA-approved antibody preparation for the detection of nodal metastases in prostate cancer patients (43). However, this antibody is directed against an intracellular epitope of PSMA, which is considered a suboptimal target for antibody imaging. PSMA was found to be expressed on the neovascular endothelium of most solid tumor types, while there is no expression on the endothelial

cells of normal tissue (44).

J591 is a monoclonal antibody directed against an epitope on the extracellular domain of PSMA (45). Previous studies have shown that J591 accumulated in metastatic prostate cancer lesions (46). In a recent phase I trial the feasibility of targeting neovasculature of a wide range of adenocarcinomas using  $^{111}\text{In}$ -labeled humanized J591 was investigated. Patients with melanoma and cancers of the breast, colon liver and kidney were injected with  $^{111}\text{In}$ -J591. In these patients (n=24) the antibody accreted in all known tumor sites. Seventeen of 18 (94%) patients with soft tissue disease on standard scans showed uptake in the soft tissues on antibody scans as did 6 of 6 patients with bone disease. These data show selective targeting of PSMA expressed on tumor endothelium (47).

$^{111}\text{In}$ -huJ591 has the potential to become a suitable tracer for imaging angiogenesis.

More recently, the first PET imaging agent for PSMA was synthesized. In extension of their previous work with the  $^{11}\text{C}$ -labeled DCMC, that binds to the active carboxy peptidase site of PSMA (48), Mease et al. synthesized an agent containing  $^{18}\text{F}$ ;  $^{18}\text{F}$ -DCFBC.  $^{18}\text{F}$ -DCFBC was demonstrated to localize in PSMA-expressing tumors in mice, permitting imaging by small animal PET (49).

#### Extracellular matrix proteins

A few antigens in the extracellular matrix (ECM) have been identified that are preferentially expressed in the surroundings of newly formed blood vessels.

#### Extra domain B of fibronectin

Fibronectin is a large glycoprotein in the ECM. The extra-domain B (ED-B) of fibronectin is a sequence of 91 amino acids, identical in mice, rats and humans, that can be inserted into the fibronectin molecule at sites of tissue remodeling by alternative splicing. ED-B is specifically expressed around neovascular structures in tumors and other tissues undergoing angiogenesis, such as the endometrium in the proliferative phase and some ocular structures in pathological conditions, but is undetectable in the normal adult tissues (50). Using phage display technology, single chain antibodies (scFv) directed against ED-B have been isolated (51;52). The human antibody fragment scFv (L19) was shown to have subnanomolar affinity for ED-B (53).

Demartis et al. showed that radioiodinated scFv (L19) selectively accumulated around tumoral blood vessels in a murine tumor model. Since the ED-B domain of fibronectin has an identical sequence in mouse and man, they suggested clinical utility for the scintigraphic detection of angiogenesis *in vivo* (54). Two years later, it was shown by scintigraphic imaging that  $^{125}\text{I}$ -L19 selectively localized in tumor lesions of aggressive lung cancer as well as in liver metastases of colorectal cancer patients (55). More recently, the amino-acid sequence (Gly)3-Cys-Ala was inserted at the C-terminus of L19, resulting in the anti-ED-B scFv named AP39, which

could be labeled with  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ . The data revealed the feasibility of targeting ED-B fibronectin with  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  labeled L19 in nude mice with s.c. teratocarcinoma tumors (56).

Subsequently a series of different L19 formats were constructed, including dimeric scFv, a human bivalent "small immunoprotein" (SIP) and a complete human IgG. In comparing these different formats labeled with  $^{125}\text{I}/^{131}\text{I}$ , L19-SIP proved to be the most suitable tracer for imaging ED-B expression in tumors. (57). In 2007 Rossin et al. described  $^{76}\text{Br}$ -L19-SIP, the first PET imaging derivative of L19 for imaging of neovasculature in xenograft bearing nude mice. Besides clear tumor targeting,  $^{76}\text{Br}$ -L19-SIP also showed persistent activity in blood, stomach and several other normal organs, most probably due to *in vivo* debromination (58).

#### Extra domain C of Tenascin

Tenascin is an extracellular matrix component. Tenascin-C containing the extra domain C is a splice variant of tenascin. Overexpression of this splice variant has been reported in high-grade astrocytomas, with a prominent pattern of staining around tumor neo-vasculature. In contrast, domain C was undetectable in normal human tissues and by immunohistochemistry and even at the level of Northern blot analysis (59).

Recently, Silacci et al. reported that the extra domain C is strongly expressed in the majority of lung cancers, with a vascular and stromal pattern of expression. Using antibody phage technology, they have generated a high-affinity human antibody fragment (G11) which was shown to selectively target tenascin-C in subcutaneous U87 gliomas in mice (60). These results pave the way for the clinical development of the G11 antibody for imaging angiogenesis.

#### MMPs and MMPis

Matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of more than 20 extracellular proteins that are capable of degrading the multiple components of the extracellular matrix (ECM). These enzymes are expressed during angiogenesis and tumor progression. MMPs are normally expressed at very low levels. However, when active tissue remodeling occurs, MMPs are rapidly upregulated (61). In epithelial tumors most of the upregulated MMPs are expressed by the host stromal cells (62). MMPs are often associated with the removal of the ECM barrier to allow cancer cells and endothelial cells to invade the tissue. A number of MMPs are involved in angiogenesis including MMPs 1, 2, 3, 9 and 14.

Using phage display libraries Koivunen et al. found that CTTHWGFTLC, a disulfide bridged decapeptide, selectively inhibited MMP2 and MMP9 (63). The radioiodinated decapeptide was evaluated as a tracer for imaging MMP2 and MMP9 activity. However, *in vivo* studies demonstrated high lipophilicity resulting in moderate activity uptake in the tumor and high uptake in liver and kidneys. Furomoto et al. labeled

the MMP-2 inhibitor, SAV03, with fluorine-18 ( $^{18}\text{F}$ -SAV03) (64). The biodistribution of  $^{18}\text{F}$ -SAV03 and its methyl ester derivative,  $^{18}\text{F}$ -SAV03M, were studied in nude mice with s.c. Ehrlich tumors. The tumor uptake of the methyl ester derivative was higher than that of the original compound  $^{18}\text{F}$ -SAV03.

### Magic roundabout (Robo-4)

Magic roundabout (Robo-4) is the fourth recently identified member of the roundabout receptor family (65). Robo-1-3 are highly expressed in the nervous system and are involved in axon guidance (66). The specificity of Robo-4 expression, however, is unique compared with the other three members; it is highly expressed in embryonic vasculature, but not in the nervous system (67). Robo-4 induces endothelial migration and regulates angiogenesis. Some reports suggest that Robo-4 is expressed exclusively in tumor neovascular endothelium, and currently Robo-4 is considered a highly specific marker of tumor endothelium (68). The ligand of Robo-4 has not been identified yet. It does not bind to slit2, the common ligand of Robo-1-3 (69). Further studies are needed to identify the ligands and elucidate Robo-4 mediated signaling. Based on these ligand(s) a tracer could be developed that can image expression of Robo-4 in tumors.

### Summary and conclusion

Clinical trials of anti-angiogenic drugs are challenging because there is no established method to monitor the effect of these drugs. It has been suggested that the maximum tolerated dose of anti-angiogenic drugs is not necessarily the most effective (70). Establishing the optimal dose of an anti-angiogenic agent based on tumor size measurements or on time to disease progression may take months or years (71). Furthermore, in patients tumors typically develop resistance to anti-angiogenic drugs after 6 to 12 months of treatment (72). Surrogate markers of angiogenesis are considered to be useful, not only for the stratification of patients for treatment with anti-angiogenic drugs, but also to determine optimal dosing, early clinical benefit and the development of resistance. Biomarkers could also become essential to justify the cost of targeted therapies, by increasing the likelihood of benefit to a level that is acceptable to patients and clinicians. An ideal marker of angiogenesis would be expressed exclusively by the tumor vasculature and the ideal tracer has high sensitivity, and specificity for this marker. Numerous markers of tumor vasculature have been identified, but only a few radiotracers of angiogenesis have been tested clinically. The most extensively studied marker of angiogenesis is the integrin  $\alpha_v\beta_3$ . For this marker the SPECT-tracer,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -NC100692, and the PET-tracer  $^{18}\text{F}$ -galacto-RGD have been successfully tested in humans. Other targets exclusively expressed on activated endothelial cells may eventually be better targets for imaging angiogenesis. Of the identified markers, PSMA and Robo-4 seem to be specifically expressed on tumor neovasculature.

$^{111}\text{In}$ -huJ591, a monoclonal antibody directed against an epitope on the extracellular domain of PSMA, specifically visualized expression of PSMA in the neovasculature of a wide range of adenocarcinomas in patients.

In conclusion, a few radiotracers for imaging angiogenesis in tumors have been tested in humans. The role of these tracers in assessing the response to antiangiogenic therapies has yet to be assessed.

### References

1. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Prog Horm Res* 2000;55:15-35.
2. Kuwano M, Fukushi J, Okamoto M, Nishie A, Goto H, Ishibashi T, et al. Angiogenesis factors 1. *Intern Med* 2001 Jul;40(7):565-72.
3. Ellis LM, Liu W, Ahmad SA, Fan F, Jung YD, Shaheen RM, et al. Overview of angiogenesis: Biologic implications for antiangiogenic therapy 1. *Semin Oncol* 2001 Oct;28(5 Suppl 16):94-104.
4. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation 2. *Nature* 2000 Sep 14;407(6801):242-8.
5. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000 Apr;6(4):389-95.
6. Harris AL. Hypoxia—a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002 Jan;2(1):38-47.
7. Eliceiri BP, Cheresh DA. The role of alphav integrins during angiogenesis 6. *Mol Med* 1998 Dec;4(12):741-50.
8. Hynes RO, Bader BL, Hoidalva-Dilke K. Integrins in vascular development. *Braz J Med Biol Res* 1999 May;32(5):501-10.
9. Pepper MS. Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis 7. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001 Jul;21(7):1104-17.
10. Leenders WP, Kusters B, de Waal RM. Vessel co-option: how tumors obtain blood supply in the absence of sprouting angiogenesis. *Endothelium* 2002;9(2):83-7.
11. Bevacizumab (Avastin) for metastatic breast cancer 1. *Med Lett Drugs Ther* 2008 Jun 2;50(1287):42-3.
12. Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, Novotny W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2004 May;3(5):391-400.
13. Tyagi P. Bevacizumab, when added to paclitaxel/carboplatin, prolongs survival in previously untreated patients with advanced non-small-cell lung cancer: preliminary results from the ECOG 4599 trial. *Clin Lung Cancer* 2005 Mar;6(5):276-8.
14. Clark JW, Eder JP, Ryan D, Lathia C, Lenz HJ. Safety and pharmacokinetics of the dual action Raf kinase and vascular endothelial growth factor receptor inhibitor, BAY 43-9006, in patients with advanced, refractory solid tumors. *Clin Cancer Res* 2005 Aug 1;11(15):5472-80.
15. Motzer RJ, Michaelson MD, Redman BG, Hudes GR, Wilding G, Figlin RA, et al. Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2006 Jan 1;24(1):16-24.

16. Tamkun JW, DeSimone DW, Fonda D, Patel RS, Buck C, Horwitz AF, et al. Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin 2. *Cell* 1986 Jul 18;46(2):271-82.
17. Ross FP, Chappel J, Alvarez JI, Sander D, Butler WT, Farach-Carson MC, et al. Interactions between the bone matrix proteins osteopontin and bone sialoprotein and the osteoclast integrin alpha v beta 3 potentiate bone resorption. *J Biol Chem* 1993 May 5;268(13):9901-7.
18. Brooks PC, Clark RA, Cheresh DA. Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science* 1994 Apr 22;264(5158):569-71.
19. Brooks PC, Montgomery AM, Rosenfeld M, Reisfeld RA, Hu T, Klier G, et al. Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 1994 Dec 30;79(7):1157-64.
20. Aumailley M, Gurrath M, Muller G, Calvete J, Timpl R, Kessler H. Arg-Gly-Asp constrained within cyclic pentapeptides. Strong and selective inhibitors of cell adhesion to vitronectin and laminin fragment P1. *FEBS Lett* 1991 Oct 7;291(1):50-4.
21. Haubner R, Wester HJ, Reuning U, Senekowitsch-Schmidtke R, Diefenbach B, Kessler H, et al. Radiolabeled alpha(v)beta3 integrin antagonists: a new class of tracers for tumor targeting. *J Nucl Med* 1999 Jun;40(6):1061-71.
22. Haubner R, Wester HJ, Burkhart F, Senekowitsch-Schmidtke R, Weber W, Goodman SL, et al. Glycosylated RGD-containing peptides: tracer for tumor targeting and angiogenesis imaging with improved biokinetics. *J Nucl Med* 2001 Feb;42(2):326-36.
23. Haubner R, Kuhnast B, Mang C, Weber WA, Kessler H, Wester HJ, et al. [18F]Galacto-RGD: synthesis, radiolabeling, metabolic stability, and radiation dose estimates. *Bioconj Chem* 2004 Jan;15(1):61-9.
24. Haubner R. Alphavbeta3-integrin imaging: a new approach to characterise angiogenesis? *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2006 Jul;33 Suppl 1:54-63.
25. Janssen ML, Oyen WJ, Dijkgraaf I, Massuger LF, Frielink C, Edwards DS, et al. Tumor targeting with radiolabeled alpha(v)beta(3) integrin binding peptides in a nude mouse model. *Cancer Res* 2002 Nov 1;62(21):6146-51.
26. Janssen M, Oyen WJ, Massuger LF, Frielink C, Dijkgraaf I, Edwards DS, et al. Comparison of a monomeric and dimeric radiolabeled RGD-peptide for tumor targeting. *Cancer Biother Radiopharm* 2002 Dec;17(6):641-6.
27. Dijkgraaf I, Kruijtz JA, Liu S, Soede AC, Oyen WJ, Corstens FH, et al. Improved targeting of the alpha(v)beta (3) integrin by multimerisation of RGD peptides 6. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2007 Feb;34(2):267-73.
28. Bach-Gansmo T, Bogsrud TV, Skretting A. Integrin scintimammography using a dedicated breast imaging, solid-state gamma-camera and Tc-labelled NC100692 1. *Clin Physiol Funct Imaging* 2008 Jul;28(4):235-9.
29. Weber WA. Positron emission tomography as an imaging biomarker. *J Clin Oncol* 2006 Jul 10;24(20):3282-92.
30. Chen X, Sievers E, Hou Y, Park R, Tohme M, Bart R, et al. Integrin alpha v beta 3-targeted imaging of lung cancer. *Neoplasia* 2005 Mar;7(3):271-9.
31. Decristoforo C, Hernandez G, I, Carlsen J, Rupprich M, Huisman M, Virgolini I, et al. 68Ga- and 111In-labelled DOTA-RGD peptides for imaging of alphavbeta3 integrin expression. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2008 Aug;35(8):1507-15.
32. Haubner R, Weber WA, Beer AJ, Vabulienė E, Reim D, Sarbia M, et al. Noninvasive visualization of the activated alphavbeta3 integrin in cancer patients by positron emission tomography and [18F]Galacto-RGD. *PLoS Med* 2005 Mar;2(3):e70.
33. Beer AJ, Haubner R, Sarbia M, Goebel M, Luderschmidt S, Grosu AL, et al. Positron emission tomography using [18F] Galacto-RGD identifies the level of integrin alpha(v)beta3 expression in man. *Clin Cancer Res* 2006 Jul 1;12(13):3942-9.
34. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004 Aug;25(4):581-611.
35. Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation* 1996 Apr 15;93(8):1493-5.
36. Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem* 1992 Dec 25;267(36):26031-7.
37. Shibuya M, Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res* 2006 Mar 10;312(5):549-60.
38. Presta LG, Chen H, O'Connor SJ, Chisholm V, Meng YG, Krummen L, et al. Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res* 1997 Oct 15;57(20):4593-9.
39. Nagengast WB, de Vries EG, Hospers GA, Mulder NH, de J, Jr., Hollema H, et al. In vivo VEGF imaging with radiolabeled bevacizumab in a human ovarian tumor xenograft. *J Nucl Med* 2007 Aug;48(8):1313-9.
40. Stollman TH, Scheer MG, Leenders WP, Verrijp KC, Soede AC, Oyen WJ, et al. Specific imaging of VEGF-A expression with radiolabeled anti-VEGF monoclonal antibody. *Int J Cancer* 2008 Jan 31.
41. Scheer MG, Stollman TH, Boerman OC, Verrijp K, Sweep FC, Leenders WP, et al. Imaging liver metastases of colorectal cancer patients with radiolabelled bevacizumab: Lack of correlation with VEGF-A expression. *Eur J Cancer* 2008 Sep;44(13):1835-40.
42. Cai W, Chen K, Mohamedali KA, Cao Q, Gambhir SS, Rosenblum MG, et al. PET of vascular endothelial growth factor receptor expression. *J Nucl Med* 2006 Dec;47(12):2048-56.
43. Chengazi VU, Feneley MR, Ellison D, Stalteri M, Granowski A, Granowska M, et al. Imaging prostate cancer with technetium-99m-7E11-C5.3 (CYT-351). *J Nucl Med* 1997 May;38(5):675-82.
44. Chang SS, O'Keefe DS, Bacich DJ, Reuter VE, Heston WD, Gaudin PB. Prostate-specific membrane antigen is produced in tumor-associated neovasculature. *Clin Cancer Res* 1999 Oct;5(10):2674-81.
45. Chang SS, Reuter VE, Heston WD, Bander NH, Grauer LS, Gaudin PB. Five different anti-prostate-specific membrane



- antigen (PSMA) antibodies confirm PSMA expression in tumor-associated neovasculature. *Cancer Res* 1999 Jul 1;59(13):3192-8.
46. Morris MJ, Divgi CR, Pandit-Taskar N, Batraki M, Warren N, Nacca A, et al. Pilot trial of unlabeled and indium-111-labeled anti-prostate-specific membrane antigen antibody J591 for castrate metastatic prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2005 Oct 15;11(20):7454-61.
  47. Morris MJ, Pandit-Taskar N, Divgi CR, Bender S, O'Donoghue JA, Nacca A, et al. Phase I evaluation of J591 as a vascular targeting agent in progressive solid tumors. *Clin Cancer Res* 2007 May 1;13(9):2707-13.
  48. Foss CA, Mease RC, Fan H, Wang Y, Ravert HT, Dannals RF, et al. Radiolabeled small-molecule ligands for prostate-specific membrane antigen: in vivo imaging in experimental models of prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2005 Jun 1;11(11):4022-8.
  49. Mease RC, Dusich CL, Foss CA, Ravert HT, Dannals RF, Seidel J, et al. N-[N-(S)-1,3-Dicarboxypropyl]carbonyl]-4-[18F] fluorobenzyl-L-cysteine, [18F]DCFCB: a new imaging probe for prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2008 May 15;14(10):3036-43.
  50. Castellani P, Viale G, Dorcaratto A, Nicolo G, Kaczmarek J, Querze G, et al. The fibronectin isoform containing the ED-B oncofetal domain: a marker of angiogenesis 20. *Int J Cancer* 1994 Dec 1;59(5):612-8.
  51. Neri D, Carnemolla B, Nissim A, Leprini A, Querze G, Balza E, et al. Targeting by affinity-matured recombinant antibody fragments of an angiogenesis associated fibronectin isoform. *Nat Biotechnol* 1997 Nov;15(12):1271-5.
  52. Viti F, Nilsson F, Demartis S, Huber A, Neri D. Design and use of phage display libraries for the selection of antibodies and enzymes 2. *Methods Enzymol* 2000;326:480-505.
  53. Pini A, Viti F, Santucci A, Carnemolla B, Zardi L, Neri D, et al. Design and use of a phage display library. Human antibodies with subnanomolar affinity against a marker of angiogenesis eluted from a two-dimensional gel 6. *J Biol Chem* 1998 Aug 21;273(34):21769-76.
  54. Demartis S, Tarli L, Borsi L, Zardi L, Neri D. Selective targeting of tumour neovasculature by a radiohalogenated human antibody fragment specific for the ED-B domain of fibronectin 1. *Eur J Nucl Med* 2001 Apr;28(4):534-9.(55)
  55. Santimaria M, Moscatelli G, Viale GL, Giovannoni L, Neri G, Viti F, et al. Immunoscintigraphic detection of the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis, in patients with cancer 1. *Clin Cancer Res* 2003 Feb;9(2):571-9.
  56. Berndorff D, Borkowski S, Moosmayer D, Viti F, Muller-Tiemann B, Sieger S, et al. Imaging of tumor angiogenesis using 99mTc-labeled human recombinant anti-ED-B fibronectin antibody fragments 2. *J Nucl Med* 2006 Oct;47(10):1707-16.
  57. Borsi L, Balza E, Bestagno M, Castellani P, Carnemolla B, Biro A, Leprini A, Sepulveda J, Burrone O, Neri D, Zardi L. <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12353237?ordinalpos=4&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed\\_ResultsPanel.Pubmed\\_DefaultReportPanel.Pubmed\\_RVDocSum](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12353237?ordinalpos=4&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DefaultReportPanel.Pubmed_RVDocSum)> Selective targeting of tumoral vasculature: comparison of different formats of an antibody (L19) to the ED-B domain of fibronectin. *Int J Cancer* 2002 Nov 1;102(1):75-85.
  58. Rossin R, Berndorff D, Friebe M, Dinkelborg LM, Welch MJ. Small-animal PET of tumor angiogenesis using a (76)Br-labeled human recombinant antibody fragment to the ED-B domain of fibronectin. *J Nucl Med* 2007 Jul;48(7):1172-9.
  59. Carnemolla B, Castellani P, Ponassi M, Borsi L, Urbini S, Nicolo G, et al. Identification of a glioblastoma-associated tenascin-C isoform by a high affinity recombinant antibody 4. *Am J Pathol* 1999 May;154(5):1345-52.
  60. Silacci M, Brack SS, Spath N, Buck A, Hillinger S, Arni S, et al. Human monoclonal antibodies to domain C of tenascin-C selectively target solid tumors in vivo 2. *Protein Eng Des Sel* 2006 Oct;19(10):471-8.
  61. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior 2. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;17:463-516.
  62. McKerrow JH, Bhargava V, Hansell E, Huling S, Kuwahara T, Matley M, et al. A functional proteomics screen of proteases in colorectal carcinoma 3. *Mol Med* 2000 May;6(5):450-60.
  63. Koivunen E, Arap W, Valtanen H, Rainisalo A, Medina OP, Heikkila P, et al. Tumor targeting with a selective gelatinase inhibitor 15. *Nat Biotechnol* 1999 Aug;17(8):768-74.
  64. Furumoto S, Takashima K, Kubota K, Ido T, Iwata R, Fukuda H. Tumor detection using 18F-labeled matrix metalloproteinase-2 inhibitor. *Nucl Med Biol* 2003 Feb;30(2):119-25.
  65. Huminiecki L, Gorn M, Suchting S, Poulsom R, Bicknell R. Magic roundabout is a new member of the roundabout receptor family that is endothelial specific and expressed at sites of active angiogenesis. *Genomics* 2002 Apr;79(4):547-52.
  66. Andrews W, Barber M, Hernandez-Miranda LR, Xian J, Rakic S, Sundaresan V, et al. The role of Slit-Robo signaling in the generation, migration and morphological differentiation of cortical interneurons. *Dev Biol* 2008 Jan 15;313(2):648-58.
  67. Grone J, Doebler O, Loddenkemper C, Hotz B, Buhr HJ, Bhargava S. Robo1/Robo4: differential expression of angiogenic markers in colorectal cancer. *Oncol Rep* 2006 Jun;15(6):1437-43.
  68. Seth P, Lin Y, Hanai J, Shivalingappa V, Duyao MP, Sukhatme VP. Magic roundabout, a tumor endothelial marker: expression and signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2005 Jul 1;332(2):533-41.
  69. Legg JA, Herbert JM, Clissold P, Bicknell R. Slits and Roundabouts in cancer, tumour angiogenesis and endothelial cell migration. *Angiogenesis* 2008;11(1):13-21.
  70. Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 2005 Jan 7;307(5706):58-62.
  71. Hlatky L, Hahnfeldt P, Folkman J. Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. *J Natl Cancer Inst* 2002 Jun 19;94(12):883-93.
  72. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004 Jun 3;350(23):2335-42. 



