

VU Research Portal

Imaging P-glycoprotein: The gatekeeper of the blood-brain barrier

Raaphorst, R.M.

2019

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

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

citation for published version (APA)

Raaphorst, R. M. (2019). *Imaging P-glycoprotein: The gatekeeper of the blood-brain barrier: Development of novel fluorine-18 labeled positron emission tomography tracers to investigate P-glycoprotein at the blood-brain barrier*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

General rights

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

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

Take down policy

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

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Nederlandse samenvatting

De bloed-hersenbarrière speelt een cruciale rol in de bescherming van de hersenen voor het binnentreden van toxische stoffen door de mogelijkheden voor transport tussen en door cellen te beperken. Via specifieke transporteiwitten in het membraan van de endotheelcellen is transcellulaire (door de cel heen) passage nog mogelijk van bijvoorbeeld aminozuren, vitaminen en suikers. Actieve efflux transporters, aangedreven door ATP, reguleren het transport van diverse verbindingen van de hersenen naar het bloed. De meest voorkomende ATP-bindende cassette (ABC) transporters P-glycoproteïne (P-gp), borstkankerresistentie-eiwit (BCRP) en multiresistentie-geassocieerd eiwit (MRP) 1 zijn de afgelopen decennia grondig bestudeerd.

In **hoofdstuk 1** van dit proefschrift wordt positronemissietomografie (PET) geïntroduceerd als een *in vivo* beeldvormende techniek om deze ABC-transporters te bestuderen. Hierbij wordt gebruik gemaakt van een radioactief gelabelde verbinding, een radiofarmacon of radiotracer. Het is belangrijk dat deze tracer specifieke interactie heeft met het doeleiwit, bijvoorbeeld P-gp, om betrouwbare PET-resultaten te geven. Zoals beschreven in **hoofdstuk 2**, is PET een krachtige methode gebleken om de functie van ABC-transporters en hun rol in de ontwikkeling van neurodegeneratieve ziekten zoals de ziekte van Alzheimer te onderzoeken en te meten. Verhoogde opname van de tracer in de hersenen geeft aan dat de functie van P-gp verminderd is, terwijl verlaagde opname een indicatie kan zijn dat de transporter in verhoogde concentratie aanwezig is. (*R*)-[¹¹C]verapamil is de meest gebruikte P-gp PET-tracer voor het beoordelen van de P-gp-functie en heeft klinische relevantie aangetoond bij Alzheimer patiënten. Een nadeel van de koolstof-11 gelabelde verbinding is de korte halfwaardetijd van 20 minuten, die het gebruik ervan beperkt tot centra met een cyclotron, waar de radioactiviteit gemaakt wordt.

Om de korte halfwaardetijd te omzeilen, zijn er in dit onderzoek twee fluor-18 verapamil analogen gesynthetiseerd en geëvalueerd in **hoofdstuk 3**. Voor [¹⁸F]**1** werd de oorspronkelijke [¹¹C]-methylgroep vervangen door een [¹⁸F]fluorethylgroep om de oorspronkelijke structuur van [¹¹C]verapamil zo goed mogelijk te simuleren. Daarnaast werd het tweede analoog [¹⁸F]**2** ontworpen om minder gevoelig te zijn voor metabolisme. Aangezien het elimineren van de [¹¹C]methylgroep de eerste metabole stap is in het metabolisme van [¹¹C]verapamil, werd de oorspronkelijke [¹¹C]methylgroep verwijderd, wat resulteert in een secundair amine. Het omzeilen van deze stap kan leiden tot een verbinding die minder vatbaar is voor metabolisme. Het is bekend dat de resulterende nor-verapamil ook een substraat van P-gp is en de verandering zou de interactie met P-gp niet moeten verstoren. Vervolgens werd een van de methoxygroepen op de aromatische

ring vervangen door een [^{18}F]fluorethylgroep, ervan uitgaande dat de sterkere C-O-binding in vergelijking met de C-N-binding zou leiden tot een metabolisch stabielere tracer.

Beide PET-tracers [^{18}F]**1** en [^{18}F]**2** vertoonden substraatgedrag bij ratten die behandeld waren met de remmer tariquidar, met verschillende hersenopnamepatronen in de tijd. Terwijl [^{18}F]**1** een hogere initiële opname vertoonde, gevolgd door een snellere uitspoeling, gaf [^{18}F]**2** het beeld van een langzamere opname in de hersenen. Tariquidar is een remmer van zowel BCRP als P-gp. Aanvullend PET-onderzoek bij knock-out muizen *Mdr1alb*^(-/-) en *Bcrp1*^(-/-) en wildtype-muizen toonde aan dat [^{18}F]**2** specifiek was voor P-gp, ondanks het onverwachte hogere metabolisme.