**A step forward...  
towards quality of life |**



# **QUADRAMET®**

Samarium [<sup>153</sup>Sm] Lexidronam injection  
METASTATIC BONE PAIN

distributed by IBA

[www.cisbio.com](http://www.cisbio.com)  
[www.iba-worldwide.com](http://www.iba-worldwide.com)



# Ontwikkeling van een nieuw radiofarmacon in een academische, niet-commerciële setting



**Drs. M.G.G. Sturkenboom<sup>1,2</sup> Dr. J.G.W. Kosterink<sup>1</sup>**

**Dr. M.N. Lub-de Hooge<sup>1,2</sup> Nederland**

<sup>1</sup>Afdeling Klinische Farmacie en Apotheek

<sup>2</sup>Afdeling Nucleaire Geneeskunde en Moleculaire Beeldvorming

Universitair Medisch Centrum Groningen

## Abstract

**Sturkenboom MG, Kosterink JG, Lub-de Hooge MN. Development of new radiopharmaceuticals in academia**

New radiopharmaceuticals are frequently developed in a small university (medical) centre setting. This in contrast to new pharmaceuticals, that are mostly developed by large pharmaceutical companies.

A lot of preclinical testing precedes the first-in-man administration of newly developed radiopharmaceuticals. Extensive regulations and guidelines exist on non-clinical (safety) studies for the conduct of human clinical trials in general. However they are not specific for radiopharmaceuticals and do not take into account the special characteristics of radiopharmaceutical compounds and the small non-commercial setting. First we give an overview of the tests that are considered necessary for pharmaceuticals intended for human use according to the international guidelines and then we will discuss how we have translated the regulatory guidelines to our own situation in a university medical centre setting. The suggested development process is in fact building the product dossier or investigational medicinal product dossier, which includes information on the use of the radiopharmaceutical, the synthesis (including purification, formulation, quality control, requirements and validation) and preclinical testing (including toxicity data). Based on this dossier, the new radiopharmaceutical could be "approved" for clinical use.

**Tijdschr Nucl Geneesk 2008; 30(4):125-132**

## Introductie

Veel nieuwe radiofarmaca worden ontwikkeld in universitaire centra, dit in tegenstelling tot nieuwe geneesmiddelen, waarvan het grootste gedeelte via de industrie beschikbaar komt.

Als een geneesmiddel voor het eerst humaan toegepast wordt, is er een groot aantal onderzoeken dat vooraf uitgevoerd moet worden. De International Conference on Harmonisation (ICH) geeft algemene regels voor geneesmiddelenontwikkeling in de multidisciplinaire richtlijn M3 'non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals' (1).

Omdat radiofarmaca volgens de Geneesmiddelenwet geneesmiddelen zijn, dienen nieuw ontwikkelde radiofarmaca ook aan deze richtlijn te voldoen (2). Aan de andere kant worden radiofarmaca vaak in kleine hoeveelheden toegepast en zijn hierdoor verscheidene interpretaties mogelijk van de verschillende richtlijnen. Daarnaast kunnen aanvullende eisen gelden specifiek voor radiofarmaca. De grote hoeveelheid richtlijnen die van toepassing is, maakt het echter lastig goed overzicht te houden.

In dit artikel beschrijven we eerst de testen die noodzakelijk zijn voordat het mogelijk is geneesmiddelen (incl. radiofarmaca) humaan toe te passen, gebaseerd op de huidige geldende internationale richtlijnen. Daarna geven we aan hoe wij, in een academische, niet-commerciële setting, deze richtlijnen toepassen op de ontwikkeling en productie van radiofarmaca. Hierbij gaat het om kleinschalige productie voor relatief kleine patiëntenpopulaties. Wij richten ons bij het bespreken van de internationale richtlijnen met name op de preklinische testen en minder op de (radio)farmaceutische aspecten. Deze komen in het tweede deel van het artikel

wel aan de orde en zijn bovendien zeer recent beschreven in EJNMMI (3).

## Internationale richtlijnen ten aanzien van 'first in human' testen

De ICH is een initiatief van zowel industrie als wetgevers uit West-Europa, Japan en de Verenigde Staten en stelt richtlijnen op om de veiligheid, kwaliteit en effectiviteit van geneesmiddelen te kunnen waarborgen. De richtlijnen zijn verdeeld in vier categorieën: Q (quality, kwaliteit), S (safety, veiligheid), E (efficacy, effectiviteit) en M (multidisciplinary, multidisciplinair) (4).

De M3 richtlijn is een overkoepelend geheel van de richtlijnen m.b.t. de preklinische testen die gedaan moet worden, voordat een klinische studie gestart kan worden. Voor uitvoering, detail en interpretatie van de testen wordt in M3 verder verwezen naar de betreffende ICH veiligheidsrichtlijnen (S). Er wordt gesproken over de volgende onderwerpen:

1. veiligheidsfarmacologie (Safety Pharmacology ICH S7A, ICH S7B) (5,6)
2. acute en herhaalde dosistoxiciteit (acute and repeated dose toxicity NC3Rs workshop, CHMP 302413) (7,8)
3. toxico- en niet-klinische farmacokinetiek (toxicokinetic and pharmacokinetic studies ICH S3A, ICH S3B) (9)
4. reproductietoxiciteit (reproduction toxicity ICH S5) (10) en
5. genotoxiciteit (genotoxicity ICH S2, S2A en S2B) (11)

Verder dient beoordeeld te worden of er aanvullend onderzoek nodig is op het gebied van:

1. carcinogeniteit (ICH S1A, S1B en S1C) (12)
2. fototoxiciteit
3. immunotoxiciteit (ICH S8) (13)
4. toxiciteit in jonge dieren en
5. misbruikmogelijkheden

Op deze laatste vijf items wordt in dit artikel verder niet ingegaan.

## Veiligheidsfarmacologie

Doel van veiligheidsfarmacologie studies is eigenlijk het identificeren van ongewenste farmacodynamische effecten die invloed kunnen hebben op veiligheid en het achterhalen van de mechanismen ervan. Diermodellen, maar ook ex vivo en in-vitro modellen kunnen dienen als testsysteem. Afhankelijk van de te testen verbinding moet een geschikt model gekozen worden. Dit laatste is niet altijd eenvoudig omdat de farmacodynamiek per species sterk kan wisselen.

## Acute en herhaalde dosistoxiciteit

Van oudsher is de eerste toxiciteitstest die uitgevoerd wordt de acute toxiciteitstest. Het doel van de test is de dosis te bepalen waarbij ernstige of levensbedreigende bijwerkingen optreden. Normaal gesproken worden de testen uitgevoerd in twee verschillende zoogdieren (bijv. muis en rat) met twee verschillende toedienroutes (waarvan tenminste één

parenteraal) met een maximale dosis tot 2000 mg/kg (1). Het nut van de acute (enkelvoudige) toxiciteitstest wordt momenteel in twijfel getrokken. Het is namelijk aangetoond, dat de data helemaal niet gebruikt wordt voor het opstellen en uitvoeren van vroeg-klinische studies (8). Daarom is recent een concept protocol opgesteld door de Safety Working Party (SWP) van de Committee for Medicinal Products for Human use (CHMP) (8). Dit protocol is uiteindelijk bedoeld om de Eudralex vol3; 3BS1a Single Dose Toxicity te vervangen.

De herhaalde dosis toxiciteitstesten worden uitgevoerd om een idee te krijgen van doelorganen en systemen en om de dosis vast te stellen waarbij na herhaalde behandeling geen effect optreedt. In principe duren de testen tenminste zolang als de beoogde klinische studies, met een minimum van 2 weken. De studies worden uitgevoerd in twee zoogdier soorten.

## Toxicokinetiek en niet-klinische farmacokinetiek

Kennis van de absorptie, distributie, metabolisme en excretie van een verbinding is van belang voor het goed kunnen interpreteren van zowel farmacologische als toxicologische data. Weefsel verdelingsstudies in dieren geven inzicht in deze parameters in relatie tot de potentiële plaats van werking.

Toxicokinetiek onderzoek is een integraal onderdeel van de preklinische (toxiciteit)testen. Belangrijkste doel van toxicokinetiek onderzoek is het beschrijven van de systemische blootstelling in dieren in relatie tot dosis en tijdverloop. Op basis van plasma (of volbloed of serum) concentraties voor de moederverbinding en metabolieten kunnen AUC,  $C_{max}$  en  $C_t$  worden afgeleid voor beschrijven van de farmacokinetiek en toxicokinetiek.

Bovenstaande onderzoeken kunnen gecombineerd/geïntegreerd worden met bijvoorbeeld de herhaalde dosis toxiciteitstest. Vanwege zogenaamde 'species specificity' is de 1 op 1 vertaling naar de mens vaak lastig.

## Reproductietoxiciteit

Doel van deze studies is het in een zoogdiermodel achterhalen van elk effect van één of meerdere werkzame stoffen op de reproductie. Over het algemeen worden dezelfde modellen gebruikt als in de overige toxiciteitstudies. Toedienroute dient overeen te komen met de toedienroute in de voorgestelde klinische studies en de frequentie van toedienen is over het algemeen eenmaal daags. Controle dieren worden gedoseerd met dezelfde formulering zonder werkzame stof.

Over het algemeen wordt een 3 fasen design gekozen, waarbij verschillende fasen die van belang zijn in reproductieproces gevolgd worden: 1) vruchtbaarheid en vroeg embryonale ontwikkeling, 2) pre- en postnatale ontwikkeling en 3) embryo-foetus ontwikkeling.

### Genotoxiciteit

Genotoxiciteitstesten kunnen gedefinieerd worden als *in vitro* and *in vivo* testen, die bedoeld zijn voor het detecteren van stoffen die direct of indirect genetische schade induceren. De testen geven een risicoschatting voor de eigenschappen om DNA-schade te veroorzaken. Er is niet één test die in staat is om alle relevante genotoxische agentia aan te tonen. Daarom is gebruikelijk om een combinatie van testen uit te voeren (11). De standaard bestaat daarbij uit:

- I. een genmutatietest in bacteriën (Ames test)
- II. een *in vitro* test met cytogenetische evaluatie van chromosoom schade met zoogdiercellen of een *in vitro* muis lymphoma tk assay
- III. een *in vivo* test voor chromosoomschade in hematopoietische cellen van knaagdieren

Indien deze drie testen alle negatief zijn, dan is in principe voldoende aangetoond dat de geteste stof niet genotoxisch is.

Een genmutatietest (Ames test) is geaccepteerd als voldoende onderbouwing voor een klinische trial waarbij slechts een enkele dosis wordt gegeven. Indien een teststof afkomstig is uit een bekende groep chemische stoffen, waarvan genotoxiciteitdata beschikbaar zijn, kan volstaan worden met een verkorte versie van de genotoxiciteitstest. Voor multiple doses, moeten twee testen uitgevoerd worden. Stoffen die positief testen in de standaard testen moeten, afhankelijk van het gebruik, verder getest worden. Voor meer details wordt verwezen naar ICH S2 (11).

### 'Microdosing' principe

ICH M3 is recent herzien met toevoeging van een hoofdstuk over 'microdosing'.

Geneesmiddelontwikkeling is over het algemeen een complex, langdurig en daarmee ook duur proces (700-1000 miljoen \$). Het traject tot registratie bestaat uit een preklinische fase en drie klinische fasen (I tot III). Veel verbindingen vallen af in dit traject en slechts een klein aantal komt uiteindelijk op de markt. Er is dus behoefte aan aanvullende methoden om het screenings- en ontwikkelproces efficiënter te maken. Dit is de reden dat fase 0 microdosis studies voorgesteld zijn, die uitgevoerd worden vóór fase I onderzoek.

Een microdosis is gedefinieerd als minder dan 1/100 van de farmacologisch actieve dosering van de teststof, gebaseerd op primaire farmacodynamische data (zowel *in vitro* als *in vivo*) en met een maximum van 100 microgram (1). Vanwege het verschil in molecuulgewicht vergeleken met synthetische middelen mag van de FDA voor eiwitten de grens van 30 nanomol aangehouden worden (14).

Voor microdoseringen wordt in ICH M3 en het CHMP microdosing protocol aanbevolen in plaats van acute en een herhaalde dosis toxiciteitstest, een uitvoerige (enkelvoudige dosis) toxiciteitstest in één geschikt dierspecies te doen (15). *In-vitro* genotoxiciteitstesten blijven noodzakelijk, alhoewel die in sommige gevallen beperkt kunnen worden.

In Tabel 1 worden twee benaderingen voor verschillende onderzoeken met microdoseringen gegeven: afhankelijk van het soort onderzoek, worden beperkingen in de uitvoering van de preklinische testen voorgesteld.

De eerste benadering gaat uit van een totale dosis van 100 microgram, evt. verdeeld over maximaal 5 toedieningen. Een uitgebreide enkelvoudige dosis toxiciteitstest in 1 dierspecies dient daarbij gedaan te worden met maximale dosis van 10 mg/kg. Genotoxiciteitsonderzoek kan achterwege gelaten worden, maar structuur activiteitsrelatie is wel gewenst. Voor radioactieve verbindingen moeten farmacokinetiek en dosimetrie gegevens overlegd worden. De tweede benadering gaat uit van een maximale cumulatieve dosis van 500 microgram met maximaal 5 toedieningen, waarbij elke afzonderlijke dosis niet meer mag zijn dan 100 microgram en 1/100 van de farmacologisch actieve dosering. Een 7 dagen toxicologietest is hier vereist in 1 dierspecies met maximale dosis van 10 mg/kg. Genotoxiciteitsonderzoek kan achterwege blijven als de structuur activiteitsrelatie negatief is. Ook hier geldt dat voor radioactieve verbindingen farmacokinetiek en dosimetrie gegevens overlegd moeten worden.

Tussen FDA richtlijnen op dit gebied en concept EMEA richtlijnen bestaan nog wel verschillen, vooral als het gaat om wel of niet uitvoeren van genotoxiciteitstesten.

In het algemeen moet wel voorkomen worden dat de fase 0 studies gebruikt worden om onder zorgvuldig toxiciteitsonderzoek uit te komen (16).

### Waarom verschillen radiofarmaca van niet-radioactieve geneesmiddelen?

Omdat de toegediende dosis van een radiofarmacon vaak tussen 1 en 10 microgram (en  $\leq 30$  nanomol voor eiwitten) ligt, kan het concept van microdosing goed toegepast worden op radiofarmaca.

De onderwerpen veiligheidsfarmacologie, acute en herhaalde dosis toxiciteitstesten vervallen met het concept microdosing, omdat geen farmacologische, laat staan toxicologische activiteit beoogd wordt (1). Een uitvoerige enkelvoudige dosis toxiciteitstest, farmac- en toxicokinetiek en genotoxiciteit onderzoek blijft nodig. Onderzoek naar 'effectiviteit' gaat voor radiofarmaca niet op, maar een onderbouwing van de 'targeting' naar het doelorgaan/receptor (en specificiteit/affiniteit daarvoor) wel.

Voor radiofarmaca wordt specifiek vermeld, dat bruikbare data afkomstig dienen te zijn van teststof met het overeenkomstige stabiele isotoop, voor zowel de uitvoerige enkelvoudige dosis toxiciteitstest als de genotoxiciteit (15). Deze opmerking wordt bevestigd door ervaring die in het verleden in het UMCG PET-centrum is opgedaan met de ontwikkeling van fluorocarazolol. De betablokker carazolol was commercieel verkrijgbaar en niet-genotoxisch, maar door de introductie van een fluoratoom in het molecuul zijn de eigenschappen het molecuul dusdanig gewijzigd dat de Ames test positief uitvalt (17).

Een radiofarmacon bestaat uit een (chemisch) ligand en een

>>



<b>Clinical:</b>	<b>Non clinical:</b>		
<b>Dose to be Administered</b>	<b>Pharmacology</b>	<b>General Toxicity Studies</b>	<b>Genotoxicity / Other</b>
<p><u>Approach 1:</u> Total dose <math>\leq</math> 100 <math>\mu\text{g}</math>; maximum of 5 administrations (no inter-dose interval limitations) AND Total dose <math>\leq</math> 1/100th NOAEL and <math>\leq</math> 1/100th pharmacologically active dose (scaled on mg/kg for i.v. and mg/m<sup>2</sup> for oral).</p>	<p>In vitro target/ receptor profiling should be conducted.  Appropriate characterization of pharmacology in a pharmacodynamically relevant species should be available to support human dose selection.</p>	<p>Extended single dose toxicity study in one species, usually rodent, by intended route of administration with toxicokinetic profile or via the i.v. route. A limit dose of 10 mg/kg in rats (~6000 times the 100 <math>\mu\text{g}</math> clinical dose on a mg/ kg comparison basis) can be used.</p>	<p>Genotoxicity studies are generally not conducted, but any studies or SAR assessments conducted should be included in the clinical trial application.  For highly radioactive agents, appropriate pharmacokinetics and dosimetry estimates should be submitted.</p>
<p><u>Approach 2:</u> Total cumulative dose 500 <math>\mu\text{g}</math>, maximum of 5 administrations with a washout between doses (6 or more actual or predicted half-lives) AND each dose <math>\leq</math> 100 <math>\mu\text{g}</math> AND each dose <math>&lt;</math> 1/100th of the NOAEL and <math>&lt;</math> 1/100th of the pharmacologically active dose.</p>	<p>In vitro target/receptor profiling should be conducted.  Appropriate characterization of pharmacology in a pharmacodynamically relevant species should be available to support human dose selection.</p>	<p>7 day toxicology study in one species, usually rodent, by i.v. route or intended route of administration, with toxicokinetics, haematology, clinical chemistry, necropsy data and histopathology. A limit dose of 10 mg/kg in rats (~6000 times the 100 <math>\mu\text{g}</math> clinical dose) can be used.</p>	<p>Genotoxicity studies are generally not conducted, if SAR assessments are negative. No genotoxicity assay is recommended for PET ligands.  For highly radioactive agents, appropriate pharmacokinetics and dosimetry estimates should be submitted.</p>

Tabel 1. Twee benaderingen voor microdosing principe (ongewijzigd overgenomen uit ICH M3) (ref. 1)

radioactief isotoop. De schade die aangericht kan worden aan DNA door de ioniserende straling is, in ieder geval bij radiofarmaca met een hoge specifieke activiteit, groter dan de kans op DNA schade door ligand. Daarom is wel discussie gaande over de noodzaak van genotoxiciteitstesten voor radiofarmaca waarbij minder dan 10  $\mu\text{g}$  wordt toegediend (18). Daarnaast geeft de EMEA richtlijn m.b.t. "de limieten van genotoxische verontreinigingen" aan dat geen genotoxiciteitstesten nodig zijn als de te testen verbinding in een dosis van maximaal 1,5 microgram wordt toegediend (19). In geval van multiële doses geldt een grens van 1,5 microgram per dag.

Voor eerste humane toepassing zal iets bekend moeten zijn van de biodistributie (zie niet klinische farmacokinetiek) en dosimetrie van het radiofarmacon. En dient een onderbouwing van de geschatte stralingsdosis gegeven te

worden. Deze data worden verkregen door in een diemodel op verschillende tijdstippen te meten hoe de verdeling is van de radioactiviteit in bloed, urine en verschillende organen. ICRP richtlijnen 62 en 103 beschrijven ethische en procedurele aspecten (22,23). In ICRP 62 wordt op basis van de effectieve dosis (mSv) een indeling gemaakt in risico 4 categorieën. Over het algemeen geldt dat een dosis zo laag mogelijk gehouden moet worden en dat bovendien een stralenbelasting die niet verantwoord kan worden, ook niet gegeven moet worden.

Verder zijn er uiteraard radiofarmaceutische eisen beschreven in de verschillende farmacopeeën en is de "guideline on radiopharmaceuticals" (CHMP draft to replace eudralex 3AQ20a) van toepassing (20). Hierin wordt stabiliteitsonderzoek voorgesteld dat relevant is in relatie tot de halfwaardetijd van de verbindingen. Ook wordt annex 3



van de GMP (manufacture of radiopharmaceuticals) gevolgd (21). Dit wordt hier verder niet besproken en is recent gereviewd (3).

### Praktische toepassing van de richtlijnen in een academische, niet-commerciële setting.

Per nieuw radiofarmacon wordt een ontwikkeltraject gestart en een ontwerp/productdossier cq IMPD opgebouwd. Hierin zijn onder andere opgenomen de onderbouwing van de toepassing, (radio)farmaceutische aspecten, preklinisch (en klinisch) onderzoek. Ook wordt met name meegewogen in welke patiëntenpopulatie het radiofarmacon zal worden toegepast, en in hoeverre gekeken kan worden naar kennis die beschikbaar is van het overeenkomstige niet-radioactieve (geregistreerde) geneesmiddel.

Achtereenvolgens wordt beschreven de diverse stappen die aan de orde komen in het ontwerptraject en uiteindelijk leiden tot goedkeuring van een radiofarmacon voor humane toepassing.

#### 1. Radiofarmaceutische onderbouwing

Als eerste stap wordt m.b.v. literatuuronderzoek gekeken naar beschikbare data over de synthese of bereiding en naar de (pre)klinische toepassing van het radiofarmacon in andere centra. Indien verkrijgbaar worden deze data opgevraagd en beoordeeld.

#### 2. Ontwikkeling synthese cq bereiding

Hieronder vallen het opzetten en optimaliseren van de synthese/bereiding van het radiofarmacon, inclusief de bijbehorende zuivering, formulering en kwaliteitscontrole. Met het oog op toekomstige humane toepassing, wordt hierbij al direct gekeken naar kwaliteitseisen die gesteld worden aan de precursor, overige grondstoffen, loopmiddelen en (kolom)materialen. Over het algemeen gaat het hier nog om kleine hoeveelheden en zal de synthese in een later stadium opgeschaald worden naar hoeveelheden nodig voor patiëntonderzoek (zie ook validatie).

#### 3. Preklinische testen

De preklinische testen hebben betrekking op (radio)farmaceutische aspecten als labelingefficiency, radiochemische en chemische zuiverheid en specifieke activiteit, maar ook stabiliteit-/houdbaarheidsonderzoek en in-vitro testen als receptorbinding en immunoreactiviteit. Vervolgens wordt in-vivo in meestal een muis- of ratmodel gekeken naar farmacologische eigenschappen (incl. "targeting") en biodistributie. Deze gegevens worden ook gebruikt om een onderbouwing te kunnen geven voor de dosimetrie van het radiofarmacon.

Een volgende stap (die voor een deel ook parallel kan lopen) is preklinisch toxiciteitonderzoek, diverse overwegingen spelen hierbij een rol. De afweging wordt hierbij per casus gemaakt. Wanneer een radiofarmacon niet eerder humaan is toegepast, dan werd tot nu toe een acute

toxiciteitstest (Ph Eur) en genotoxiciteitonderzoek (AMES test en chromosoomabberatietest) gedaan. De acute toxiciteitstest wordt uitgevoerd in onze eigen instelling en de genotoxiciteitstesten besteden we uit bij Notox BV, 's Hertogenbosch. Voor radiofarmaca die vallen onder de nieuwe microdosing richtlijnen gaan we over op uitvoeren van alleen een uitvoerige enkelvoudige dosis toxiciteitstest (extended single dose toxicity) en kan genotoxiciteitonderzoek in principe achterwege blijven.

Indien een radiofarmacon eerder humaan is toegepast en onze synthese is vergelijkbaar met de beschreven methode, dan beoordelen we op basis van de beschikbare gegevens of aanvullende toxiciteitgegevens nodig zijn. Ook van gelabelde (geregistreerde) antilichamen en radiofarmaca identiek aan geregistreerde farmaca zijn vaak geen aanvullende toxiciteitdata nodig. In het geval van gelabelde antilichamen, omdat het antilichaam zelf al geregistreerd is voor humane toepassing en het chelaat en de isotopen die gebruikt worden (zoals <sup>111</sup>In-itcDTPA, <sup>111</sup>In-itcDOTA, <sup>89</sup>Zr-desferal) ook al veelvuldig humaan zijn toegepast.

Voor geneesmiddelen met een bekende anti-tumor werking geeft de CHMP aan dat genotoxiciteits- en reproductietesten niet nodig zijn (24). Op basis hiervan laten wij genotoxiciteits- en reproductietesten achterwege, indien het nieuwe radiofarmacon wordt geëvalueerd bij patiënten met een bekende maligniteit met uitzondering van de maligniteiten met een relatief goede prognose (25)

#### 4. Valideren van de synthese cq bereiding

In een eerder stadium van het ontwikkelingsproces zijn de synthese en kwaliteitscontrole opgezet. Vervolgens wordt de methode opgeschaald, beschreven in een werk- en productieprotocol en gevalideerd. Van te voren wordt een pakket van (radio)farmaceutische eisen opgesteld waaraan het radiofarmacon moet voldoen. Bij het opstellen van de eisen wordt onderscheid gemaakt in eisen die bekend moeten zijn voor voorlopige vrijgifte (bijvoorbeeld radiochemische zuiverheid), eisen die achteraf bekend mogen worden (bijvoorbeeld steriliteit) en eisen die alleen bij initiële en periodieke validatie bekeken worden (bijvoorbeeld osmolaliteit en residual solvents). Bij het opstellen van het analyseprotocol wordt gebruik gemaakt van beschikbare literatuur, Europese, Britse of Amerikaanse farmacopeeën en kennis die op de afdeling in de loop van de tijd is opgebouwd. Een voorbeeld van een dergelijk protocol voor het radiofarmacon <sup>18</sup>F-FDOPA is opgenomen in figuur 1. Hierin is te zien dat er eisen worden gesteld aan:

- I. radionuclide zuiverheid
- II. radiochemische zuiverheid
- III. radiochemische concentratie, radioactiviteitconcentratie, specifieke activiteit
- IV. massa van precursor, bekende verontreinigingen en radiofarmacon
- V. onbekende verontreinigingen
- VI. residual solvents: acetonitril, dimethylformamide,

Zie voor de uitvoering van de kwaliteitscontrole: 'Kwaliteitscontrole van tracers' (PT-PROD-00104).

[18F]-FDOPA	NGMB eis	vrijgifte-eis <sup>1</sup>	frequentie	Ph. Eur 6.0
Uiterlijk	helder, kleurloos	ja	elke synthese	helder, kleurloos
pH	4 - 5	ja	elke synthese	4,0-5,5
Borrelpuntstest (bar)	> 0,9	nee	elke synthese	
Specifieke activiteit (GBq/mmol)	> 4	ja	elke synthese	
Osmolariteit (mosmol/kg)	< 450	nee	4x/ jaar	
Chemische zuiverheid:				
DOPA (mg/dosis)	< 10	ja	elke synthese	-
FDOPA (mg/dosis)	-			15
L-DOPA (mg/dosis)	-			1
6OH-DOPA (mg/dosis)	-			0,025
ascorbinezuur	-	nee	elke synthese	-
Cl-Sn(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> (mg/dosis)	≤ <sup>2</sup>			0,5
Radiochemische zuiverheid (%)				
[18F]-FDOPA	> 95	ja	elke synthese	>95
18F-	< 5	ja	elke synthese	
Radionuclidische zuiverheid (%):	> 99	nee	4x/ jaar	99,9
gammaspectrum (keV)	511, evt 1022			
t <sub>1/2</sub> (min)	105-115			
Chloroform (mg/L)	< 10	nee	4x/jaar	60
Steriliteit	steriel	nee	4x/ jaar	steriel
Kiemgetal (kve/ml)	0	nee	4x/ jaar	
Endotoxines (EU/ml)	< 2	nee	4x/ jaar	175/V

<sup>1</sup> vrijgifte-eis: moet voldoen voor toediening aan patiënt.

<sup>2</sup> Tin werd voorheen regulier gecontroleerd (eis < 20mg/l), de analyse is gestaakt omdat het niet werd aangetoond.

Figuur 1. Kwaliteitseisen <sup>18</sup>F-FDOPA

dimethylsulfoxide, ethanol, methanol

VII. osmolaliteit

VIII. immunoreactiviteit (gelabelde antilichamen) en

IX. microbiologie: filterintegriteit, steriliteit, endotoxines, bioburden

Voor de initiële validatie worden tenminste drie productieruns uitgevoerd en volledig geanalyseerd.

Onlangs hebben we voor de periodieke validaties de metaalanalyse (aluminium, ijzer, magnesium, nikkel, tin) verlaten, omdat data beschikbaar van 10 jaar aanduiden dat er geen farmacologisch actieve of toxische concentraties gevonden werden.

### 5. Goedkeuring van de tracer voor humane toepassing

De gegevens die opgebouwd zijn in de hiervoor beschreven stappen vormen het productdossier of in geval van radiofarmaca, die worden toegepast in klinisch geneesmiddelen onderzoek, het Investigational Medicinal Product Dossier (IMPD).

Dit wordt beoordeeld door de ziekenhuisapotheker en op basis hiervan wordt het radiofarmacon geautoriseerd voor humane toepassing. In geval van klinisch geneesmiddelen onderzoek zal ook de ziekenhuisapotheker/klinisch farmacoloog in de Medisch Ethische toetsingscommissie het IMPD nog beoordelen.

Voordat een radiofarmacon humaan toegepast mag worden, dient dus aan drie essentiële eisen voldaan te zijn:

- I. preklinische data (incl. toxiciteit) en data m.b.t. de dosimetrie zijn verkregen (uit literatuur of eigen onderzoek) en beoordeeld.
- II. er is een bereidingsprocedure en -protocol beschikbaar en goedgekeurd door een aan de afdeling verbonden ziekenhuisapotheker. Dit bereidingsprotocol bestaat uit twee delen: een algemeen deel met onder meer werkwijze, voorbereiding en kwaliteitscontrole van het radiofarmacon en een werkprotocol dat per charge ingevuld wordt.
- III. er zijn minstens drie validatiebatches geproduceerd, volledig geanalyseerd en de data zijn beoordeeld.

### Tenslotte

Als het radiofarmacon eenmaal geautoriseerd is voor humane toepassing, dan kan het regulier toegepast worden. Bij normaal verlopen productie geldt vervolgens een procedure van voorlopige vrijgifte door de coördinerend analist radiochemie/radiofarmacie en eind van de dag volgt definitieve vrijgifte door één van de ziekenhuisapothekers/OP. Tenslotte worden gegevens van de opeenvolgende producties en periodieke validaties elk kwartaal beoordeeld. Zo nodig vinden op basis hiervan aanpassingen plaats, die ook worden toegevoegd aan het productdossier.


### Conclusie

Radiofarmaca moeten evenals andere geneesmiddelen onderworpen worden aan preklinische veiligheidstesten, zoals aangegeven in de verschillende richtlijnen. We hebben getracht aan te geven dat door het specifieke karakter van elk radiofarmacon, dit kan leiden tot het uitvoeren van verschillende preklinische testen. Dit wordt bepaald door de aard van de verbinding, het toepassingsgebied en de setting waarin het radiofarmacon wordt toegepast.

### Referenties:

1. ICH M3 Guideline: Guidance on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals; July 2008 (<http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>).
2. Geneesmiddelenwet, artikel 1, 8 februari 2007. [http://wetten.overheid.nl/cgi-bin/sessioned/browsercheck/continuation=27760-002/session=022071882067971/action=javascript-result/javascript=yes.geraadpleegd 28-08-2008](http://wetten.overheid.nl/cgi-bin/sessioned/browsercheck/continuation=27760-002/session=022071882067971/action=javascript-result/javascript=yes.geraadpleegd%2028-08-2008).
3. Verbruggen A, Coenen HH, Deverre JR, Guilloteau D, Langstrom B, Salvadori PA, Halldin C. Guideline to regulations for radiopharmaceuticals in early phase clinical trials in the EU. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2008; 35:2144-51
4. <http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>, geraadpleegd 26-08-2008.
5. ICH S7A Guideline: Safety pharmacology studies for human pharmaceuticals; November 2000 (<http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>).
6. ICH S7B Guideline: The non-clinical evaluation of the potential for delayed ventricular repolarization (QT interval prolongation) by human pharmaceuticals; May 2005 (<http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>).
7. National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research. Challenging Requirements for Acute Toxicity Studies: Workshop Report; May 2007 (<http://www.nc3rs.org.uk/downloaddoc.asp?id=559>).
8. Committee for Proprietary Medicinal Products/ Safety Working Party/302413. Concept paper on single dose/ acute toxicity London: European Medicines Agency; June 2008.
9. ICH S3A Guideline: Note for guidance on toxicokinetics: the assessment of systemic exposure in toxicity studies; October 1994. (<http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>).
10. ICH S5(R2): Detection of toxicity to reproduction for medicinal products and toxicity to male fertility; November 2005. (<http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>).
11. ICH S2(R1) Guideline: Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use; in March 2008 (<http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>).
12. ICH S1A Guideline: Guideline on the need for carcinogenicity studies of pharmaceuticals; November 1995 (<http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>).
13. ICH S8 Guideline: Immunotoxicity Studies for Human Pharmaceuticals; September 2005 (<http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>).
14. Center for drug evaluation and drug research (CDER). Guidance for industry, investigators, and reviewers- Exploratory IND studies. Center for drug evaluation and drug research, Food and Drug Administration, US Department of Health and Human Services, January 2006 (<http://www.fda.gov/CDER/guidance/7086fnl.htm>).
15. Committee for Proprietary Medicinal Products/ Safety Working Party/2599. Position paper on non-clinical safety studies to support clinical trials with a single microdose. London: European Medicines Agency; 2004
16. Marchetti S, Schellens JH. The impact of FDA and EMEA guidelines on drug development in relation to Phase 0 trials. *Br J Cancer* 2007; 97:577-81.
17. Doze P, Elsinga PH, Vries EFJ de, Waarde A van, Vaalburg W. Mutagenic activity of a fluorinated analog of the beta-adrenoreceptor ligand carazolol in the Ames test. *Nuc Med Biol* 2000; 27:315-19.
18. Lundqvist H, Antoni G, Långström B. Genotoxic hazard of radiopharmaceuticals in humans: chemical and radiation aspects coupled to microdosing. *Eur J Clin Pharmacol* 2007; 63:641-5.
19. EMEA committee for medicinal products for human use. Guideline on the limits of genotoxic impurities. EMEA/CHMP/QWP/251344/2006. <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/swp/519902en.pdf>.
20. Guideline on Radiopharmaceuticals, CHMP, EMEA/CHMP/QWP/306970/2007 (draft released for consultation). <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/qwp/30697007en.pdf>.
21. EudraLex. The Rules Governing Medicinal Products in

the European Union. Volume 4: EU Guidelines to Good Manufacturing Practice. Medicinal Products for Human and Veterinary Use. Annex 3 radiopharmaceuticals.

22. International Commission on Radiological Protection. ICRP publication 62: radiological protection in biomedical research, annals of the ICRP, vol 22/3. Oxford, UK: Pergamon; 1993.
23. International Commission on Radiological Protection. ICRP publication 103: Recommendations of the ICRP, annals of the ICRP, vol 37/2-3. Amsterdam: Elsevier; 2007.
24. Committee for Proprietary Medicinal Products/997. Note for guidance on the pre-clinical evaluation of anticancer medicinal products. London: European Medicines Agency; 1999.
25. Aboagye EO, Luthra SK, Brady F, Poole K, Anderson H, Jones T, et al. Cancer Research UK procedures in manufacture and toxicology of radiotracers intended for pre-phase I positron emission tomography studies in cancer patients. Br J Cancer 2002; 86:1052-6. 

## *i*Scan ... The smart instrument for Thin-Layer Chromatography

### Featuring:

- ✓ Fully software-controlled TLC scanner
- ✓ Compact, small footprint scanner includes data acquisition electronics
- ✓ Thin-Layer Chromatography using high-resolution NaI detector
- ✓ **Performs both Chromatographic and Energy spectrum (PHA) analysis**
- ✓ Protocol-driven measurements with database storage of the results
- ✓ Complete and comprehensive software package, including QC/QA data review



For more information, please contact us



**Canberra nv/sa**  
 Z1 Researchpark 80  
 B1731 Zellik  
 Tel: +32 2 481 85 30  
 Fax: +32 2 481 85 50  
 e-mail: info.be@canberra.com  
 www.canberra.com/be



# Fibrose activiteit bij patiënten met longfibrose: mogelijkheden van molecular imaging



Dr. J. Lavalaye<sup>1</sup>



Dr. J.C. Grutters<sup>2</sup>



Dr. E.M.W. van de Garde<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Afdeling Nucleaire Geneeskunde

<sup>2</sup>Afdeling Longziekten

<sup>3</sup>Afdeling Klinische Farmacie

St. Antonius ziekenhuis, Nieuwegein  
Nederland

## Abstract

### Lavalaye J, Grutters JC, van de Garde EM. Imaging of fibrogenesis in patients with pulmonary fibrosis

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a lethal lung disease for which no single diagnostic modality is able to evaluate the activity of the disease process. Cis-4-<sup>18</sup>F-Fluoro-L-Proline (<sup>18</sup>F-proline) was shown in animal studies to be a reliable marker for fibrosis formation. We tested this candidate radioligand for imaging of fibrogenesis in patients with IPF.

Five patients with IPF were included. Furthermore, we also included one patient with non-specific interstitial pneumonia (NSIP) and scleroderma, and one with NSIP and organising pneumonia. PET acquisition was performed 1, 2 and 3 hours after injection of 400 MBq <sup>18</sup>F-proline. We scored <sup>18</sup>F-Proline activity visually and quantitatively by calculating the activity in the regions of interest over lung, liver and mediastinum.

We found low uptake of <sup>18</sup>F-proline in the lungs of all patients with IPF. The highest uptake was seen at two hours post injection, with a decline at three hours past injection. The differences in lung uptake between patients were small, except for one patient with NSIP and organising pneumonia who had a slightly higher <sup>18</sup>F-proline uptake.

Due to the low pulmonary uptake, <sup>18</sup>F-proline does not seem to be a suitable radioligand to evaluate the activity of fibrosis formation in patients with IPF. The low uptake in the lungs of patients with interstitial fibrosis may be explained by the slow nature of fibrogenesis.

**Tijdschr Nucl Geneesk 2008; 30(4):133-138**

## Introductie

Idiopathische Pulmonale Fibrose (IPF) is een dodelijke longziekte zonder duidelijke oorzaak of effectieve behandeling [1]. De afdeling longziekten in het St. Antonius ziekenhuis heeft een aandachtsgebied interstitiële longziekten (prof. dr. J.M.M. van den Bosch en dr. J.C. Grutters) en is een landelijk verwijscentrum. Hier wordt uitgebreid diagnostisch onderzoek gedaan, worden klinische trials uitgevoerd, en worden patiënten gescreend voor een eventuele longtransplantatie welke in het Hart Long Centrum Utrecht uitgevoerd wordt. IPF wordt histologisch gekarakteriseerd door progressieve fibrotische verandering in de longen (fig. 1).

Interstitiële fibrose kan bestaan uit gestabiliseerde fibrose of uit actieve fibroblast proliferatie [2]. High Resolution Computer Tomography (HR-CT) en longfunctie testen zijn tot op heden de enige manier om de uitbreiding van de ziekte te bepalen, en door herhaalde metingen ook de progressie en behandelrespons. Deze technieken kunnen echter niet differentiëren tussen gestabiliseerde fibrose en actieve collageen productie op een bepaald tijdstip. [2,3]. Het zou echter wel erg bruikbaar zijn om het in het begin van de ziekte een voorspelling te kunnen doen over progressie en prognose, hetgeen cruciaal is bij patiënten die profijt kunnen hebben van een longtransplantatie. Verder kan bij de evaluatie van nieuwe therapieën een adequate bepaling van fibrose activiteit de follow-up periode drastisch reduceren. <sup>18</sup>F-proline is een kandidaat PET radioligand die mogelijk geschikt is voor dit doel [4,5]. Het aminozuur proline is namelijk een specifieke component van collageen en de inbouw van proline kan daarom een marker zijn voor collageensynthese in de longen. Eerder lieten 2 dierstudies zien dat <sup>18</sup>F-proline accumuleert in fibrotisch long weefsel. [6,7]. Deze studies betroffen een dierstudie waarbij fibrose werd geïnduceerd door inhalatie van silica in konijnenlongen.

Beide studies toonden opname van  $^{18}\text{F}$ -proline in de longen. Eerdere humane studies werden uitgevoerd voor doeleinden anders dan fibrose.

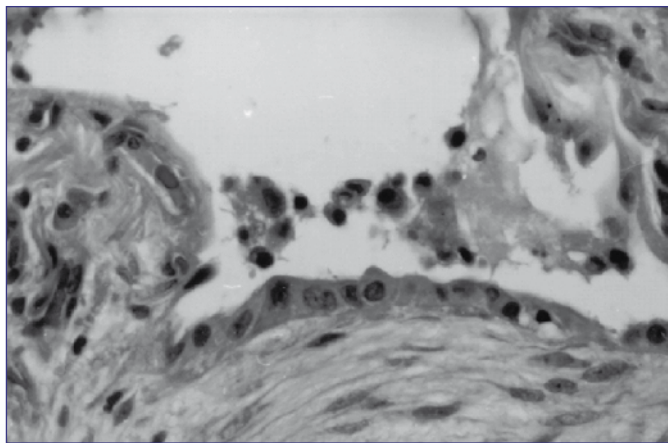
Als aminozuur zou proline ook als tumormarker kunnen fungeren. Gezien de uitscheiding in de nieren en de non-permeabiliteit van de bloed-hersenbarrière maken de stof echter ongeschikt voor urologische tumoren of gliomen [8,9]. Belangrijke bevinding bij deze humane studies was dat  $^{18}\text{F}$ -proline geen bijwerkingen geeft en bij een dosis van 400 MBq een effectieve dosis veroorzaakt van 6,0 mSv.

Doel van deze studie was om de opname van  $^{18}\text{F}$ -proline in de vorming van extracellulaire matrix van longweefsel te bepalen bij patiënten met IPF om zo vast te stellen of  $^{18}\text{F}$ -proline een geschikte PET radioligand is om collageenvorming in de extracellulaire matrix, en daarmee ziekte-activiteit, te bepalen.

## Methoden

### Patiënten

Patiënten boven de 50 jaar met zowel histologisch als radiologisch bewezen IPF, gediagnosticeerd volgens criteria van de European Respiratory Society en American Thoracic Society [10] konden worden geïncludeerd. Inclusie werd verricht door de behandelend longarts. Alle patiënten



Figuur 1. fibroblast focus in de long, histologische coupe.

tekenden een toestemmingsverklaring.

De lokale ethische commissie had veel moeite met het oorspronkelijke protocol waarbij de opzet was om een kleine groep patiënten te vergelijken met een groep gezonde controlepersonen.

Theoretisch was dit de meest betrouwbare opzet om te beoordelen of er significante opname van  $^{18}\text{F}$ -proline in de longen zichtbaar was. De ethische commissie ging hiermee echter niet accoord en wilde geen gezonde personen blootstellen aan de stralenbelasting van een niet geregistreerd radioligand.

Als alternatief werd na enkele gesprekken besloten om eerst de patiëntengroep te includeren, deze scans uit te werken en alleen bij zichtbare  $^{18}\text{F}$ -proline activiteit in de longen alsnog

een gezonde controlegroep te includeren.

### $^{18}\text{F}$ -proline

Omdat het St. Antonius niet beschikt over de faciliteiten en kennis om  $^{18}\text{F}$ -proline injectievloeistof te bereiden is een overeenkomst gesloten tussen het Radionuclide Centrum van de afdeling Nucleaire Geneeskunde & PET research van het VU medisch centrum in Amsterdam en het St. Antonius voor de collegiale bereiding van  $^{18}\text{F}$ -proline. De verantwoordelijkheid voor bereiding, kwaliteitscontrole en vrijgifte lag bij het Radionuclide Centrum en de ontvanger was verantwoordelijk voor controle van de integriteit van de verpakking en de aanwezigheid van een vrijgifte certificaat.  $^{18}\text{F}$ -proline (Cis-4-[ $^{18}\text{F}$ ]-Fluoro-L-Proline) werd bereid volgens een aangepaste procedure volgens Hamacher [11]. De radiochemische zuiverheid was > 98%, specifieke activiteit > 18,5 GBq/ $\mu\text{mol}$ .  $^{18}\text{F}$ -proline werd intraveneus toegediend in een dosis van 400 MBq.

### PET imaging

PET scans werden verricht op een Philips Allegro PET scanner. Transmissie opnamen werden uitgevoerd met een  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  roterende lijnbron voor gemeten attenuatie correctie met iteratieve 3D RAMLA software voor beeld reconstructie. Acquisities vonden plaats 1 uur na injectie van  $^{18}\text{F}$ -proline voor whole body opnamen van hoofd tot lies, met 3 min emissie per bedpositie en 3 min transmissie. Aanvullende late opnamen van de thorax werden verricht 2 en 3 uur na injectie met emissie opnamen van achtereenvolgens 6 en 7 min per bedpositie. Additionele transmissieopnamen van 3 min per bedpositie. Alle patiënten waren nuchter voor ten minste 6 uur voorafgaand aan de studie.

### PET beoordeling

Twee ervaren nucleair geneeskundigen beoordeelden de scans zonder wetenschap van het type fibrose van de patiënt. Standardized uptake values (SUV) werden berekend door vaste ronde regio's van interesse te plaatsen op een coronale coupe in de bovenste en onderste helft van elke long en ook van lever en mediastinum. Voor SUV berekening werden patiëntengewicht en toegediende dosis gebruikt. We berekenden ratio's tussen longopname en mediastinum en long-lever ratio's om te compenseren voor wisselende SUV metingen door variabele nieropname.

### Resultaten

Vijf patiënten met IPF werden geïncludeerd in de studie in een periode van meer dan 1 jaar. Verder includeerden we 2 patiënten met niet-specifieke interstitiële pneumonie (NSIP) waarvan er een ook sclerodermie had en een NSIP met daarbij een organiserende pneumonie. De gemiddelde leeftijd was 59 jaar, (48 tot 76), met een gemiddeld gewicht van 87 kg (73 tot 105 kg). Zes patiënten werden behandeld met orale corticosteroiden ten tijde van het onderzoek, met een gemiddelde dosis van 24,2 mg per dag (10 tot 60 mg). Geen van de patiënten

rookte, 5 patiënten hadden in het verleden gerookt. Drie patiënten gebruikten dagelijks zuurstof, ook tijdens de PET scan.

### **<sup>18</sup>F-proline PET scan Resultaten**

<sup>18</sup>F-proline activiteit in de longen was laag en min of meer homogeen verdeeld over de longen bij alle geïncludeerde patiënten (fig. 1). Visueel waren er geen verschillen in <sup>18</sup>F-proline opname zichtbaar tussen patiënten. We zagen geen vlekkerige actieve of koude gebieden in de longen, zoals te verwachten gezien de typische haarden op HR-CT. Scans van alle patiënten toonden hoge activiteit in de nieren en blaas door de renale excretie. Bij sommige patiënten was de pancreas zichtbaar, evenals de parotiden. Visueel was er geen verschil in <sup>18</sup>F-proline activiteit in de longen tussen de scans op verschillende tijdstippen. Bij een patiënt werd de derde scan achterwege gelaten vanwege dyspnoe ondanks zuurstofgebruik tijdens de scan.

### **SUV waarden bij <sup>18</sup>F-proline**

De gemiddelde SUV in de longen van alle patiënten bedroeg 0,99 (SD 0,48) in de initiële scan, een uur na toediening van

<sup>18</sup>F-proline (tabel 1). Vanwege de homogene verdeling was de SUV max gelijk aan de gemiddelde SUV in een regio. De gemiddelde opname was het hoogst op de scan 2 uur na injectie, met een gemiddelde van 1,03 (SD 0,48) en nam af op de late scan, 3 uur na injectie (gemiddeld 0,89; SD 0,60), (fig. 2). Ratio's van long over mediastinum en long over lever toonden eveneens de hoogste waarde 2 uur na injectie van <sup>18</sup>F-proline. Daarmee lijkt 2 uur na injectie het optimum voor specifieke activiteitsopname in de long. De opname was min of meer homogeen over de longen verspreid, met een gemiddelde van 1,01 in de bovenzelden en 1,05 in de ondervelden van alle patiënten 2 uur na injectie.

Individuele patiënten toonden vergelijkbare waarden, behalve een vrouwelijke patiënte met een NSIP met daarbij een organiserende pneumonie. Haar pulmonale <sup>18</sup>F-proline opname was duidelijk hoger dan die van alle andere patiënten (fig. 3) met een gemiddelde SUV van 1,95 2 uur na injectie, vergeleken met een gemiddelde SUV van de andere patiënten van 1,03.

### **Discussie**

<sup>18</sup>F-proline werd geëvalueerd als kandidaat PET radioligand >>

Tabel 1.

SUV waarden van <sup>18</sup>F-proline PET opname in de longen bij patiënten met ernstige longfibrose op basis van IPF en NSIP (gemiddelde en SD)

patient	diagnose	1 uur na injectie		2 uur na injectie		3 uur na injectie	
		long	Long/ mediastinum	long	long/ mediastinum	long	long/ mediastinum
1	IPF	0,70 (0.14)	0,44 (0.09)	0,75 (0.57)	0,58 (0.44)	0,40 (0.00)	0,36 (0.00)
2	IPF	0,65 (0.13)	0,41 (0.08)	0,63 (0.46)	0,48 (0.35)	Niet uitgevoerd	Niet uitgevoerd
3	IPF	0,60 (0.00)	0,38 (0.00)	0,55 (0.13)	0,50 (0.12)	0,50 (0.00)	0,45 (0.00)
4	IPF	1,08 (0.15)	0,45 (0.06)	1,25 (0.37)	0,60 (0.18)	0,83 (0.22)	0,38 (0.10)
5	IPF	0,88 (0.21)	0,49 (0.11)	1,00 (0.62)	0,48 (0.29)	0,68 (0.15)	0,42 (0.09)
6	NSIP*	1,03 (0.21)	0,47 (0.09)	1,08 (0.10)	0,57 (0.05)	0,90 (0.22)	0,53 (0.13)
7	NSIP**	2,00 (0.21)	0,91 (0.16)	1,95 (0.31)	0,85 (0.14)	2,05 (0.13)	0,89 (0.06)
Gemiddelde SUV		0,99 (0.17)	0,50 (0.09)	1,03 (0.18)	0,58 (0.11)	0,89 (0.08)	0,51 (0.04)

Gemiddelde long opname en long/mediastinum ratio's (met SD)

IPF idiopathische pulmonale fibrose

NSIP niet-specifieke interstitiële pneumonie

\*In combinatie met sclerodermie

\*\*In combinatie met organiserende pneumonie



**Figuur 2.**  
Maximum intensiteits projectie van  $^{18}\text{F}$ -proline PET bij een patiënt met IPF toont lage activiteit in de longen, hoge activiteit in de nieren en blaas, en matige activiteit in pancreas, parotiden en lever.

>> om de mate van fibrosevorming, fibrogenese, te detecteren bij patiënten met een specifieke vorm van longfibrose, IPF. In geen van de patiënten met IPF werd echter significante pulmonale opname van  $^{18}\text{F}$ -proline gevonden. Dit komt niet overeen met dierstudies waarbij duidelijk verhoogde  $^{18}\text{F}$ -proline opname in longen met actieve fibrosering werd gezien. Voor deze discrepantie zijn een aantal verklaringen te geven. Allereerst, alhoewel de dierenstudies duidelijke long opname tonen van  $^{18}\text{F}$ -proline, werd niet bewezen dat dit ook werkelijk accumulatie in fibroblasten betrof [6,7]. De toegediende silica in de konijnenlongen induceert uitgebreide littekenvorming in een korte tijd, maar gezien de acute aard van deze provocatie kan de  $^{18}\text{F}$ -proline opname misschien beter verklaard worden door inflammatie, en daarmee gepaard gaande verhoogde perfusie, dan door fibrogenese. De situatie bij proefdieren met acuut geïnduceerde fibrose is daarom mogelijk niet vergelijkbaar met het trage proces bij patiënten. Deze hypothese komt overeen met een recente  $^{18}\text{F}$ -proline studie over littekenvorming bij ratten [12]. Hierbij werd geen specifieke opname van  $^{18}\text{F}$ -proline in bindweefsel gezien, maar wel hoge  $^{18}\text{F}$ -proline activiteit direct na het maken van de

laesie. Deze opname lijkt meer gecorreleerd met inflammatie dan met fibrosering. Deze bevinding kan ook de relatief hoge  $^{18}\text{F}$ -proline longopname verklaren bij onze patiënte met NSIP en daarbij organiserende pneumonie. Een eerdere  $^{18}\text{F}$ -FDG PET scan bij dezelfde patiënte toonde matig hoge activiteit in beide longen, waarschijnlijk gebaseerd op neutrofiel activiteit [13]. Ook het homogene verdelingspatroon van  $^{18}\text{F}$ -proline lijkt meer te passen bij inflammatie of verhoogde perfusie aangezien volgens ATS standaarden het HR-CT beeld van IPF vlekkerige en voornamelijk perifere subpleurale en basale reticulaire afwijkingen laat zien [10]. Dit was zeker niet het geval bij de  $^{18}\text{F}$ -proline scans, welke een vrijwel homogene verdeling van activiteit toonden.

Een tweede verklaring voor het niet zichtbaar worden van fibrosering is mogelijk het trage proces van fibrosering. Isotopen met een langere halveringstijd, zoals  $^{111}\text{In}$ , met een halveringstijd van 2,8 dagen, is mogelijk meer geschikt. Dit werd onlangs bevestigd in een studie met  $^{111}\text{In}$ -octreotide en patiënten met IPF [14]. Deze studie toonde meer dan 2 maal zo hoge  $^{111}\text{In}$ -octreotide activiteit in de longen van patiënten met IPF ten opzichte van gezonde controles. Ook al is  $^{111}\text{In}$ -octreotide misschien niet de meest selectieve ligand voor fibrosering, de langere halveringstijd maakt deze tracer geschikt voor trage processen. Voorlopige resultaten op onze afdeling bevestigen de bevinding van de Franse groep, ook wij zien significant verhoogde  $^{111}\text{In}$ -octreotide activiteit bij patiënten met IPF, maar deze is zeker niet tweemaal zo hoog, en ook hier is de vraag of inflammatoire processen niet een deel van de opname kunnen verklaren.

Er zijn enkele tekortkomingen aan deze studie. Meest belangrijk is dat er geen directe vergelijking werd gemaakt met gezonde controles. Zoals eerder besproken ging de medisch ethische commissie hier niet mee accoord. Dit blijkt nu vooral een theoretisch manco, want gezien de lage longopname bij ernstig ziek patiënten met IPF, valt niet te verwachten dat  $^{18}\text{F}$ -proline activiteit nog lager zal zijn in de longen van gezonde controlepersonen. Verder gebruikten alle patiënten corticosteroïden gedurende het onderzoek. We vonden echter geen correlatie tussen dosering en  $^{18}\text{F}$ -proline activiteit. Ook wordt niet verwacht dat corticosteroïden de fibrosering bij patiënten met IPF tegengaan.

Concluderend kunnen we zeggen dat er geen significante  $^{18}\text{F}$ -proline opname gevonden wordt bij patiënten met ernstige IPF. Hiermee lijkt  $^{18}\text{F}$ -proline geen geschikt PET radioligand om fibrosering te detecteren.

**Dit onderzoek werd financieel ondersteund door het innovatiefonds van het St. Antonius ziekenhuis.**

*Dit artikel is een bewerking van het artikel "Imaging of Fibrogenesis in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis with cis-4-[18F]-Fluoro-L-Proline PET"*

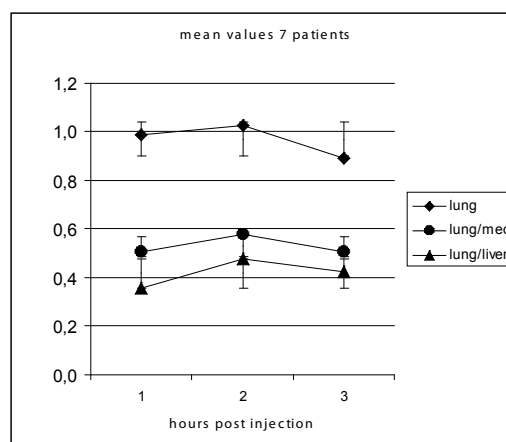


Jules Lavalaye, Jan C. Grutters, Ewoudt M.W. van de Garde, Monique M.C. van Buul, Jules M.M. van den Bosch, Albert D. Windhorst, Fred J. Verzijlbergen.

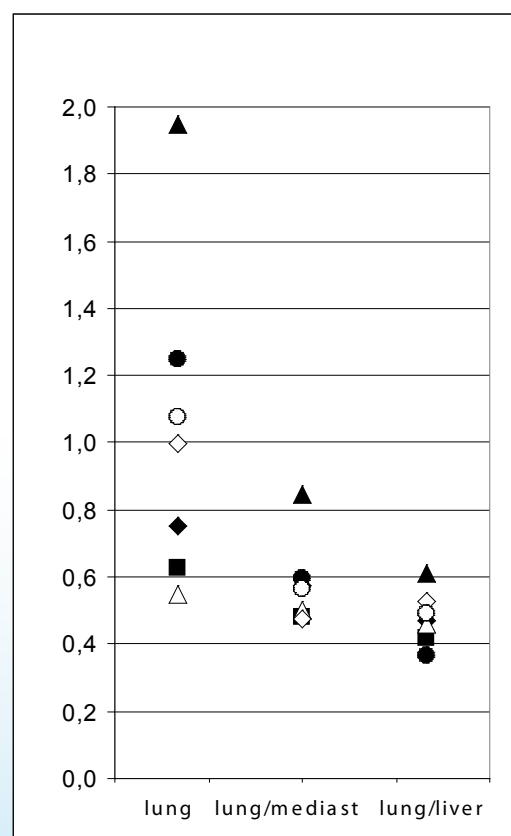
Gepubliceerd in *Molecular Imaging and Biology*, DOI: 10.1007/s11307-008-0164-1

## Referenties

1. Strieter RM. Pathogenesis and natural history of usual interstitial pneumonia: the whole story or the last chapter of a long novel. *Chest* 2005;128:526S-532S
2. Khalil N, O'Connor R. Idiopathic pulmonary fibrosis: current understanding of the pathogenesis and the status of treatment. *CMAJ* 2004;171:153-160.
3. Laurent GJ. Biochemical pathways leading to collagen deposition in pulmonary fibrosis. *Ciba Found Symp* 1985;114:222-233.
4. Takeuchi T, Prockop DJ. Biosynthesis of abnormal collagens with amino acid analogues. I. Incorporation of L-azetidine-2-carboxylic acid and cis-4-fluoro-L-proline into protocollagen and collagen. *Biochim Biophys Acta* 1969;175:142-155.
5. Wester HJ, Herz M, Senekowitsch-Schmidtke R, Schwaiger M, Stocklin G, Hamacher K. Preclinical evaluation of 4-[18F] fluoroprolines: diastereomeric effect on metabolism and uptake in mice. *Nucl Med Biol* 1999;26:259-265.
6. Wallace WE, Gupta NC, Hubbs AF, Mazza SM, Bishop HA, Keane MJ et al. Cis-4-[(18F)]fluoro-L-proline PET imaging of pulmonary fibrosis in a rabbit model. *J Nucl Med* 2002;43:413-420.
7. Jones HA, Boobis AR, Hamacher K, Coenen HH, Clark JC. PET imaging of pulmonary fibrosis. *J Nucl Med* 2003;44:483-484.
8. Langen KJ, Borner AR, Muller-Mattheis V, Hamacher K, Herzog H, Ackermann R et al. Uptake of cis-4-[18F]fluoro-L-proline in urologic tumors. *J Nucl Med* 2001;42:752-754.
9. Langen KJ, Jarosch M, Hamacher K, Muhlensiepen H, Weber F, Floeth F et al. Imaging of gliomas with Cis-4-[18F]fluoro-L-proline. *Nucl Med Biol* 2004;31:67-75.
10. American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This Joint Statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS Board of Directors, June 2001 and by The ERS Executive Committee, June 2001. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:277-304.
11. Hamacher K. Synthesis of n.c.a. cis- and trans-4-[18F]fluoro-L-proline, radiotracers for PET-investigations of disordered matrix protein synthesis. *J Labelled Cpd Radiopharm* 1999;42:1135-1142.
12. Zimny M, Klosterhalfen B, Conze J, Hamacher K, Fehler S, Schumpelick V et al. Uptake of cis-4-[18 F]fluoro-L-proline in scar formation: a marker of collagen synthesis? *Nucl Med Commun* 2002;23:695-698.
13. Jones HA, Schofield JB, Krausz T, Boobis AR, Haslett C. Pulmonary fibrosis correlates with duration of tissue neutrophil activation. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:620-628.
14. Lebtahi R, Moreau S, Marchand-Adam S, Debray MP, Brauner M, Soler P et al. Increased Uptake of 111In-Octreotide in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *J Nucl Med* 2006;47:1281-1287.



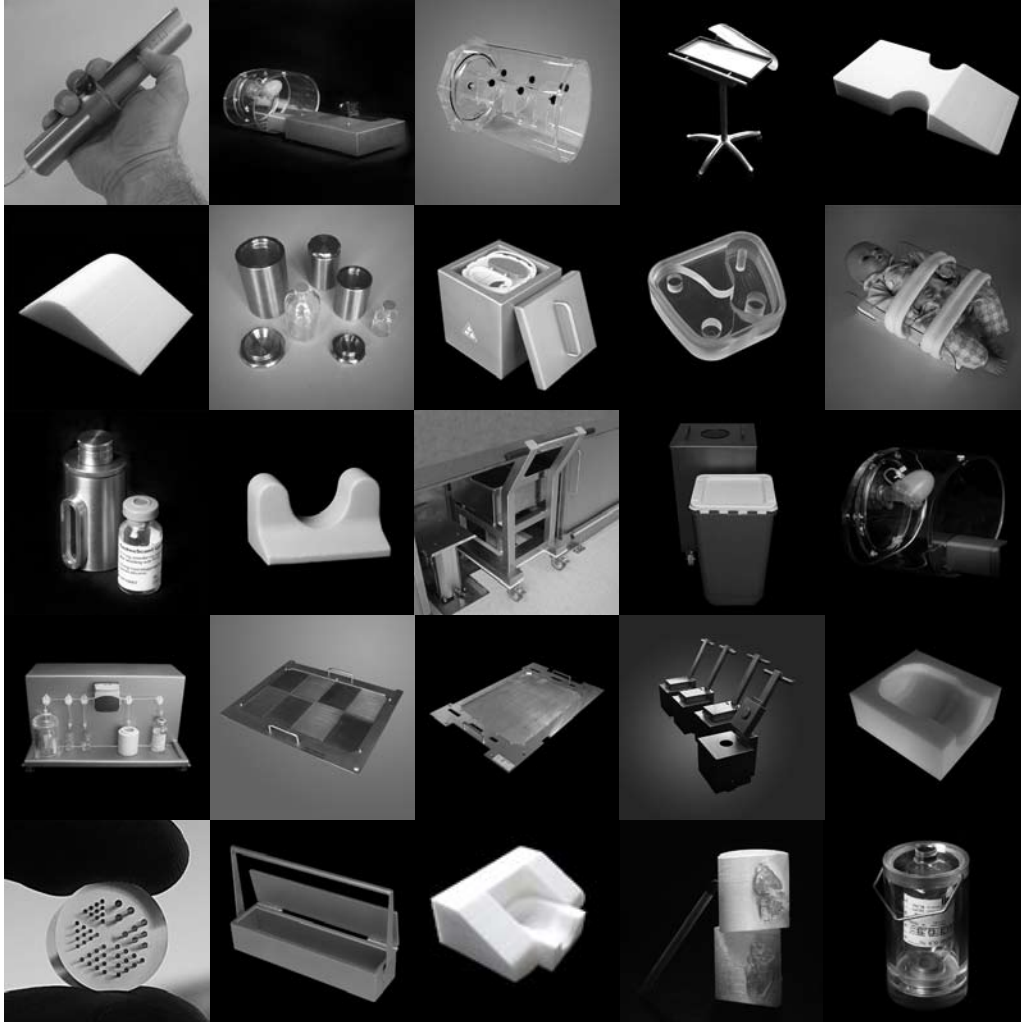
**Figuur 3.**  $^{18}\text{F}$ -proline PET activiteit in de longen bij 7 patiënten met longfibrose. Bovenste curve toont waarden in de long, middelste toont ratio's over mediastinum en onderste over de lever. De error bars staan voor standaard deviaties.



**Figuur 4.** Individuele SUV waarden in de long bij patiënten met longfibrose 2 uur na injectie met  $^{18}\text{F}$ -proline, en ratio's over mediastinum en lever. Een patiënt met NSIP had hogere pulmonale  $^{18}\text{F}$ -proline opname dan de andere patiënten. Gelijke symbolen staan voor gelijke patiënten.

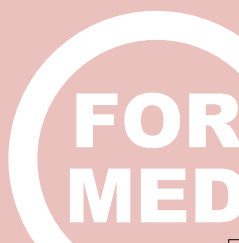
# VANDERWILT

techniques



VANDERWILT techniques is a development and manufacturing company, specialised in products for nuclear medicine such as patient positioning products, phantoms and shielding products

**T +31 (0)411 68 60 19 | [www.for-med.nl](http://www.for-med.nl)**



# Amyloid imaging in Alzheimer's disease: a promising new direction in Nuclear Medicine



<sup>1</sup>Department of Nuclear Medicine & PET research

<sup>2</sup>Alzheimer Center

VU University Medical Centre, Amsterdam

Dr. B.N.M. van Berckel<sup>1,2</sup> The Netherlands

## Abstract

**Van Berckel BN. Amyloid imaging in Alzheimer's disease: a promising new direction in Nuclear Medicine.**

The diagnosis of Alzheimer's disease (AD) is based on clinical criteria, which have only moderate accuracy, especially in the earliest phases of the disease. Therefore, there is a great need for methods that can help with early diagnosis. Imaging of beta-amyloid depositions may provide such a method as beta-amyloid is considered to be central to AD. Recently, several amyloid-imaging tracers have been introduced to clinical practice. Among these <sup>11</sup>C-PIB and <sup>18</sup>F-BAY94-9172 have sufficient high specific binding enabling identification of pathological amyloid load on an individual basis. Thus, don't be surprised if your local neurologist asks you for amyloid scans within the coming years.

**Tijdschr Nucl Geneesk 2008; 30(4):139-141**

## Background

Alzheimer's disease (AD) is a progressive and fatal neurodegenerative disorder characterized by cognitive deterioration, progressive impairment of activities of daily living, and a variety of neuropsychiatric symptoms [1;2]. Prevalence studies suggest that in 2002, the number of patients with Alzheimer's disease in the Netherlands was 175.000, a figure that will almost triple before the year 2040 if no advances in therapy are made [3]. The prevalence in the community is 5% of the elderly of 65 years and older, a figure that doubles every 5 years [3]. Consequently, effective therapy postponing the incidence of AD for 5 years will reduce the prevalence with 50%. The cost of caring for patients with AD is very high and was estimated to be 10-25% of the

total health care budget in 1998 [4]. Current pharmacological treatment of AD at best reduces the rate of deterioration and includes treatment with cholinesterase inhibitors, glutamate antagonist and neuro-protective strategies[1]. As such there is a great need for novel treatment strategies for AD.

The diagnosis of AD is based on clinical criteria (NINCDS-ADRDA) and classified as definite (only post-mortem), probable and possible[5]. Using these criteria, typical sensitivity and specificity values for the diagnosis of probable AD are 0.65 and 0.75, respectively. Neuro-imaging plays an important role in the diagnosis of AD and is particularly helpful in excluding alternative causes of dementia. At present, structural MRI is recommended for clinical diagnosis [6] and functional imaging with [<sup>18</sup>F]FDG PET has been found to be helpful in the differential diagnosis of disorders associated with dementia, especially frontotemporal dementia [7]. However, clinical diagnosis and most imaging techniques, even [<sup>18</sup>F]FDG PET, have low specificity and sensitivity for diagnosis in the earliest phases of the disease [8] and become conclusive only when symptoms are prominent and major neuro-degeneration already has taken place. Therefore, there is a great need for methods that can help with the diagnosis in an earlier phase of the disease, currently designated as mild cognitive impairment (MCI) a disease state considered to be a transitional state between normal aging and dementia [9;10]. It is generally accepted that the ability to identify the presence of AD within the MCI population will enhance the development of disease modifying strategies and will benefit disease management.

## Alzheimer's disease & Amyloid

There is increasing consensus that the production and accumulation of beta-amyloid (A $\beta$ ) is central to the pathogenesis of Alzheimer's disease [11]. A $\beta$  is neurotoxic in vitro and in vivo and leads to cell death even before plaque formation [12;13]. Formation of neurofibrillary tangles,

glutamatergic excitotoxicity, inflammation and activation of the cascade of apoptotic cell death are considered secondary consequences of the generation and deposition of A $\beta$  [1]. A $\beta$  may be present in the brain at sublethal concentrations for extended periods (read decades) before the overt manifestation of the disorder [9]. Therefore, early in vivo detection of pathological A $\beta$  accumulation would be a major step forward. In vivo quantification of pathological A $\beta$  accumulation is potentially very important because it is a direct measurement of a fundamental aspect of AD, directly linked to aspects of neuronal dysfunction and neurodegeneration. Better identification of A $\beta$  accumulation, and its time course and relation to clinical symptoms are of great pathophysiological and clinical importance. Novel anti-amyloid drugs for the treatment of AD can be assessed more accurately using an amyloid tracer. Such a tracer will allow for better identification of appropriate patients and it can serve

as a surrogate endpoint for assessment of therapy. Other experimental treatment strategies can be initiated to obtain more insight in the pathophysiology of A $\beta$  accumulation. In addition, in vivo amyloid imaging may identify subjects who are at risk for AD at a much earlier stage and may therefore be of great clinical value. Ideally, these subjects should be treated with anti-amyloid drugs to prevent or slowdown the neurodegenerative process in this disease. Future therapeutic strategies may include vaccination against A $\beta$  formation and for the selection of patients undergoing this therapy identification of A $\beta$  presence is mandatory [14].

### Detecting amyloid *in vivo* using PET

After years of preclinical research, several amyloid-imaging tracers have been introduced first into clinical practice recently [15; 16].  $^{18}\text{F}$ -FDDNP (2-(1-{6-[(2- $^{18}\text{F}$ -fluoroethyl) (methyl)amino]-2-naphthyl}ethylidene)malo nitrile) and  $^{11}\text{C}$ -PIB (N-methyl- $^{11}\text{C}$ -2-(4'-methylaminophenyl)-6-hydroxy benzothiazole) have been used the most frequently. Both tracers bind with nanomolar affinity to amyloid: KD of  $^{18}\text{F}$ -FDDNP and  $^{11}\text{C}$ -PIB are 0.75 and 1-2 nM, respectively [16;17]. Both tracers enter the brain in amounts sufficient for imaging with PET. Indeed, the first proof of concept studies of  $^{11}\text{C}$ -PIB and  $^{18}\text{F}$ -FDDNP indicated that AD patients showed increased retention of these tracers compared with controls in areas known to contain large amounts of amyloid deposits [15;16]. However, the specific binding component of  $^{11}\text{C}$ -PIB is almost nine-fold higher than that of  $^{18}\text{F}$ -FDDNP and the latter has substantial overlap with binding in controls. As such, identification of pathological amyloid load on an individual basis is possible with  $^{11}\text{C}$ -PIB but will prove to be difficult with  $^{18}\text{F}$ -FDDNP, limiting its clinical applicability.

Although the specific binding of  $^{11}\text{C}$ -PIB has an excellent effect size in AD patients, the clinical use of  $^{11}\text{C}$ -PIB is hampered by the short half life of the radionuclide  $^{11}\text{C}$ .  $^{11}\text{C}$ -PIB is currently only available at the department of Nuclear Medicine & PET research of the VU University Medical Centre. However,  $^{18}\text{F}$ -PIB is currently undergoing clinical trials and first results look promising. The longer half-life of  $^{18}\text{F}$ -PIB compared with  $^{11}\text{C}$ -PIB, 110 minutes versus 20 minutes, respectively, makes it possible to perform studies at PET centers without an on-site cyclotron, greatly increasing its clinical value. In addition, new  $^{18}\text{F}$ -labeled ligands for amyloid imaging have been published, such as  $^{18}\text{F}$ -BAY94-9172 [18], which also have a good effect size and may become available for clinical use within the coming years.

### Future research

Especially the role of amyloid imaging in MCI is currently a very active area of research. In this patient category, standard diagnostic procedures have a low accuracy for detection of AD and amyloid imaging may contribute substantially to early diagnosis of AD in MCI. Until to date all MCI patients

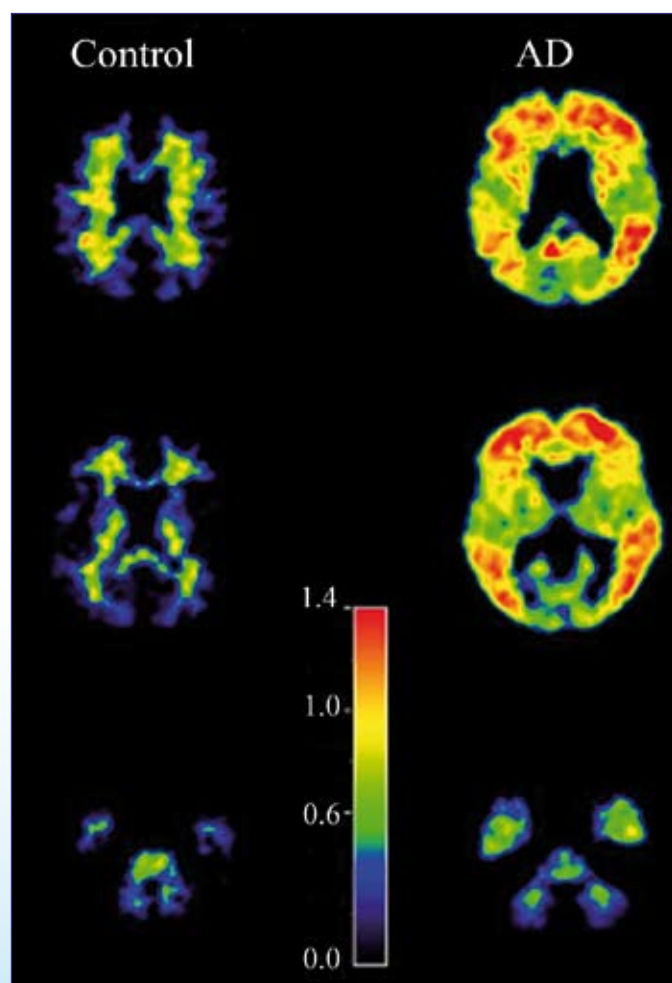


Figure 1:  
Parametric  $^{11}\text{C}$ -PIB  $BP_{ND}$  images in a control subject and an AD patient. Note the large difference in specific binding between two subjects.  
Courtesy: dr. R.Boellaard



who converted to AD were classified as “<sup>11</sup>C-PIB positive”, suggesting that a positive <sup>11</sup>C-PIB scan is indeed predictive of conversion to AD[19]. However, the clinical follow-up time is still relative short and a large percentage of <sup>11</sup>C-PIB -positive MCI patients have not converted (yet). The same holds for finding of increased <sup>11</sup>C-PIB binding in cognitive normal subjects. It remains currently unclear if these subjects are suffering from AD in its very early stages. Interestingly, it has already been described that “<sup>11</sup>C-PIB positive” normal subjects have more rapid cognitive decline compared to “<sup>11</sup>C-PIB negative” subjects[20], suggesting that <sup>11</sup>C-PIB is indeed capable to detect pathological amyloid depositions very early in the disease. Again follow-up studies have to reveal if normal subjects with high <sup>11</sup>C-PIB binding indeed proceed to develop AD.

### Conclusion

The field of amyloid imaging in AD is an exciting area for nuclear medicine physicians and *in-vivo* amyloid imaging is rapidly progressing into clinical practice. Don't be surprised if your local neurologist asks you for an amyloid scan in a patient with memory problems or other cognitive problems within the coming years.

### References

- Cummings JL. Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2004; 351(1):56-67.
- Nestor PJ, Scheltens P, Hodges JR. Advances in the early detection of Alzheimer's disease. *Nat Med* 2004; 10 Suppl:S34-S41.
- Health Council of the Netherlands. Dementia. 2002.
- Meerding WJ, Bonneux L, Polder JJ, Koopmanschap MA, van der Maas PJ. Demographic and epidemiological determinants of healthcare costs in Netherlands: cost of illness study. *BMJ* 1998; 317(7151):111-115.
- McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's disease. *Neurology* 1984;34:939-944
- Knopman DS, DeKosky ST, Cummings JL, Chui H, Corey-Bloom J, Relkin N et al. Practice parameter: diagnosis of dementia (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 2001; 56(9):1143-1153.
- Silverman DH, Small GW, Chang CY, Lu CS, Kung De Aburto MA, Chen W et al. Positron emission tomography in evaluation of dementia: Regional brain metabolism and long-term outcome. *JAMA* 2001; 286(17):2120-2127.
- Patwardhan MB, McCrory DC, Matchar DB, Samsa GP, Rutschmann OT. Alzheimer disease: operating characteristics of PET—a meta-analysis. *Radiology* 2004; 231(1):73-80.
- Nestor PJ, Scheltens P, Hodges JR. Advances in the early detection of Alzheimer's disease. *Nat Med* 2004; 10 Suppl:S34-S41.
- Petersen RC, Doody R, Kurz A, Mohs RC, Morris JC, Rabins PV et al. Current concepts in mild cognitive impairment. *Arch Neurol* 2001; 58(12):1985-1992.
- Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 2002; 297(5580):353-356.
- Schmitz C, Rutten BP, Pielen A, Schafer S, Wirths O, Tremp G et al. Hippocampal neuron loss exceeds amyloid plaque load in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 2004; 164(4):1495-1502.
- Tong L, Balazs R, Thornton PL, Cotman CW. Beta-amyloid peptide at sublethal concentrations downregulates brain-derived neurotrophic factor functions in cultured cortical neurons. *J Neurosci* 2004; 24(30):6799-6809.
- Winblad B, Blum KI. Hints of a therapeutic vaccine for Alzheimer's? *Neuron* 2003; 38(4):517-518.
- Small GW, Kepe V, Ercoli LM, Siddarth P, Bookheimer SY, Miller KJ et al. PET of brain amyloid and tau in mild cognitive impairment. *N Engl J Med* 2006; 355(25):2652-2663.
- Agdeppa ED, Kepe V, Liu J, Small GW, Huang SC, Petric A et al. 2-Dialkylamino-6-acylmalononitrile substituted naphthalenes (DDNP analogs): novel diagnostic and therapeutic tools in Alzheimer's disease. *Mol Imaging Biol* 2003; 5(6):404-417.
- Klunk WE, Engler H, Nordberg A, Wang Y, Blomqvist G, Holt DP et al. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann Neurol* 2004; 55(3):306-319.
- Rowe CC, Ackerman U, Browne W, Mulligan R, Pike KL, O'Keefe G et al. Imaging of amyloid beta in Alzheimer's disease with <sup>18</sup>F-BAY94-9172, a novel PET tracer: proof of mechanism. *Lancet Neurol* 2008; 7(2):129-135.
- Forsberg A, Engler H, Almkvist O, Blomqvist G, Hagman G, Wall A et al. PET imaging of amyloid deposition in patients with mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging* 2008; 29(10):1456-1465.
- Pike KE, Savage G, Villemagne VL, Ng S, Moss SA, Maruff P et al. Beta-amyloid imaging and memory in non-demented individuals: evidence for preclinical Alzheimer's disease. *Brain* 2007; 130(Pt 11):2837-2844. 

# Ruimtelijke voorzieningen bij de bereiding van radiofarmaca: welke regels gelden wanneer?



Dr. K.J.M. Schimmel<sup>1</sup>



Drs. F.A. Boom<sup>2</sup>



Drs. M. Heeringa<sup>3</sup>



Dr. A. Vermes<sup>4</sup>



Dr. P.P.H. Le Brun<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Leids Universitair Medisch Centrum, Leiden

<sup>2</sup>Zaans Medisch Centrum, Zaandam

<sup>3</sup>Ziekenhuisapotheek Noord-oost Brabant, Den Bosch

<sup>4</sup>Apotheek Erasmus MC, Rotterdam

<sup>5</sup>Apotheek Haagse Ziekenhuizen, Den Haag Nederland

## Inleiding

Radiofarmaca zijn geneesmiddelen en de productie daarvan moet voldoen aan de GMP. Aangezien de GMP primair geschreven is voor grootschalige industriële geneesmiddelproductie, is in 1996 door de Nederlandse Vereniging van Ziekenhuisapothekers (NVZA) in samenwerking met de Inspectie voor de gezondheidszorg (IGZ), de GMP-Ziekenhuisfarmacie (GMP-Z) opgesteld. De GMP-Z geeft een interpretatie van de GMP en omvat richtlijnen voor het bereiden van geneesmiddelen specifiek toegespitst op de ziekenhuissituatie, die in veel opzichten afwijkt van de grootschalige industriële bereiding (diversiteit aan producten, kleine schaalgrootte, bereiding op patiëntniveau, voor-toediening-gereed-maken van geneesmiddelen (VTGM), etc).

Voor wat betreft VTGM van geregistreerde radiofarmaca zijn de hoofdstukken GMP-Z3 (aseptische handelingen, herzien in 2005) en GMP-Z4 (risicovolle geneesmiddelen, momenteel in herziening) met name van belang. [1]

Binnen de radiofarmacie zijn er echter ook situaties waarin geen sprake is van geregistreerde radiofarmaca, dan wel dat een radiofarmacon volledig zelf wordt gesynthetiseerd (bijvoorbeeld kortlevende PET-radiofarmaca) al dan niet in het kader van klinisch onderzoek. In die gevallen zijn ook de Annex 1 (manufacture of sterile medicinal products, herziene versie gepubliceerd in 2008, implementatie vereist met ingang van maart 2009) en Annex 3 (manufacture of

radiopharmaceuticals, herziene versie in 2007 gereed maar nog niet geaccordeerd) van de GMP van belang. [2]

Dat de wijze waarop de nucleaire geneeskunde is georganiseerd ook bij de overheid in de belangstelling staat, blijkt uit het in maart 2008 gepubliceerde rapport 'Nucleaire geneeskunde nog altijd niet op orde', opgesteld door de arbeidsinspectie, VROM-inspectie en de IGZ.[3] Op farmaceutisch gebied bleken volgens het rapport de volgende zaken vaak niet goed geregeld: kwaliteitsbeleid, opslagplaats van de generator, kwaliteitscontroles (inclusief microbiologische controles) en controle van de bereiding door een tweede persoon. Daarnaast werd aangegeven dat er nu geen duidelijke regels zijn voor de eisen waaraan moet worden voldaan indien alle radiofarmaca van derden worden betrokken. Overigens betrof het de resultaten van een aantal inspecties van ziekenhuizen die op basis van een enquête slecht hadden gescoord, hierdoor zijn de resultaten niet representatief voor de gehele beroepsgroep.

De verschillende regelgeving maakt dat het soms onduidelijk is waaraan de faciliteiten moeten voldoen. In dit artikel zal worden geprobeerd hier duidelijkheid in te scheppen. Hierbij is het essentieel om op te merken dat lokale situaties kunnen verschillen en dat op dit ogenblik zowel de GMP-Z4 als mede GMP Annex 3 in herziening zijn. Het artikel geeft de professionele opvattingen van de auteurs weer; het is niet altijd duidelijk in hoeverre de inspectie deze meningen deelt.

## Voor toediening gereed maken (VTGM) van radiofarmaca

In de meeste ziekenhuizen omvatten de handelingen met radiofarmaca het elueren van de technetiumgenerator en VTGM van gevriesdroogde kits. Aangezien de toediening vrijwel altijd intraveneus is, dienen de handelingen onder aseptische omstandigheden plaats te vinden en is de GMP-Z3 van toepassing.[1] In dit hoofdstuk van de GMP-Z wordt

op basis van een indeling van uit te voeren handelingen (eenvoudig, complex) en typen van productbescherming (beperkt, verhoogd, maximaal) aangegeven welke noodzakelijke voorzorgsmaatregelen nodig zijn om de steriliteit van het product te garanderen en tot welke

maximale microbiologische houdbaarheid dit leidt (tabel 1). Aangezien het werken met radioactiviteit ook bepaalde vereisten met zich meebrengt, worden in hoofdstuk GMP-Z4 de verschillende handelingen en hun relatie tot de GMP-Z3 weergegeven, zie ook tabel 2:

Tabel 1: omschrijving van complexiteit en productbeschermingsniveaus volgens Z3

Soorten handelingen	Voorbeelden van handelingen
Eenvoudig	Oplossen van poeder en opzuigen in spuit, bijspuiten van 1 of enkele injecties aan infuusoplossing
Complex	Bloedcellabelingen. Kenmerk is veel handelingen, mate waarin product een goede voedingsbodem is en/of mate waarin de handelingen volledig gesloten kunnen worden uitgevoerd
Soorten productbeschermingsniveaus	Omschrijving werkruimte
Beperkt	Gedesinfecteerd werkblad, geen specifieke achtergrond
Verhoogd	LAF-kast/veiligheidswerkbank, isolator, geen specifieke achtergrondclassificatie maar wel afgescheiden ruimte, microbiologische monitoring
Maximaal	LAF-kast/veiligheidswerkbank, isolator, achtergrond klasse D (muv isolator, dan geen eis), toegang via sluis, microbiologische monitoring

Tabel 2: Aseptische handelingen met radiofarmaca en bijbehorende bewaartermijnen

Handeling	Complexiteit vlg Z3	Productbeschermingsniveau	Maximale bewaartermijn
1. elueren, plaatsen van de* flacon met NaCl op de generator	eenvoudig	verhoogd**	7 dagen, kamertemperatuur
2. aanprikken elutieflacon	eenvoudig	verhoogd	7 dagen, 2-8 °C
3. bereiding kit	eenvoudig	verhoogd	7 dagen, 2-8 °C
4. bloedcellabeling	complex	maximaal	7 dagen, 2-8 °C
5. diverse labelingen met therapiedoseringen	eenvoudig tot complex	afhankelijk van de handeling verhoogd of maximaal	7 dagen, 2-8 °C

\* De generator wordt bewaard bij kamertemperatuur. Aangetoond dient te worden dat het eluaat uit de Tc<sup>99m</sup> generator tijdens de periode dat hij wordt gebruikt steriel is. Een procedure hiervoor is gepubliceerd op het NVZA kennisplein [4].

\*\* I.v.m. de microbiologische stabiliteit wordt het aanprikken van de generator bij voorkeur in een veiligheidswerkbank of isolator met onderdruk uitgevoerd.

Handelingen 1, 2 en 3 kunnen ook onder maximale productbescherming worden uitgevoerd. In dat geval moet al het materiaal dat in de veiligheidswerkbank of isolator wordt geplaatst volledig gedesinfecteerd worden. Bij werken onder maximale productbescherming mag een langere houdbaarheid worden gehanteerd, voor radiofarmaca is dit in het algemeen niet nodig. De Europese vereniging voor nucleaire geneeskunde (EANM) heeft ook richtlijnen uitgegeven voor de handelingen met radiofarmaca. De vereisten komen grotendeels overeen met wat hierboven is beschreven. De EANM richtlijn maakt in tegenstelling tot de Z4 geen onderscheid in de complexiteit van de handelingen. Hierdoor ontstaat een verschil in de eisen aan de achtergrondruimte waar de bereidingen plaats vinden. Het concept hoofdstuk GMP-Z4 vereist geen classificatie bij de eenvoudige handelingen, terwijl de EANM richtlijn vermeldt dat de achtergrondruimte ofwel klasse D moet zijn ofwel dat er een 'LAF-gordijn' om de LAF-kast geplaatst moet worden (tenzij er in een isolator wordt bereid, dan is er geen eis voor de achtergrond). [5]

## Bereiding van radiofarmaca vanuit uitgangsmaterialen en onderzoek met radiofarmaca

In een aantal ziekenhuizen worden radiofarmaca bereid vanuit de primaire uitgangsmaterialen. Het betreft hier veelal PET isotopen die al dan niet in eigen beheer in een cyclotron worden gemaakt en vervolgens gesynthetiseerd worden tot een radiofarmacon. Gezien de veelal korte halfwaardetijd betreft het hier meestal bereidingen voor een individuele patiënt. Het zijn daarnaast vrijwel altijd niet-geregistreerde geneesmiddelen die in onderzoeksverband worden toegepast. Bij bereiding van geneesmiddelen voor klinisch onderzoek is een fabrikantenvergunning nodig. De vergunning is niet nodig als het om VTGM handelingen gaat.

Bij een fabrikantenvergunning geldt de GMP. Als annex 1 van de GMP letterlijk zou worden toegepast zou dit voor PET syntheses betekenen dat in een klasse A ruimte met klasse B achtergrond zou moeten worden geproduceerd. Deze maatregelen zijn echter gericht op grootschalige aseptische voorraadbereidingen met een lange houdbaarheid. De NVZA en NVNG hebben hierover gezamenlijk een notitie opgesteld op basis van een professionele onderbouwing. De conclusie van deze notitie is dat gezien de aard van de handelingen en het beperkte afbreukrisico, de GMP principes goed worden beschreven in de GMP-Z3 en Z4. Deze hoofdstukken kunnen dan ook voor de individuele PET syntheses van toepassing zijn (zou in dit geval betekenen klasse A met D achtergrond). De EANM heeft ook voor deze specifieke categorie bereidingen een richtlijn opgesteld [5]. Voor de bereiding van steriele PET-farmaca wordt een klasse A omgeving met een klasse C achtergrond voorgeschreven, waarbij de klasse C weer in een klasse D achtergrond mag zijn geplaatst zonder verdere omkleedprocedures. In hoeverre het plaatsen van een klasse C achtergrond in een D achtergrond te realiseren is, is niet


duidelijk, daarnaast is er geen goede onderbouwing te vinden voor deze constructie.

## Conclusie

Radiofarmaca vormen een bijzondere categorie onder de geneesmiddelen. Enerzijds is er veel overlap met bepaalde categorieën waardoor dezelfde eisen van toepassing zijn als voor de bereiding van reguliere geneesmiddelen. Anderzijds vergen de bijzondere eigenschappen soms aanpassing van de voorgeschreven omstandigheden. In het merendeel van de gevallen is niet sprake van bereiden, maar van VTGM. Bij de handelingen met kits, kunnen de vereiste omstandigheden vrij beperkt zijn zodat deze handelingen nog door een groot aantal centra kunnen worden uitgevoerd. De hoofdstukken Z3 en Z4 uit de GMP-Z geven de verschillende eisen weer. Het volledig zelf bereiden van radiofarmaca vereist uitgebreidere faciliteiten, echter ook daar is naar de mening van de auteurs een interpretatie van de GMP mogelijk en kan bij bereidingen voor individuele patiënten conform GMP-Z3 en Z4 worden volstaan met een bereiding in een klasse A omgeving met klasse D achtergrond. Dit geeft voldoende waarborgen voor een adequate productkwaliteit.

In dit artikel is vooral gesproken over de faciliteiten. De reden hiervoor is dat het aanpassen van faciliteiten zeer ingrijpend kan zijn en de keuze voor het uitvoeren van een bepaalde activiteit mede kan beïnvloeden. Het spreekt echter voor zich dat faciliteiten maar een onderdeel zijn van het totale kwaliteitssysteem dat aanwezig dient te zijn om op een verantwoorde manier radiofarmaca te kunnen bereiden.

## Referenties:

1. Good Manufacturing Practice Ziekenhuisfarmacie. Te raadplegen via [www.nvza.nl](http://www.nvza.nl).
2. Commission Directive 2003/94/EC, of 8 October 2003, laying down the principles and guidelines of good manufacturing practice in respect of medicinal products for human use and investigational medicinal products for human use. Te raadplegen via: [http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/eudralex/vol4\\_en.htm](http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/eudralex/vol4_en.htm)
3. 'Nucleaire Geneeskunde nog niet op orde'. Gezamenlijk rapport van de inspectie voor Volksgezondheid en Milieu, Arbeidsinspectie en Inspectie voor de volksgezondheid. Maart 2008. Te raadplegen via [www.igz.nl](http://www.igz.nl)
4. Steriliteitsonderzoek Tc99m generator. Commissie GMP-Z van de NVZA. Te raadplegen via [www.nvza.nl](http://www.nvza.nl).
5. Guidelines on current good Radiopharmacy Practice (cGRPP) in the Preparation of Radiopharmaceuticals. Version2, March 2007, EANM Radiopharmacy Committee PART A. Guidelines on Current Good Radiopharmacy Practices (cGRPP) for kit-based Radiopharmaceuticals in Nuclear Medicine PART B. Guidelines on Current Good Radiopharmacy Practices (cGRPP) for Positron Emission Tomography (PET) and other Locally Produced Radiopharmaceuticals\* 



# Metabole PET tracers voor neuroendocriene tumoren: een verhalende beschrijving



**Dr. P.L. Jager**

*Department of Nuclear Medicine  
McMaster University Medical Center  
Hamilton, Ontario  
Canada*

## Inleiding

Neuroendocriene tumoren is een verzamelnaam voor een groep tumoren afkomstig van cellen uit het algemene neuroendocriene systeem. Embryologisch zijn deze cellen afkomstig uit neuroectoderm en het endoderm van de darm. Ze zijn aanwezig in bijna alle organen en hun functie is het reguleren van cellen in hun omgeving (paracriene regulering). Hiertoe produceren neuroendocriene cellen een scala aan hormonen en andere biologisch actieve stoffen. Voor deze productie beschikken ze over een speciaal mechanisme voor het opnemen van precursors en de omzetting tot biogene amines. Het sleutelenzym voor deze omzettingen is AADC (aromatic aminoacid decarboxylase) dat in veel neuroendocriene tumoren sterk tot expressie is gebracht en zeer actief is. Daarom hebben deze tumoren een grote behoefte aan aminozuur achtige precursors. Zo zijn bijv. de aminozuren tyrosine en phenylalanine precursors voor de synthese van catecholaminen door phaeochromocytomen, en is tryptofaan een precursor voor serotonine productie door carcinoiden (figuur 1). Enkele andere neuroendocriene tumoren zijn pancreas-eilandjescel tumoren (vele subtypen) en medullaire schildklieradenomen.

De geproduceerde stoffen geven vaak aanleiding tot meer of minder specifieke klinische symptomen. Naast deze symptomen zijn de ook concentratie van de geproduceerde stoffen essentieel in de diagnostiek. Beeldvormende sleutelonderzoeken zijn CT, echografie en de octreotide scan, aangezien veel van deze tumoren in verhoogde mate somatostatine receptoren tot expressie brengen.

De opname van een precursor door deze tumoren is een concept dat perfect past bij het concept van PET. Het verschijnen van een Duits case report over de toepassing van  $^{18}\text{F}$ -DOPA in een patient met carcinoid en een lang bestaande interesse in deze tumoren, was de aanleiding voor het schrijven van een aanvraag voor een KWF onderzoekssubsidie begin 2002 vanuit het UMC Groningen (1). Het project was gebouwd rondom de klinische toepassing van reeds

beschikbaar  $^{18}\text{F}$ -DOPA PET als catecholamine precursor, het opzetten van de synthese van  $^{11}\text{C}$ -HTP PET als serotonine precursor en opdoen van eerste klinische ervaringen, en basaal onderzoek naar de mogelijkheden van op histidine gebaseerde tracers. Na goedkeuring van dit project konden een arts en een chemicus worden aangesteld. Na enige jaren volgden er mooie publicaties o.a. in tijdschriften als de Lancet Oncology, Journal of Clinical Oncology, Cancer Research en Journal of Nuclear Medicine alsmede twee promoties in 2008, en veel ideeën voor vervolg onderzoek. Belangrijker nog was dat een klinisch relevante methode werd ontwikkeld die praktische meerwaarde bleek te hebben voor patienten en hun behandelaren. In het vorige nummer van het Tijdschrift voor Nucleaire Geneeskunde werd een fraai overzicht gegeven over de klinische aspecten en in dat nummer staat ook het verslag van de promoties van Oliver Neels, de radiochemicus op het project en Klaas Pieter Koopmans, de arts-onderzoeker (2-4).

In het volgende wordt kort een overzicht geschetst van de twee centrale tracers uit dit project,  $^{18}\text{F}$ -DOPA en  $^{11}\text{C}$ -HTP, iets meer gefocust op de 'nucleair-technische' achtergronden dan op de kliniek.

## $^{18}\text{F}$ -DOPA ( $^{18}\text{F}$ -di-hydroxy (=OH)-phenyl-alanine).

In het begin van de jaren 80 werd deze tracer ontwikkeld o.a. door een groep onderzoekers onder leiding van Steve Garnett, in McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada. Deze kleurrijke en respectabele Brit overleed helaas later plotseling na een val van een paard, maar nog steeds is de radiochemische infrastructuur aanwezig. (Niet toevallig is dit artikel vanuit dat centrum geschreven). In een publicatie die 25 jaar geleden verscheen op de cover van Nature werd voor het eerst melding gemaakt van het afbeelden van het dopaminerge weefsel in het menselijk brein (5). Nog steeds wordt deze tracer op behoorlijke schaal gebruikt voor het afbeelden van de integriteit van het nigro-striatale systeem

bij de diagnostiek van parkinsonistische aandoeningen. De toepassing in neuroendocriene tumoren is van veel recenter datum.

### **Radiosynthese**

$^{18}\text{F}$ -DOPA is een aminozuur met 2 OH groepen dat kan worden gelabeld met  $^{18}\text{F}$  op diverse plaatsen aan de phenol ring. Meest gebruikt is 6-L- $^{18}\text{F}$ -fluoroDOPA.  $^{18}\text{F}$ -DOPA kan worden gevormd door hydroxylering van extern tyrosine, dat op zijn beurt weer gevormd kan worden door hydroxylering van extern phenylalanine. Ondanks de introductie van het Fluor atoom blijven de functionele eigenschappen van  $^{18}\text{F}$ -DOPA intact.

Er bestaan diverse methoden voor de radiosynthese van  $^{18}\text{F}$ -6-DOPA. De nucleofiele methode gaat uit van  $^{18}\text{F}$ -fluoride (net als FDG) en heeft het voordeel dat GigaBequerel hoeveelheden kunnen worden geproduceerd. Deze synthese is helaas een ingewikkelde multi-step procedure die voorlopig ongeschikt lijkt voor de praktijk.

Electrofiële fluoridering is daarom de alom gebruikte methode. Hierbij wordt  $^{18}\text{F}$ -F<sub>2</sub> gas of  $^{18}\text{F}$ -acetylhypofluorite gebruikt. Hierbij wordt eerst een metaal ion (zoals silicium, tin of kwik) in het molecuul ingebouwd, wat vervolgens wordt uitgewisseld voor een fluor atoom. Om het label op de goede plek te krijgen worden sommige posities op het molecuul eerst geblokkeerd, en later worden deze beschermgroepen weer verwijderd. Zuivering van het eindproduct wordt gedaan met HPLC. Een veel gebruikte '1-pots' methode is gebaseerd op fluordestannylatie (uitwisselen van een tin voor een fluor atoom) en werd beschreven door Erik de Vries uit het UMCG (6).

Een andere methode is directe fluoridering met  $^{18}\text{F}$ -acetylhypofluorite van DOPA waaraan reeds beschermgroepen zijn toegevoegd. Verschillen in de gebruikte oplosmiddelen spelen hierbij een essentiële rol. Ook deze methode wordt klinisch gebruikt.

### **Intracellulaire factoren voor $^{18}\text{F}$ -DOPA uptake**

$^{18}\text{F}$ -DOPA gaat de cel binnen via de alom tegenwoordige aminozuur transporters voor grote aminozuren, analoog aan tracers zoals  $^{123}\text{I}$ -methyl-tyrosine,  $^{11}\text{C}$ -methionine en  $^{11}\text{C}$ -tyrosine (7).  $^{18}\text{F}$ -DOPA wordt vervolgens gedecarboxyleerd door AADC. De activiteit van dit enzym speelt een belangrijke rol in de opname van  $^{18}\text{F}$ -DOPA, en veroorzaakt waarschijnlijk het verhoogde membraantransport, maar ook intracellulaire verwerking tot andere metabolieten zoals  $^{18}\text{F}$ -dopamine die vervolgens in 'secretory granules' wordt opgeslagen. Niet alles is nog duidelijk, maar de combinatie van AADC activiteit en opslagcapaciteit zijn samen waarschijnlijk de drijvende kracht achter de specifieke opname van deze tracer. Maar  $^{18}\text{F}$ -DOPA wordt ook opgenomen in hersentumoren zonder AADC en granulae, vermoedelijk vanwege 'algemeen aminozuur gedrag'. Mogelijk is dit een dynamisch fenomeen met opname en uitwas. Daarentegen zijn er observaties bekend van patienten met een dubbeltumor, nl een colorectal

adenocarcinoom en een carcinoid, waarin FDG alleen in de eerste localiseert en  $^{18}\text{F}$ -DOPA alleen in de tweede.

### **Extracellulaire factoren voor $^{18}\text{F}$ -DOPA uptake.**

Na intraveneuze injectie wordt  $^{18}\text{F}$ -DOPA gemetaboliseerd door o.a. AADC activiteit in de nieren en de lever. Deze zogenaamde perifere decarboxylatie genereert radioactieve metabolieten waarvan het gedrag nog maar ten dele in kaart is gebracht. Uit neuroimaging studies is bekend dat 3-O-methyl- $^{18}\text{F}$ -DOPA, 6- $^{18}\text{F}$ -fluorodopamine, L-3,4-dihydroxy,6- $^{18}\text{F}$ -fluorophenylacetic acid en  $^{18}\text{F}$ -fluorohomovanillic acid belangrijke metabolieten zijn. Vele van deze metabolieten passeren de bloed-hersenbarriere en dragen sterk bij aan de opname in verschillende cerebrale weefsels. De mate van bijdrage wisselt echter, en al deze metabolieten hebben weer hun eigen kinetiek. In tumoren zou bijvoorbeeld extracellulair gevormd  $^{18}\text{F}$ -dopamine via noradrenaline transporters weer opgenomen kunnen worden.

Om perifere decarboxylatie tegen te gaan wordt de stof carbidopa, een sterke remmer van AADC gebruikt. Hierdoor stijgt de concentratie  $^{18}\text{F}$ -DOPA en is meer tracer beschikbaar voor opname. De opname in de nieren en ook pancreas vermindert sterk, en de opname in de tumor neemt toe waardoor de beeldkwaliteit verbetert (8).

### **Acquisitie en beoordeling**

Analoog aan FDG wordt een whole body scan meestal gemaakt ca 1 uur na intraveneuze injectie van  $^{18}\text{F}$ -DOPA. Ook kortere injectie-scan intervals van 30 min worden gebruikt en leveren goede beelden. De benodigde dosis is een compromis tussen de scanner eigenschappen, beschikbaarheid en gewicht van de patient, en ligt meestal tussen de 100 en 300 MBq. Het effectieve dosisequivalent van  $^{18}\text{F}$ -DOPA PET bedraagt ca 2 – 6 mSv. Normale opname is aanwezig in het striatum (hieraan is een  $^{18}\text{F}$ -DOPA whole body scan altijd snel te herkennen), myocard, lever, pancreas, darmen, nieren en blaas. In het algemeen is deze opname laag ivm de opname in tumorweefsel. Uitscheiding via de galwegen en galblaas kan soms de interpretatie bemoeilijken, zoals optrad bij de eerste in Groningen gescande patient in 2001.

### **Klinische toepassingen**

$^{18}\text{F}$ -DOPA PET heeft een superieure sensitiviteit voor carcinoid tumoren, maar ook in phaeochromocytomen, medullaire schildklier carcinomen en hyperinsulinistische syndromen een uitstekende diagnostische performance, die klinisch relevant is. De combinatie met CT versterkt deze waarde nog verder. Voor een gedetailleerde bespreking wordt verwezen naar het artikel in het vorige Tijdschrift en de literatuur (2,9).

### **$^{11}\text{C}$ -5-Hydroxy-Tryptofaan**

De gedachte om met een gelabelde precursor van tryptophan carcinoid tumoren af te beelden is al oud. In de jaren '60 toonden Costello et al. reeds opname van  $^{131}\text{I}$  gelabeld

tryptophaan aan in menselijke carcinoid tumoren met behulp van een rectilineaire scanner (10). Macfarlane toonde later aan dat tracers als 5-<sup>125</sup>I-ioditryptopaan opgenomen worden in muistumormodellen, maar concludeerde na 4 negatieve humane studies dat daarvoor geen toekomst was (11). Weer veel later bleek de tracer <sup>123</sup>I-methyl-tyrosine toch enigzins opgenomen te worden in carcinoid tumoren (12). Met het beschikbaar komen van de PET techniek, en de ontwikkeling van <sup>11</sup>C gelabeld hydroxytryptofaan, dat in tegenstelling tot de geïodeerde verbindingen, chemisch geheel identiek is aan de lichaamseigen stof, bleek de precursor uptake gedachte toch uitermate vruchtbaar. De groep in Uppsala in Zweden slaagde erin <sup>11</sup>C-HTP te produceren voor klinisch gebruik, en vele jaren lang had deze groep het monopolie op deze methode, hoewel ze er slechts mondjesmaat over publiceerden (14,15). Patienten met diagnostisch moeilijke neuroendocriene symptomen of tumoren van over de hele wereld ondergingen in Zweden <sup>11</sup>C-HTP PET. Veel radiochemici reisden naar Zweden, maar het leek niet te lukken de radiochemische synthese elders succesvol te implementeren. Nu is deze synthese ook buitengewoon lastig, en vereist het gebruik van 4 enzymen voor de benodigde reacties.

En tot in het huidige tijdsgewricht gruwelen met name radiofarmaceuten maar ook de organische PET chemici van enzymatische syntheses.

Met het goedkeuren van bovengenoemd KWF project werd de radiosynthese van deze tracer echter ook in Groningen mogelijk. Het implementeren van deze methode door de radiochemicus op dit project vereiste een werk bezoek aan Uppsala en anderhalf jaar radiochemisch werk. Klinische belangstelling was reeds aanwezig. Vanwege de initieel uiterst magere opbrengst van slechts 50 MBq ondergingen twee onderzoekers eerst zelf een HTP PET scan. Ondanks wat medisch ethische scherpslijperij door derden, bleek de beeldkwaliteit voldoende zelfs met zo'n lage dosis radioactiviteit, en konden toen ook patienten worden gescand. (Later brak Oliver Neels het wereldrecord <sup>11</sup>C-HTP productie (>1000MBq in 1 synthese) en trakteerde op taart)

### **Radiosynthese**

Deze gaat uit van <sup>11</sup>C-methyl-jodide, een standaarduitgangproduct voor veel koolstof-<sup>11</sup> tracers. Na productie van <sup>11</sup>C-alanine wordt mbv 3 enzymen (D-aminozuuroxidase, catalase, pyruvaatglutamaattransaminase) <sup>11</sup>C-pyruvaat geproduceerd. Dit wordt vervolgens met tryptofaan en het vierde enzym, tryptophanase, omgezet tot beta-<sup>11</sup>C-5-hydroxy-tryptophan oftewel <sup>11</sup>C-HTP. Essentieel is de samenstelling van de verschillende oplossingen, de volumina, de concentratie van hulpstoffen en de pH. De verantwoordelijke apotheker was niet erg enthousiast over het gebruik van runder enzymen in het huidige BSE tijdperk, maar gelukkig werd een bacteriele bron van deze enzymen gevonden. Het lukte nu met >95% betrouwbaarheid voldoende <sup>11</sup>C-HTP te produceren (3).

### **Opname van <sup>11</sup>C-HTP**

Net als <sup>18</sup>F-DOPA is <sup>11</sup>C-HTP een aminozuur dat via de membraantransporter voor grote aminozuren in de cel wordt opgenomen. <sup>11</sup>C-HTP is een rechtstreeks substraat voor AADC en na decarboxylering ontstaat de stof hydroxytryptamine, oftewel serotonine. Via monoamineoxidase (MAO) wordt serotonine weer afgebroken waarbij oa 5-HIAA ontstaat.

Omdat serotonine ook in de hersenen een belangrijke rol speelt zou <sup>11</sup>C-HTP ook kunnen worden gebruikt voor het in beeld brengen van de cerebrale serotonine synthese activiteit. Deze toepassing heeft echter nog geen grote vlucht genomen, en de opname lijkt nogal laag, maar is wellicht interessant voor onderzoek naar depressies en het effect van medicatie daarop.

Er is slechts weinig onderzoek beschikbaar naar het metabolisme van <sup>11</sup>C-HTP. In de hersenen ontstaan <sup>11</sup>C-5-hydroxyindole-3-acetic acid, <sup>11</sup>C-5-HIAA en <sup>11</sup>C-serotonine als metaboliëten. Ook in tumorcellen zijn deze metaboliëten aangetoond. Vermoedelijk ontstaan <sup>11</sup>C-serotonine en <sup>11</sup>C-5-HIAA ook in nieren en lever als gevolg van de AADC activiteit (3). Na carbidopa lijkt de <sup>11</sup>C-serotonine concentratie te dalen.

### **Acquisitie en beoordeling**

Aangezien <sup>11</sup>C-HTP met koolstof-<sup>11</sup> is gelabeld moet de acquisitie altijd kort op de tracer injectie volgen, vanwege de korte halfwaardetijd van 20 min. In de praktijk wordt 5-10 min als interval aangehouden. Er resteert dan genoeg activiteit om nog een total body scan te kunnen maken.

<sup>11</sup>C-HTP beelden tonen, meer dan <sup>18</sup>F-DOPA, algemeen aminozuur gedrag: er is enige opname in organen met eiwitsynthese, zoals de speekselklieren, pancreas en gering in beenmerg. Daarnaast zijn de lever en vooral nieren en blaas zichtbaar.

### **Klinische toepassingen**


Analoog aan <sup>18</sup>F-DOPA heeft <sup>11</sup>C-HTP een zeer hoge sensitiviteit voor carcinoid tumoren, maar deze lijkt net iets lager te liggen dan die van <sup>18</sup>F-DOPA PET. In eilandjesceltumoren was <sup>11</sup>C-HTP PET echter superieur aan alle andere methoden (4). De combinatie met CT maakt de methode nog sterker. Vanwege de lastige synthese is de methode slechts beperkt beschikbaar. Momenteel wordt er gewerkt aan <sup>18</sup>F gelabelde analoga van <sup>11</sup>C-HTP, die makkelijker distribueerbaar zullen zijn. Voor een meer gedetailleerde beschrijving van klinische toepassingen wordt verwezen naar het artikel in het vorige Tijdschrift en de literatuur.

### **Besluit**

<sup>18</sup>F-DOPA en <sup>11</sup>C-HTP zijn interessante metabole tracers voor een scale aan neuroendocriene tumoren. De hoge en specifieke opname levert goede detectie eigenschappen. De methode heeft klinisch reeds zijn sporen verdiend. Wel blijkt de metabole activiteit niet altijd exact overeen te komen

met de (somatostatine) receptor activiteit, en ook is er geen directe relatie met radionuclide therapie zoals bij de op octreotide gebaseerde afbeeldingsmethode. Met de komst van somatostatine receptor PET is ook de vraag hoe de metabole methoden het zullen doen in vergelijking daarmee. Maar voorlopig zijn  $^{18}\text{F}$ -DOPA en  $^{11}\text{C}$ -HTP PET uitstekende klinische tools.

## Referenties

- Hoegerle S, Schneider B, Kraft A, Moser E, Nitzsche EU. Imaging of a metastatic gastrointestinal carcinoid by F-18-DOPA positron emission tomography. *Nuklearmedizin*. 1999;38:127-30.
- Horst-Schrivers ANA, Brouwers AH, Links TP. Functional imaging of neuroendocrine tumors. *Ned Tijdschr Nucl Geneesk* 2008;30:61-67.
- Neels O. Proefschrift RU Groningen. *Ned. Tijdschr Nucl Geneesk* 2008;30:80-82.
- Koopmans KP. Proefschrift RU Groningen. *Ned. Tijdschr Nucl Geneesk* 2008; 30:83-85.
- Garnett ES, Firna G, Nahmias C. Dopamine visualized in the basal ganglia of living man. *Nature*. 1983;305:137-8.
- Vries EFJ, Luurtsema G, Brussermann M, Elsinga PJ, Vaaalburg W. Fully automated synthesis module for the high yield one-pot preparation of 6-[18F]-fluoro-L-DOPA. *Appl Rad Isot* 1999;51:389-394.
- Jager PL, Vaaalburg W, Pruim J, de Vries EG, Langen KJ, Piers DA. Radiolabeled amino acids: basic aspects and clinical applications in oncology. *J Nucl Med* 2001;42:432-445.
- Orlefors H, Sundin A, Lu L, et al. Carbidopa pretreatment improves image interpretation and visualisation of carcinoid tumours with  $^{11}\text{C}$ -5-hydroxytryptophan positron emission tomography. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2006;33:60-65.
- Jager PL, Chirakal R, Marriott CJ, Brouwers AH, Koopmans KP, Gulenchyn KY. 6-L-18F-fluorodihydroxyphenylalanine PET in neuroendocrine tumors: basic aspects and emerging clinical applications. *J Nucl Med*. 2008;49:573-86.
- Costello C. Management of carcinoid syndrome. *Arch Surg*. 1965;90:787-792.
- Macfarlane D, Gonin J, Wielandt D, et al. Successful and unsuccessful approaches to imaging carcinoids: comparison of a radiolabeled tryptophan hydroxylase inhibitor with a tracer of biogenic amine uptake and storage, and a somatostatin analogue. *Eur J Nucl Med*. 1996;23:131-140.
- Jager PL, Meijer WG, Kema IP, Willemse PHB, Piers DA, Vries de EG. L-3-[123I]iodo-alpha-methyl-tyrosine scintigraphy in carcinoid tumors: correlation with biochemical activity and comparison with  $^{111}\text{In}$ -octreotide imaging. *J Nucl Med* 2000; 41:1793-1800.
- Orlefors H, Sundin A, Åhlstrom H, Bjurling P, Bergstrom M, Lilja A, Langstrom B, Oberg K, Eriksson B. Positron emission tomography with 5-hydroxytryptophan in neuroendocrine tumors. *J Clin Oncol*. 1998;16:2534-41
- Orlefors H, Sundin A, Garske U, Juhlin C, Oberg K, Skogseid B, Langstrom B, Bergstrom M, Eriksson B. Whole-body ( $^{11}\text{C}$ )-5-hydroxytryptophan positron emission tomography as a universal imaging technique for neuroendocrine tumors: comparison with somatostatin receptor scintigraphy and computed tomography. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:3392-400. 



# 14<sup>th</sup> European Symposium on Radiopharmacy and Radiopharmaceuticals



**Dr. E.F.J. de Vries**



**Prof. Dr. P.H. Elsinga**

*Department of Nuclear Medicine and Molecular Imaging  
University Medical Centre Groningen  
The Netherlands*

## Introduction

From April 24 to 27, Hotel Alexander in Skopje, the capital of the Former Yugoslav Republic of Macedonia, was the venue of the 14<sup>th</sup> European Symposium on Radiopharmacy and Radiopharmaceuticals (ESRR). This article represents the personal view of the authors on the most interesting developments that were presented during the symposium.

## Basic chemistry

Click chemistry and microfluidics are probably the hottest new developments in PET chemistry. Click chemistry usually refers to formation of a triazole by the fast copper catalysed cycloaddition of acetylene with an azide. Since protecting groups are not required, the reaction can be used for diverse applications, like labelling of biomolecules. Interestingly, click chemistry also proved a powerful tool for parallel development of imaging probes for different imaging modalities. This was nicely demonstrated by Schibli (Zurich), who combined a single azido derivative of folic acid with different alkyne-functionalized imaging probes for PET, SPECT, MRI and fluorescent imaging.

Microfluidics technology provides an attractive way to shorten synthesis time, as was advocated by Giamis (Ithaca). With this lab-on-a-chip technology, the movement of fluids through a miniature flow reactor and the more efficient heat transfer lead to a more rapid synthesis with fewer side-products. Various <sup>11</sup>C and <sup>18</sup>F-labelled PET tracers can now be synthesized with microfluidic devices and yields of more than 2 GBq can be achieved.

## Brain imaging: Prodrug approach

Poor penetration of the blood-brain barrier by the tracer can be a major obstacle for imaging of targets that are located in the brain. To overcome this obstacle the prodrug approach may be applied. In this strategy, the tracer is chemically modified to improve its blood-brain barrier passage. Inside the brain the modified tracer is converted into the active

tracer. Kao (Hualien) presented the preliminary results on the development of a prodrug PET tracer for imaging of neurogenesis (neuron proliferation). The approach was based on the hydrophilic proliferation tracer <sup>18</sup>F-FBAU, which is a thymidine derivative that is unable to cross the blood-brain barrier. <sup>18</sup>F-FBAU was modified with benzoate ester groups to increase the lipophilicity and to allow brain penetration. In the brain, the ester groups are removed by lipases, yielding free <sup>18</sup>F-FBAU, which is able to incorporate in the DNA of proliferating cells. The first in-vivo study with <sup>18</sup>F-FBAU 3',5'-dibenzoate in a cold-induced brain trauma rat model showed selective accumulation of the tracer at the site of injury, although some residual damage of the blood-brain barrier may be (partly) responsible for this result.

Another example of a prodrug tracer was reported by Gourand (Caen), who linked a lipophilic dihydroquinoline carrier to MIBG in order to create a prodrug tracer for imaging of the cerebral norepinephrine transporter. The first results indicated that the prodrug tracer penetrates into the brain, where it releases MIBG after oxidative cleavage.

## Oncology: Hypoxia

Development of hypoxia tracers is a hot topic, because the current tracers are far from ideal. Grönroos (Turku) presented preclinical pharmacokinetic data of two new hypoxia tracers, <sup>18</sup>F-FETNIM and <sup>18</sup>F-EF5, and compared them with <sup>18</sup>F-FMISO. <sup>18</sup>F-EF5 had most preferable pharmacokinetic properties, despite its relatively high lipophilicity. In addition, <sup>18</sup>F-EF5 did not form any radiolabelled metabolites, in contrast to the other tracers. <sup>18</sup>F-EF5 showed good uptake in hypoxic tumours and low uniform background in animal models, but still needs to be evaluated in patients. A potential setback for the clinical breakthrough of <sup>18</sup>F-EF5 could be its synthesis, because the labelling requires an electrophilic fluorination with low specific activity <sup>18</sup>F-F<sub>2</sub>-gas, which is available in a limited number of centres around the world.

Another hypoxia tracer that is used in clinical trials is <sup>64</sup>Cu-

ATSM, despite the fact that this tracer is insoluble in water. Christlieb (Cambridge) and co-workers investigated more hydrophilic  $^{64}\text{Cu}$ -ATSM derivatives. In-vitro, a glucose-substituted and an alanine-substituted derivative of  $^{64}\text{Cu}$ -ATSM showed higher uptake ratios between hypoxic and normoxic cells. In tumour-bearing rats, both derivatives displayed similar tumour uptake as  $^{64}\text{Cu}$ -ATSM in combination with increased renal clearance, which makes these tracers suitable candidates for further evaluation.

### Oncology: New targets

At the ESRR meeting, a few radiopharmaceuticals for (fairly) new targets in tumours were presented. The first target was the neurotensin receptor, which is overexpressed in a variety of tumours and an interesting target for imaging and therapy. García Garayoa (Villigen) and co-workers evaluated several  $^{64/67}\text{Cu}$ -labelled analogues of neurotensin. Neurotensin is a neuropeptide that can stimulate tumour growth. In this series of tracers, the cyclam analogue  $^{64/67}\text{Cu}$ -Cyc-NT showed the best properties for PET imaging, although tracer clearance from the tumour was rather fast and tracer uptake in non-target tissues relatively high. Therefore, probably new neurotensin derivatives with better pharmacokinetic properties are required.

As another potential target for tumour imaging and therapy, the gastrin/CCK2 receptor was proposed. Radiolabelled minigastrin analogues have been investigated for this purpose, but so far none of the candidates combined high tumour uptake with low kidney retention. To overcome this problem, Sosabowski (London) and colleagues prepared the indium-111 labelled DOTA-conjugated minigastrin dimer  $^{111}\text{In}$ -MGD5. In nude tumour-bearing mice,  $^{111}\text{In}$ -MGD5 exhibited increased tumour uptake as compared to its monomer minigastrin analogue, whereas kidney retention remained low. A third target for tumour imaging that was addressed was the luteinising hormone-releasing hormone (LHRH) receptor. Kertész et al. (Debrecen) conjugated the peptide D-Lys<sup>6</sup>-LHRH with Hynic and labelled this conjugate with  $^{18}\text{F}$ -fluorobenzaldehyde. The conjugated LHRH analogue showed high affinity in-vitro binding to the receptor, but in-vivo evaluation of the tracer was not presented.

### Oncology: Therapy

Amongst the presentations addressing new radiopharmaceuticals for radionuclide therapy, Meléndez-Alafort (Padua) showed the most interesting results. For treatment of hepatocellular carcinoma, they labelled the high molecular weight polymer hyaluronic acid with  $^{188}\text{Re}$  and evaluated the complex in mice with induced hepatic tumours.  $^{188}\text{Re}$ -hyaluronic acid was well tolerated with only mild liver and bone marrow toxicity at high doses. The radiopharmaceutical significantly reduced hepatic tumour burden and dramatically increased survival, even at a dose as low as 2.2 MBq. A major advantage of  $^{188}\text{Re}$ -hyaluronic acid is that it can be administered intravenously and does not require

injection directly in the portal vein of the liver (as is the case for e.g.  $^{188}\text{Re}$ -lipiodol), because approximately 80% of the injected  $^{188}\text{Re}$ -hyaluronic acid will accumulate in the liver and spleen.

### Cell death

Imaging of cell death could be of interest for assessment of tissue damage after e.g. myocardial infarction. Prinsen (Leuven) reported a new tracer, called  $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -bis-DTPA-bis-indole, for imaging of necrosis. This tracer showed high avidity for necrotic tissue in rats with reperfused hepatic infarction and in rats with ethanol-induced muscular necrosis. Kopka (Münster) reported an  $^{18}\text{F}$ -labelled isatin analogue with high affinity for caspase-3 and 7, which are activated in apoptotic cells. The tracer displayed selective uptake in the apoptotic area-at-risk in a myocardial occlusion-reperfusion animal model.

### Inflammation

The cannabinoid receptor type 2 (CB2) is mainly expressed in immune cells like activated microglia. Since CB2 expression in the normal brain is low, CB2 could be an attractive target for imaging of neuroinflammation. Evens (Leuven) presented an  $^{11}\text{C}$ -labelled oxoquinoline derivative as a promising tracer for the CB2. This tracer showed high uptake in spleen (target organ) and efficient penetration into the brain in mice. However, the tracer was not evaluated in inflammation models yet.

Another important issue in inflammation imaging was addressed by Laverman (Nijmegen): i.e. discrimination between bacterial infection and sterile inflammation. He demonstrated that a tracer that was originally developed for herpes virus thymidine kinase, FIAU, could also be employed to detect bacterial infections.  $^{124/125}\text{I}$ -FIAU selectively accumulated in a wild-type *E. coli* abscess, but not in sterile inflammation or an abscess of thymidine kinase-deleted *E. coli*.

### Regulations

Besides scientific issues also regulatory aspects regarding radiopharmaceutical preparations were discussed. The Radiopharmacy Committee of the EANM has started initiatives to make European institutes aware of the specific situation of radiopharmaceuticals. Since there are no specific guidelines for the production of small-scale, non commercial extemporaneous radiopharmaceuticals, the Committee has developed Guidelines for Good Radiopharmaceutical Practice (cGRPP). Furthermore, a specialized post-graduate training program has been set up.

The IAEA made a survey amongst nuclear medicine departments worldwide, including developing countries. Main findings were: poor state of hotlabs in many countries, shortage on radiopharmacists, poor availability of new technologies such as PET, lack of quality programs. There is a serious need for clear standards for radiochemistry labs. The


IAEA has developed guidelines that should bring these labs on a higher level.


Finally, a presentation was given on the activities of the European Pharmacopeia. To date, 70 monographs on radiopharmaceutical preparations have been adopted, of which the general monograph is currently under revision. Adaptation to current practices, clear description of the status of precursors, and agreement with EU legislation are the main changes, as well as incorporation of tests not requiring animals.

Concerning the various discussions on radiopharmaceutical

preparations, it has been agreed to organize a consensus meeting.

**Conclusion**

At the ESRR, the latest progress of new radiopharmaceuticals in the early phases of development and trends in regulatory issues were discussed. Many promising preclinical results of new radiopharmaceuticals were presented. However, further evaluation of these compounds is still required, before they could become valuable tools for clinicians. 

<p><b>Titel:</b>            <b>Aanbevelingen Nucleaire Geneeskunde 2007</b></p> <p><b>Eindredactie:</b> Drs. P.C. Barneveld - Dr. P van Urk</p> <p><b>ISBN:</b>            978-90-78876-01-4</p> <p><b>Uitgever:</b>       Kloosterhof acquisitie services - uitgeverij</p> <p><b>Omvang</b>          480 pagina's</p> <p><b>Uitvoering</b>      garengenaaid</p> <p><b>Prijs</b>             € 53,- (leden NVNG exclusief verzendkosten)</p> <p>                      € 74,20 (exclusief verzendkosten)</p> <p><b>Stuur uw aanvraag naar <a href="mailto:info@kloosterhof.nl">info@kloosterhof.nl</a></b></p> <p><small>Deze Aanbevelingen beschrijven vrijwel alle gangbare patiëntonderzoeken en therapieën die op een afdeling Nucleaire Geneeskunde kunnen worden uitgevoerd. De nadruk ligt op de kwaliteit van de procedures en de daarvoor noodzakelijke apparatuur en radiofarmaca.</small></p> <p><small>Het merendeel van de patiëntonderzoeken betreft diagnostische verrichtingen, maar ook therapeutische handelingen met behulp van radioactieve stoffen worden besproken. Verder komen in de Aanbevelingen fysische en farmaceutische aspecten aan de orde.</small></p> <p><small>Het boek is vooral bedoeld als handboek en naslagwerk op een afdeling Nucleaire Geneeskunde en voor degenen die nog in opleiding zijn. Het is echter geen leerboek en het is niet gebaseerd op evidence based medicine methodiek omdat daarvoor te weinig tijd en onderzoek beschikbaar was.</small></p> <p><small>De in deze Aanbevelingen opgenomen protocollen zijn onder regie van de Commissie Kwaliteitsbevordering van de Nederlandse Vereniging voor Nucleaire Geneeskunde (NVNG) opgesteld door leden van de NVNG met medewerking van de NVKF (Nederlandse Vereniging voor Klinische Fysica) en NVZA (Nederlandse Vereniging voor Ziekenhuisapothekers).</small></p> <p><small>De Aanbevelingen werden vastgesteld op een algemene ledenvergadering van de NVNG. Met deze publicatie worden de huidige inzichten binnen de Nucleaire Geneeskunde met betrekking tot kwalitatief goede patiëntenzorg vastgelegd.</small></p>	Aanbevelingen Nucleaire Geneeskunde 2007	
--	--	--

## Het Radionuclidencentrum van het VUmc

*Koos Herscheid*

De eerste ontwerpen voor de bouw van het Radionuclidencentrum (RNC) dateren van augustus 1963. De bedoeling was om al het radioactief werk aan de VU te concentreren in één laboratoriumcomplex met unieke voorzieningen om chemisch, biologisch en medisch onderzoek te verrichten, een zogenaamde hotelfunctie. Ruim 10 jaren later, in mei 1974, betrokken de eerste groepen wetenschappelijke onderzoekers (organische radiochemie en moleculaire genetica) het moderne complex van 25 B-laboratoria. Om de gastonderzoekers optimaal te kunnen begeleiden beschikte het RNC over een eigen stralensveiligheidsdienst, een instrumentatiedienst en een wetenschappelijke dienst.

Reeds vanaf het begin is het 'eigen' onderzoekprogramma van het RNC gericht op het ontwikkelen van nieuwe radiofarmaca vanuit een chemische invalshoek. De eerste jaren waren dat vooral verbindingen gelabeld met  $I^{-123}$ , waarvoor ook een productie-unit bij het VU-cyclotron werd gerealiseerd. Daarnaast werd een  $Rb^{81}/Kr^{81m}$  generator ontwikkeld, maar werd ook al gewerkt aan de productie van  $C^{-11}$  gelabelde farmaca, zoals barbituraten, omdat reeds toen werd voorzien dat Positron Emissie Tomografie (PET) een belangrijke toekomstige techniek zou worden. Helaas lukte het op dat moment nog niet om bij de VU de handen op elkaar te krijgen en tot aanschaf van een PET-camera over te gaan. Desondanks werd in het begin van de tachtiger jaren gestart met het ontwikkelen van labelingstechnieken voor  $F^{-18}$  gemerkte radiofarmaca. Het onderzoek richtte zich toen met name op diagnostiek en therapie van tumoren waarvoor vele cytostatica werden gelabeld, bijvoorbeeld 5-FU, cytarabine en etoposide. Ook werd een syntheseautomaat ontwikkeld voor de productie van fluordeoxyglucose (FDG), een verbinding waarvan in 1984 al door ons was aangetoond dat die bruikbaar zou kunnen zijn voor het bepalen van het glucose-metabolisme in de hartspier en in tumorweefsel. Pas in 1990, nadat was aangetoond dat je ook met een hoge-energie collimator  $F^{-18}$  goed kon detecteren, werden de klinici enthousiast en werd de eerste patiënt gescand. De daarna behaalde resultaten met FDG in het cardiologisch en oncologisch onderzoek waren dusdanig positief dat uiteindelijk besloten werd een PET-camera aan te schaffen. Spoedig na het plaatsen van een whole-body scanner in het ziekenhuis in 1997 werd er voor het dierexperimentele onderzoek in het RNC ook een high-resolution research tomograaf (HRRT) gekocht en een faciliteit gecreëerd om volgens GMP-richtlijnen te kunnen produceren. De zes aanwezige hotcells/isolatoren werden daartoe ingericht met volledig geautomatiseerde synthese units, ontwikkeld en gebouwd door onze eigen instrumentatiedienst.

Inmiddels was er een BV Cyclotron gevormd die naast het reeds aanwezige Philips cyclotron een IBA 18/9 had

aangeschaft om op grote schaal FDG te gaan produceren. De nu dagelijkse beschikbaarheid van zowel  $F^{-18}$  als  $C^{-11}$  kwam goed van pas in het RNC-onderzoek dat zich meer was gaan richten op de productie van radioliganden voor het bestuderen van receptor interacties in het brein. Op oncologisch gebied was het onderzoek, in samenwerking met KNO, omgebogen in het labelen van monoclonale antilichamen met de isotopen  $Tc^{-99m}$ ,  $Re^{-186}$ ,  $I^{-131}$  en  $Zr^{-89}$  voor radioimmunosintigrafie en radioimmunotherapie.

Het was een tijd van fusies en dus ontkwam ook een destijds relatief klein interfacultair instituut als het RNC er niet aan om een geschikte partner te zoeken. Die werd om voor de hand liggende redenen gevonden in de afdeling Nucleaire Geneeskunde van het VUmc, ondanks dat beide locaties fysiek op meer dan 500 meter van elkaar liggen. Op 1 januari 2004 werd de feitelijke integratie gerealiseerd hetgeen het RNC uiteindelijk geen windeieren heeft gelegd. Door het intensievere contact met de artsen en nucleair geneeskundigen rees spoedig de vraag naar PET-tracers de pan uit. Dit heeft er dan ook toe geleid dat in korte tijd de personele bezetting van de sectie chemie al verviervoudigde en nog steeds groeiende is. Op dit moment bestaat de chemische onderzoeksgroep uit 5 senior onderzoekers, 6 AIO's en 11 chemisch analisten die circa 50% van hun tijd aan de productie van tracers besteden. Plannen voor de bouw van een tweede noodzakelijke GMP-faciliteit zijn derhalve in een vergevorderd stadium. De BV Cyclotron heeft inmiddels een derde IBA in de planning en produceert sinds begin dit jaar ook regulier  $Zr^{-89}$  en  $I^{-124}$  dat als PET-isotoop, met de reeds aanwezige expertise op het gebied van  $I^{-123}$ , weer interessante onderzoeksmogelijkheden zal opleveren. Anno 2008 is het Radionuclidencentrum zowel landelijk als wereldwijd een centrum waar men niet meer om heen kan als het gaat om radiofarmacochemie.

Omdat dit nummer van TvNG als thema Nieuwe Radiofarmaca heeft, hieronder een overzicht van de farmaca die wij en/of de BV Cyclotron (kunnen) produceren voor zowel



[ <sup>11</sup> C]Flumazenil	GABA <sub>A</sub> (centraal)	[ <sup>18</sup> F]FLT	thymidine kinase
[ <sup>11</sup> C]PK11195	GABA <sub>A</sub> (perifeer)	[ <sup>18</sup> F]FDG	glucose consumptie
[ <sup>11</sup> C]Raclopride	D <sub>2</sub> antagonist	[ <sup>18</sup> F]F-min	botonderzoek
[ <sup>11</sup> C]Verapamil	PgP ligand	[ <sup>18</sup> F]FDDNP	amyloid tracer
[ <sup>11</sup> C]Docetaxel	cytostatic	[ <sup>18</sup> F]MPPF	5-HT <sub>1A</sub> antagonist
[ <sup>11</sup> C]PIB	amyloid tracer	[ <sup>18</sup> F]FP-CIT	DAT ligand
[ <sup>11</sup> C]Acetaat	hartstudies	[ <sup>18</sup> F]FAZA	hypoxie marker
[ <sup>11</sup> C]Methionine	aminozuur synthese	[ <sup>18</sup> F]Proline	aminozuur synthese
[ <sup>11</sup> C]R116301	NK <sub>1</sub> antagonist	[ <sup>18</sup> F]Choline	ACh ligand
[ <sup>11</sup> C]SCH23390	D <sub>1</sub> antagonist	[ <sup>18</sup> F]HX4	hypoxie marker
		[ <sup>18</sup> F]Fallypride	D <sub>2</sub> /D <sub>3</sub> antagonist
[ <sup>81</sup> Rb]RbCl	hartstudies	[ <sup>123</sup> I]R91150	5-HT <sub>2A</sub> antagonist
[ <sup>89</sup> Zr]Zevalin	tumor detectie	[ <sup>123</sup> I]Iomazenil	GABA <sub>A</sub> antagonist
[ <sup>89</sup> Zr]Cetuximab	tumor detectie	[ <sup>123</sup> I]Hippuran	nierfunctie
[ <sup>89</sup> Zr]Rituximab	tumor detectie	[ <sup>123</sup> I]MIBG	tumor- en hartonderzoek
[ <sup>90</sup> Y]Rituximab	tumor therapie	[ <sup>123</sup> I]beta-CIT	DAT ligand

gebruik in ons eigen ziekenhuis (<sup>11</sup>C) als voor onderzoek door anderen (<sup>18</sup>F, <sup>89</sup>Zr, <sup>123</sup>I, et cetera).

Productie van O-15 verbindingen (<sup>15</sup>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub><sup>15</sup>O, C<sup>15</sup>O, C<sup>15</sup>O<sub>2</sub>) gebeurt voorsnog alleen in het ziekenhuis dat daarvoor, gezien de korte halfwaardetijd van 2 minuten, een eigen cyclotron in de kelder heeft staan.

Naast bovenstaande is er nog een variëteit aan verbindingen in een ontwikkelingsfase. Dit zijn niet alleen de stoffen die

onderzocht worden in het kader van een AIO-project, maar ook liganden die ontwikkeld worden in samenwerking met de farmaceutische industrie.

Voor nadere informatie over het onderzoek, over cursussen en trainingen die wij geven, of over de expertise van andere secties van de afdeling kunt u altijd contact met ons opnemen (zie ook [www.mnc.vu.nl](http://www.mnc.vu.nl)).



Automatische synthese Units



GMP Productie Cell



Research Hotcell

# Skeletscintigrafie behulpzaam bij het diagnosticeren van recidief uterus adenosarcoom (*een case report*)

C. Le<sup>1</sup>, S.S.K.S. Phoa<sup>2</sup>, R.J. Bennink<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Afdeling Nucleaire Geneeskunde, Academisch Medisch Centrum Amsterdam

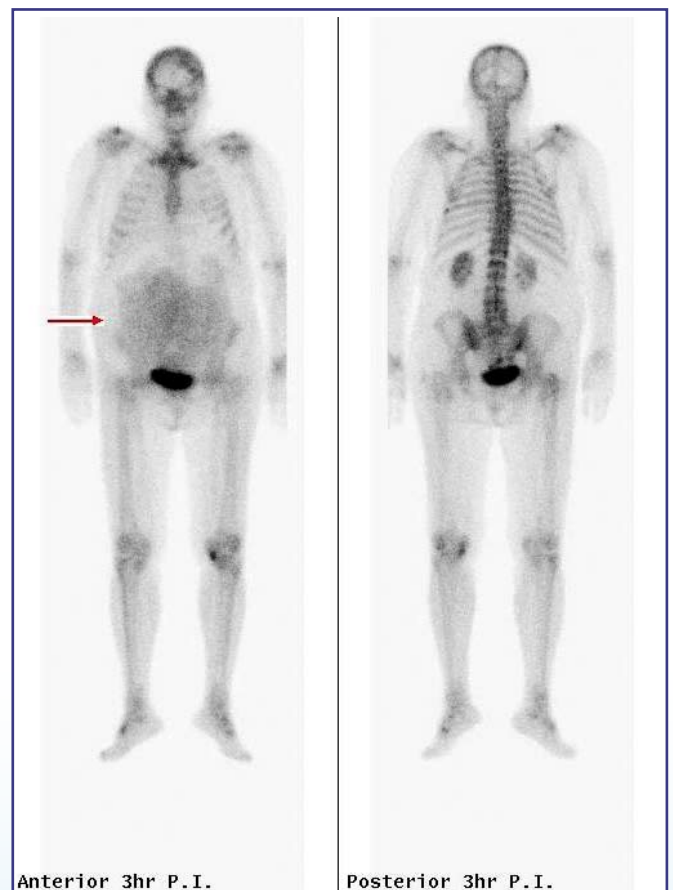
<sup>2</sup>Afdeling Radiologie, Academisch Medisch Centrum Amsterdam

Een 72 jarige vrouw is bekend met een voorgeschiedenis van een adenosarcoom van het endometrium. Zij heeft 2 jaar geleden een uterusextirpatie ondergaan met meenemen van de adnexen en locoregionale lymfeklieren. Histopathologisch onderzoek toonde destijds geen infiltratie in het myometrium en geen maligne cellen in lymfeklieren en spoelvocht. Het postoperatief beloop was ongecompliceerd. Patiënte kreeg aanvullende brachytherapie van de vaginatop.

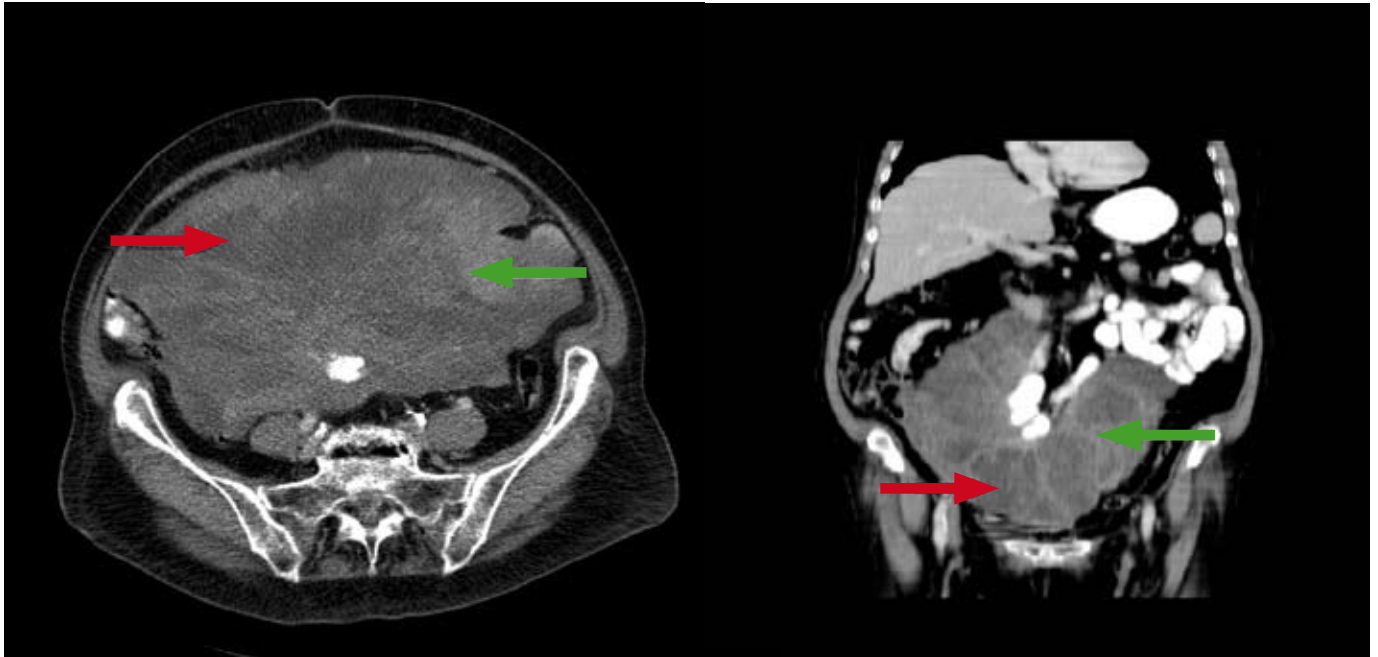
Twee jaar later krijgt patiënte last van moeheid, gewichtsverlies en een vaag gevoel van pijn in de onderrug. Om skeletmetastasen uit te sluiten wordt een skeletscintigram verricht. Het toont diffuus verhoogde en licht heterogene opname in het abdomen met irregulaire begrenzing (figuur 1). Er wordt gedacht aan ascites of peritonitis (carcinomatosa). Bij zorgvuldig lichamelijk onderzoek wordt een dikke buik gevonden, die moeilijk te onderzoeken is vanwege adipositas. Er zijn geen pijnklachten van de buik bij palpatie. Patiënte geeft aan in korte tijd toename van de buikomvang te hebben bemerkt. Er wordt nog steeds gedacht aan ascites, ondanks het ontbreken van shifting dullness. Echter bij echografie (elders verricht) wordt geen ascites gevonden, maar een grote tumor in het abdomen met mucineus aspect.

De bij echografie gevonden tumor wordt op een CT-abdomen teruggevonden. Het betreft een zeer grote en inhomogene tumor met een diameter van maximaal 28 bij 18 cm, bestaande uit deels solide materiaal en deels mucineus materiaal of vocht (figuur 2). Er zijn geen aanwijzingen voor lymfadenopathie. Echografie ten behoeve van cytologische punctie toont een grote echoarme massa met bij doppler onderzoek verhoogde flow. Het cytologisch beeld is sterk verdacht voor maligniteit, met geringe overeenkomsten met het eerder verkregen histologisch beeld van het adenosarcoom. Nieuwe histologie wordt niet afgenomen, maar er wordt uitgegaan van een recidief adenosarcoom.

Patiënte wordt palliatief behandeld. Zij ziet af van palliatieve chemotherapie vanwege de lage kans op respons. >>



*Figuur 1. Whole body skelet scintigram, anterior en posterior opnamen 3 uur na injectie van 494 MBq Tc-99m-HDP. Opvallend diffuus verhoogde en irregulaire opname in het abdomen (rode pijl). Tevens wordt een standsafwijking gezien van de lumbale wervelkolom en focaal verhoogde opname lateraal in de linker 7e rib, in de onderpool van het rechter sacroiliacale gewricht en in het sacrum, die het gevolg kunnen zijn van ossale metastasen.*




*Figuur 2.*  
 CT-abdomen, transversale (links) en coronale (rechts) doorsnede door de abdominale tumor met hierin solide (groene pijlen) en mucineuze (rode pijlen) componenten.

>> Het is reeds lange tijd bekend dat extra-ossale opname van technetium-99m-oxidronaat (HDP) of technetium-99m-medronaat (MDP) kan optreden bij vele uiteenlopende aandoeningen, waarover veelvuldig wordt gerapporteerd<sup>1-4</sup>. Veelal is een verhoogde flow de oorzaak van verhoogde opname, zoals in deze casus.

**Conclusie:**

Adenosarcoom van de uterus, initieel stadium 1A.  
 Na 2 jaar fors lokaal recidief, wat zichtbaar was op het skeletscintigram.

**Literatuur:**

1. Teixeira AB, Etchebehere CS, Carvalho et al. Tc-99m MDP uptake in uterine leiomyoma. Clin Nucl Med. 2000;25:484.
2. Thomas BG en Silverman ED. Focal Uptake of Tc-99m MDP in a Gossypiboma. Clin Nucl Med. 2008;33(4):290-291.
3. McDevitt GR Jr, Heironimus JD, Toney MO et al. Diffuse abdominal uptake of technetium-99m-methylene diphosphonate in a patient on continuous ambulatory dialysis during bone scintigraphy. J Nucl Med. 1992;33:2052-4.
4. Kida T, Hujita Y, Sasaki M et al. Accumulation of 99mTc methylene diphosphonate in malignant pleural and ascitic effusion. Oncology. 1984;41:427-30. 

# Nuclear Medicine Technology: Procedures and Quick Reference

**Nuclear Medicine Technology: Procedures and Quick Reference. Pete Shackett. Lippincott Williams & Wilkins. Second Edition, 2008. ISBN 0781774500**

In 2000 is de eerste editie van dit boek uitgegeven. Nu is er eindelijk de tweede editie uitgekomen.

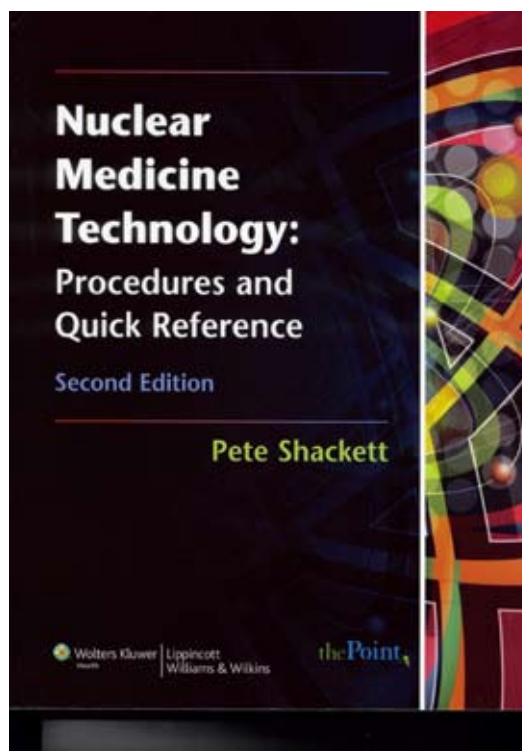
Sinds 2000 heeft de auteur alle informatie, ideeën en ervaringen op het gebied van nucleaire geneeskunde gecompileerd. Dit boek is een handig naslagwerk voor iedereen die werkt in het vak nucleaire geneeskunde, zowel voor nucleair-geneeskundigen als voor MNW'ers.

Het boek bestaat uit twee delen. Het eerste deel bevat 61 procedures voor vrijwel alle mogelijke onderzoeken die de nucleaire geneeskunde te bieden heeft, zowel in vitro als in vivo.

Ook staan er onderzoeken in die niet regelmatig gedaan worden. De procedures zijn uitgebreid beschreven: van radiofarmaca, indicaties, contra-indicaties, patiëntvoorbereiding, gebruikte apparatuur en werkwijze. Ook worden de normale en abnormale resultaten beschreven, én niet te vergeten de artefacten.


Het tweede deel bevat een lijst met allerlei standaardwaarden zoals conversietabellen, radiofarmaca, vervalstabellen van radionucliden, standaard-medicijnen voor interventies en de bijwerkingen van deze medicijnen. Ook is er een lijst met laboratoriumuitslagen die van nut kunnen zijn bij bepaalde onderzoeken en een lijst met standaardvragen in verschillende talen, misschien niet zo relevant voor Nederland, daar bij ons de mogelijkheid bestaat om gebruik te maken van tolkentelefoon.

Daarnaast is er ook opgenomen regelgeving die in USA van toepassing is. Wat misschien handig is voor Nederland, is de informatie die de patiënt krijgt vóór zijn therapie en de regels bij ontslag ná de therapie. Er zijn voorbeeldformulieren opgenomen voor de ziektegeschiedenis van de patiënt



voor allerlei onderzoeken. Tenslotte zijn er anatomische afbeeldingen van alle organen van het lichaam. Tot slot: dit boek is een zeer gedetailleerd boek, nuttig als naslagwerk, vooral voor afdelingen die niet alle onderzoeken in hun dagelijks pakket hebben. Ook te gebruiken als aanvulling op onze Aanbevelingen Nucleaire Geneeskunde 2007.

**Joyce Tjoa, MNW**

Bronovo Ziekenhuis, Den Haag. 





## Bureau NVNG

Secretariaat: Locatie B42,  
Postbus 8213,  
3503 RE Utrecht  
Telefoon: (030) 291 99 39  
Fax: (030) 291 99 58  
Email: info@nvng.nl

## Nieuwe leden

Drs. S.F.J. van Eeckhoudt  
*Werkadres:*  
Erasmus MC  
Afdeling Nucleaire Geneeskunde  
Dr. Molenwaterplein 40  
3015 GD ROTTERDAM  
Telefoon: 06-24484922  
E-mail: s.vaneekhoudt@erasmusmc.nl

Drs. P. Kruijer  
*Werkadres:*  
BV Cyclotron VU  
Afdeling Directie  
De Boelelaan 1081  
1081 HV AMSTERDAM  
Telefoon: 020-4449123  
E-mail: p.kruijer@cyclotron.nl

Drs. J.D. Paar  
*Werkadres:*  
Universitair Medisch Centrum  
UMC Utrecht  
Afdeling Nucleaire Geneeskunde/HPE02.222  
Heidelberglaan 100  
3584 CX UTRECHT  
Telefoon: 088-7558818  
E-mail: j.d.paar@umcutrecht.nl

Drs. D.D.D. Rietbergen  
*Werkadres:*  
Leids Universitair Medisch Centrum  
Afdeling Nucleaire Geneeskunde C4-Q  
Postbus 9600  
2300 RC LEIDEN  
Telefoon: 071-5266751  
E-mail: d.d.d.rietbergen@lumc.nl

## Nieuwe donateurs

IC Medical bvba  
Contactpersoon: dhr. R.G.G. van Loon  
Stoktsebaan 14

2350 VOSELAAR BELGIË  
Telefoon: 00.32.473.560556  
E-mail: rvanloon@icmedical.eu

## Adreswijzigingen

Drs. M.R.J. ten Broek  
*Nieuw werkadres:*  
Reinier de Graaf Gasthuis  
Afdeling Nucleaire Geneeskunde, Poli 14,  
Gebouw B  
Reinier de Graafweg 3-11  
2625 AD DELFT  
Telefoon: 015-2604233  
E-mail: broekma@rdgg.nl

Drs. G. Groeneweg  
*Nieuw werkadres:*  
Maastad Ziekenhuis, locatie Clara  
Afdeling Klinische Fysica  
Postbus 9119  
3007 AC ROTTERDAM  
Telefoon: 010-2911927  
E-mail: groenewegb@maastadziekenhuis.nl

Dr. B. de Keizer (0051)  
*Nieuw werkadres:*  
UMC Utrecht  
Afdeling Radiologie & Nucleaire Geneeskunde/  
HPE02.222  
Heidelberglaan 100  
3584 CX UTRECHT  
Telefoon: 088-7558818  
E-mail: b.dekeizer@umcutrecht.nl

Dr. K.P. Koopmans  
*Nieuw werkadres:*  
UMC Groningen  
Afdeling Nucl. Geneeskunde & Moleculaire  
Beeldvorming  
Postbus 30001  
9700 RB GRONINGEN  
Telefoon: 050-36116161 pieper 55204

Drs. L. Jagt  
*Nieuw werkadres:*  
Medisch Spectrum Twente Enschede  
Haaksbergerstraat 55  
7513 ER ENSCHEDE  
Telefoon: 053-4873205  
E-mail: L.vanderJagt@ziekenhuis-mst.nl

Drs. J. Tim  
*Nieuw werkadres:*  
MC Haaglanden, locatie Westeinde  
Lijnbaan 32  
2512 VA DEN HAAG  
Telefoon: 070-3303269  
E-mail: j.tim@mchaaglanden.nl

Drs. M.J.M. Vinken  
*Nieuw werkadres:*  
Diakonessenhuis Utrecht  
Afdeling Nucleaire Geneeskunde  
Bosboomstraat 1  
3582 KE UTRECHT

Drs. L.E. Weijs  
*Nieuw werkadres:*  
UMC Groningen  
Afdeling Nucl. Geneeskunde & Moleculaire  
Beeldvorming  
Postbus 30001  
9700 RB GRONINGEN

Drs. I. Al Younis (0253)  
*Nieuw werkadres:*  
Leids Universitair Medisch Centrum  
Afdeling Nucleaire Geneeskunde C4-Q  
Postbus 9600  
2300 RC LEIDEN  
Telefoon: 071-5263475  
E-mail: I.al\_Younis@lumc.nl  
Privé-adres: ongewijzigd



## Nederlandse Vereniging Medische Beeldvorming en Radiotherapie (NVMBR)

Catharijnesingel 73  
3511 GM Utrecht  
Telefoon: +31(0)30-2318842  
Fax: +31(0)30-2321362  
E-mail: info@nvmb.nl  
Internet: www.nvmb.nl

## Hoofdbestuur

Dagelijks Bestuur  
Voorzitter: Fred Felderhof,  
Penningmeester: Dirk Prins,  
Secretaris: Wim Dankaart

## Overige bestuursleden:

Herma Hemelt-Vaanholt (echografie),  
Cocky Heemskerk (Radiologie), Guus  
Veenendaal (Radiotherapie), Susan  
Lansbergen (Nucleaire Geneeskunde),  
Maud Keltjens (Kwaliteit), Dirk Zweers  
(Straling),

## Nascholing

NVMBR nascholingsdagen nucleaire  
geneeskunde thema 'Therapie'  
19 mei en 17 september 2009,  
Congrescentrum 'De Jaarbeurs' te  
Utrecht.

NVMBR nascholingsdagen nucleaire  
geneeskunde thema 'Tractus  
Respiratorus' 4 juni en 3 november  
2009, Congrescentrum 'De Jaarbeurs' te  
Utrecht.

NVMBR workshops ECG  
6 februari, 27 maart, 9 oktober en 27  
november 2009, NVMBR, Utrecht  
NVMBR workshops Ergometrie  
8 april en 19 november 2009, NVMBR,  
Utrecht

**59e Jaarcongres NVMBR, WTC Beurs,  
Rotterdam 14 en 15 mei 2009**

Tijdschrift voor Nucleaire Geneeskunde  
ISSN 1381-484 , nr. 3, september 2008

#### Uitgever



KLOOSTERHOF  
ACQUISITIE SERVICES - UITGEVERIJ

Kloosterhof acquisitie services - uitgeverij  
Eric Vullers  
Napoleonsweg 128a  
6086 AJ Neer  
T 0475 59 71 51  
F 0475 59 71 53  
E info@kloosterhof.nl  
I www.kloosterhof.nl

#### Hoofredacteur

dr. E. van de Garde  
mw. dr. L.F. de Geus-Oei  
E. redactie@sbnng.nl

#### Redactie

dr. R. Boellaard  
mw. drs. F. Celik  
dr. J. Roland  
mw. dr. ir. L.J.M. Rijks  
dr. R.H.J.A. Slart  
J. de Swart  
mw. J. Tjoa  
dr. P. van Ruk  
drs. F.A. van der Weel

#### Bureau redactie

ir. Loes Helweg  
T 0475 59 71 52  
E redactie@sbnng.nl  
E loes@kloosterhof.nl

#### Advertentie-exploitatie

Sandra Gereads  
T 0475 59 74 21  
E sandra@kloosterhof.nl

#### Vormgeving

Kloosterhof Vormgeving  
Marie-José Verstappen  
E marie-josé@kloosterhof.nl

#### Cover

WB Nagengast

#### Abonnementen

Leden en donateurs van de aangesloten beroepsverenigingen ontvangen het Tijdschrift voor Nucleaire Geneeskunde kosteloos. Voor anderen geldt een abonnementsprijs van € 45,00 per jaar; studenten betalen € 29,00 per jaar (incl. BTW en verzendkosten). Opgave en informatie over abonnementen en losse nummers (€ 13,50) bij Kloosterhof acquisitie services - uitgeverij, telefoon 0475 59 71 51.

#### Verschijningsdata, jaargang 31

Nummer 1 21 maart 2009  
Nummer 2 20 juni 2009  
Nummer 3 19 september 2009  
Nummer 4 12 december 2009

#### Aanleveren kopij, jaargang 31

Nummer 1 1 december 2008  
Nummer 2 2 maart 2009  
Nummer 3 1 juni 2009  
Nummer 4 1 september 2009

#### Kloosterhof acquisitie services - uitgeverij

Het verlenen van toestemming tot publicatie in dit tijdschrift houdt in dat de auteur aan de uitgever onvoorwaardelijk de aanspraak overdraagt op de door derden verschuldigde vergoeding voor kopiëren, als bedoeld in Artikel 17, lid 2, der Auteurswet 1912 en in het KB van 20-7-1974 (stb. 351) en artikel 16b der Auteurswet 1912, teneinde deze te doen exploiteren door en overeenkomstig de Reglementen van de Stichting Reprorecht te Hoofddorp, een en ander behoudend uitdrukkelijk voorbehoud van de kant van de auteur.

# Cursus- en Congresagenda

2009

#### Nuclear Medicine 2009 PET/CT & SPECT/CT

16 – 19 January, 2009. San Juan, Puerto Rico

#### Nationale Conferentie Proton Radiotherapie

29 January, 2009. Delft, The Netherlands. [www.protonconferentie.nl](http://www.protonconferentie.nl)

#### IPEM meeting: Current state and future directions of nuclear medicine imaging technology

03 February, 2009. London, Great Britain. [www.ipem.ac.uk](http://www.ipem.ac.uk)

#### CT: coronaire calciumscore en angiografie

5 February, 2009. Utrecht, The Netherlands. [www.cvoi.nl/Cursusaanbod/details/Beeldvormingavond%253A-Coronaire-calciumscore.html](http://www.cvoi.nl/Cursusaanbod/details/Beeldvormingavond%253A-Coronaire-calciumscore.html)

#### 4th Annual Symposium on PET/CT and Molecular Imaging

12 – 14 February, 2009. Las Vegas, Nevada. [www.snm.org](http://www.snm.org)

#### EANM Cardiovascular Course

21 – 22 February, 2009. Vienna Austria. [www.eanm.org](http://www.eanm.org)

#### EANM Technologists PET/CT Course

28 February – 1 March, 2009. Vienna Austria. [www.eanm.org](http://www.eanm.org)

#### ECR 2009

6 – 10 March, 2009. Vienna, Austria. [www.myesr.org](http://www.myesr.org)

#### Nuclear Medicine 2009 PET/CT & SPECT/CT

26 – 29 March, 2009. San Juan, Puerto Rico. [www.snm.org](http://www.snm.org)

#### Nuclear Medicine Satellite Course "Diamond"

27 – 29 March, 2009. Davos, Switzerland. [www.idkd.org](http://www.idkd.org)

#### EANM Clinical PET/CT Course

28 – 29 March, 2009. Vienna Austria. [www.eanm.org](http://www.eanm.org)

#### ISORBE 2009

28 – 29 March, 2009. Antalya, Turkey. [www.isorbe2009.org](http://www.isorbe2009.org)

#### EANM Neuroimaging Course

4 – 5 April, 2009. Vienna Austria. [www.eanm.org](http://www.eanm.org)

#### ISMRM Scientific Meeting & Exhibition

18 - 24 April, 2009. Honolulu, Hawaii. [www.ismrm.org](http://www.ismrm.org)

#### Molecular Imaging in Drug Discovery

23 - 24 April, 2009. Groningen, The Netherlands. [www.ngmb.nl](http://www.ngmb.nl)

#### 39th Annual Scientific Meeting of the Australian and New Zealand Society of Nuclear Medicine

23 – 27 April, 2009. Sydney, Australia. [www.anzsnm2009.com](http://www.anzsnm2009.com)

## Adreswijzigingen

Regelmatig komt het voor dat wijziging in het bezorgadres voor het Tijdschrift voor Nucleaire Geneeskunde op de verkeerde plaats worden doorgegeven. Adreswijziging moeten altijd aan de betreffende verenigingssecretariaten worden door gegeven. Dus voor de medisch nucleair werkers bij de NVMBR, en voor de leden van de NVNG en het Belgisch Genootschap voor Nucleaire Geneeskunde aan hun respectievelijke secretariaten. De verenigingssecretariaten zorgen voor het door geven van de wijzigingen aan de Tijdschrift adresadministratie. Alleen adreswijzigingen van betaalde abonnementen moeten rechtstreeks aan de penningmeester van de Stg. ter Bevordering van de Nucleaire Geneeskunde gemeld worden: SBNG, tav. Penningmeester | Nieuwe Parklaan 112 | 2587 BW Den Haag of per E-mail: [penningmeester@sbnng.nl](mailto:penningmeester@sbnng.nl)

Met vriendelijke groet, Koos Blokland

# EXPERTS IN RADIATION PROTECTION



ELFO  
mobile automatic  
injection system

ALTHEA  
automatic fractioning  
system

## One supplier for all!

- Hot Cells for GMP production & research
- Automatic dispensing systems
- Automatic injection systems
- Validation and Qualification for GMP lab in compliance with pharmacopoeia
- Environmental monitoring systems
- Air compressing stations
- Furnishing and accessories
- Cyclotron bunker doors
- Customized projects

### COMECER S.p.A.

Via Emilia Ponente 390, 48014 Castel Bolognese (RA)  
Italy Tel. +39-0546656375 Fax +39-0546656353  
E-mail: [comecer@comecer.com](mailto:comecer@comecer.com)

### Your local contact

A.M. van Gaans T: +31 (0)30 220 5154 E-mail: [comecer@vangaans.nl](mailto:comecer@vangaans.nl)

# Where dementia symptoms blend in



## A diagnosis that stands out

DaTSCAN, helping you make a more accurate differential diagnosis between probable dementia with Lewy bodies and Alzheimer's disease.

New indication



GE imagination at work

**DaTSCAN™**  
IOFLUPANE (<sup>123</sup>I)

**INFORMATIE VOOR HET VOORSCHRIJVEN VAN DaTSCAN™ joflupaan (<sup>123</sup>I)**  
Raadpleeg voordat u dit geneesmiddel voorschrijft de volledige samenvatting van de productkenmerken. De indicaties en goedkeuringen kunnen per land verschillen. Aanvullende informatie is op verzoek verkrijgbaar. **PRESENTATIE** Flacons met 185 MBq of 370 MBq joflupaan (<sup>123</sup>I) op referentietijdstip. **INDICATIES** Het aantonen van een verlies aan functionele dopaminerge zenuwuiteinden in het striatum. i) Bij patiënten met een klinisch onduidelijk Parkinsonistisch syndroom, teneinde essentiële tremor te helpen onderscheiden van Parkinsonistische syndromen die verwant zijn aan de idiopathische ziekte van Parkinson, multipel systeematrofie (MSA) en progressieve supranucleaire palsy (PSP). Het is niet mogelijk om met behulp van DaTSCAN onderscheid te maken tussen de ziekte van Parkinson, multipel systeematrofie en progressieve supranucleaire palsy. ii) Als hulpmiddel bij het differentiëren van waarschijnlijke dementie met Lewy-body's van de ziekte van Alzheimer. DaTSCAN kan geen onderscheid maken tussen dementie met Lewy-body's en dementie bij de ziekte van Parkinson. **DOSERING EN WIJZE VAN TOEDIENING** DaTSCAN is een oplossing voor intraveneuze injectie met 5% ethanol en dient onverdund toegepast te worden. De klinische werkzaamheid van het middel is aangetoond binnen het gebied van 111 - 185 MBq. Gebruik het middel niet buiten dit gebied. Voorafgaand aan de injectie en na afloop dient de schildklier op een adequate wijze te worden geblokkeerd. SPECT imaging dient plaats te vinden tussen drie en zes uur

na de DaTSCAN injectie. DaTSCAN wordt niet aanbevolen voor toepassing bij kinderen of adolescenten. Voor gebruik bij patiënten die zijn doorverwezen door specialisten die ervaring hebben met de behandeling van bewegingsstoornissen en/of dementie. **CONTRA-INDICATIES** Zwangerschap en overgevoeligheid voor jodide of één van de hulpstoffen. **WAARSCHUWINGEN EN VOORZORGSMAATREGELEN** Radioactieve geneesmiddelen mogen alleen worden gebruikt door gekwalificeerde personen met de toepasselijke goedkeuring van de regering en dienen te worden bereid met behulp van aseptische en radiodiagnostische voorzorgsmaatregelen. DaTSCAN wordt niet aanbevolen voor patiënten met en matige tot ernstig verminderde nier- of leverfunctie. **INTERACTIES** Houd rekening met de huidige medicatie. Geneesmiddelen die binden aan de dopamine transporter kunnen de diagnose beïnvloeden. Hieronder worden gerekend amfetamine, benztropine, bupropion, cocaïne, mazindol, methylfenidaat, fentermine en sertraline. Van de volgende geneesmiddelen is aangetoond dat ze gedurende klinische studies niet interfereren met de DaTSCAN beeldvorming: amantadine, trihexyfenidyl, budipine, levodopa, metoprolol, primidon, propranolol en selegiline. Dopamine agonisten en antagonist die actief zijn op de postsynaptische dopamine receptoren zullen naar verwachting de beeldvorming niet beïnvloeden en kunnen daarom, indien gewenst, gebruikt blijven worden. **ZWANGERSCHAP EN BORSTVOEDING** Gecontra-indiceerd bij zwangerschap. Er dient altijd navraag te worden gedaan naar een

eventuele zwangerschap bij vrouwen in de vruchtbare leeftijd. Van een vrouw die over tijd is, moet worden aangenomen dat ze zwanger is. Indien toediening noodzakelijk is bij een vrouw die borstvoeding geeft, dient het geven van borstvoeding worden onderbroken en worden vervangen door flesvoeding. **BIJWERKINGEN** Er zijn geen ernstige nadelige reacties gemeld. Vaak voorkomende bijwerkingen zijn hoofdpijn, duizeligheid, verhoogde eetlust en jeuk. Blootstelling aan ioniserende straling is in verband gebracht met de kans op het ontstaan van kanker en met de kans op het ontstaan van erfelijke afwijkingen. De dosis moet daarom zo laag mogelijk worden gehouden. Zeer zelden werd hevige pijn op de injectieplaats gemeld na toediening in kleinere aderen. **DOSIMETRIE** De effectieve dosis als gevolg van de toediening van 185 MBq is 4,35 mSv. **OVERDOSERING** In geval van overdosering moet worden aangeraden vaak te urineren en te defeceren. **HOUDER VAN DE VERGUNNING VOOR HET IN DE HANDEL BRENGEN** GE Healthcare Limited, Amersham Place, Little Chalfont, Buckinghamshire, HP7 9NA, Verenigd Koninkrijk. **INDELING VOOR DE AFLEVERING** Geneesmiddel op medisch voorschrift. **NUMMERS VAN DE VERGUNNING VOOR HET IN DE HANDEL BRENGEN** EU/1/00/135/001 en EU/1/00/135/002. **DATUM VAN HERZIENING VAN DE TEKST** 14 november 2006.