In een poging om dit hoge tempo van metabolisme te omzeilen, werden gedeutereerde analogen gesynthetiseerd en geëvalueerd in **hoofdstuk 4**. Waterstofatomen in de fluorethylgroepen van [^{18}F]**1** en [^{18}F]**2** werden vervangen door deuteriumatomen om de bindingssterkte met koolstofatomen te vergroten en als gevolg de metabole stabiliteit te verhogen. Daarnaast werden twee extra analogen van [^{18}F]**2** ontwikkeld, met een gedeutereerde methylgroep gebonden aan het amine, zoals de originele verapamil. De fluorethylgroep van [^{18}F]**3-d₄** bevatte geen deuteriumatomen, terwijl de fluorethylgroep van [^{18}F]**3-d₇** wel was gedeutereerd.

Het onderzoek naar het metabolisme van de verbindingen in Wistar-ratten heeft aangetoond dat de metabole stabiliteit van [^{18}F]**1** en [^{18}F]**2** verbeterde door de toevoeging van deuterium in de fluorethylgroep. Bovendien werd een verhoogde metabole stabiliteit van de analogen [^{18}F]**3-d₃** en [^{18}F]**3-d₇** waargenomen, wat het gevolg kan zijn van sterische hindering door de methylgroep om enzymatisch metabolisme uit te voeren. [^{18}F]**3-d₇** vertoonde de hoogste stabiliteit en werd geëvalueerd in *Mdr1alb*^(-/-) en wildtype-muizen met behulp van PET. Het *in vivo* gedrag van [^{18}F]**3-d₇** toonde sterke gelijkenissen met dat van (*R*)-[^{11}C]verapamil. Samen met verbeterde metabole stabiliteit van [^{18}F]**3-d₇**, vergeleken met andere met fluor-18 gemerkte tracers, ondersteunt dit de mogelijkheid voor het gebruik van [^{18}F]**3-d₇** voor klinische studies.

De nieuwe potentiële P-gp PET-tracers beschreven in **hoofdstuk 3** en **4** zijn substraten van P-gp, wat betekent dat deze een beeld geven van de P-gp-functie in plaats van kwantificatie van P-gp eiwitten. Een radioactieve tracer die direct bindt aan P-gp is nodig om deze P-gp-expressie te meten, maar tot op heden is er nog geen succesvolle tracer gerapporteerd. Vermoedelijke remmers vertonen substraatgedrag bij de lage concentraties die gebruikt worden bij PET-studies. Dosisafhankelijke *in vitro* onderzoeken die beginnen bij nanomolaire concentraties kunnen mogelijk een betrouwbaardere

voorspelling bieden voor *in vivo* gedrag. Deze aanpak wordt onderzocht in **hoofdstuk 5**. Om de voorspellende waarde van celstudies (*in vitro*) te verbeteren, werden zeven tracers gelabeld met tritium (^3H) en werden bidirectionele substraat transport assays in MDCKII-MDR1-cellen uitgevoerd bij drie verschillende concentraties (0,01, 1 en 50 μM) samen met experimenten met behulp van P-gp-remmers. Ter vergelijking werden de zeven (niet-gelabelde) verbindingen gebruikt in transportbepalingen in Caco-2-cellen in een concentratie van 10 μM en in calceïne-AM-remmingstests in MDCKII-MDR1-cellen. Alle P-gp-substraten werden dosisafhankelijk getransporteerd. Bij de hoogste concentratie (50 μM) was P-gp verzadigd op dezelfde manier als na behandeling met P-gp-remmers. De beste *in vivo* correlatie werd verkregen met de bidirectionele transportbepaling bij een concentratie van 0,01 μM . Conclusie hiervan was dat een concentratie van één micromolair in een transporttest of calceïne-AM-test alleen niet voldoende is voor correcte voorspelling van het *in vivo* gedrag van P-gp-tracers. Potentiele P-gp tracers moeten daarom *in vitro* bij meerdere (lage) concentraties worden getest om hun *in vivo* gedrag te voorspellen.

Als er bij lage nanomolaire concentraties een P-gp-remmer wordt geïdentificeerd op basis van het type onderzoek dat hierboven beschreven is, zou het - gelabeld met een positronemitter - mogelijk gebruikt kunnen worden als een diagnostisch hulpmiddel om expressieniveaus van P-gp te kunnen bepalen een neurodegeneratieve ziekte. Dit blijft echter een ver vooruitzicht, omdat de exacte functie van P-gp bij deze ziekten nog verder wordt onderzocht. Niettemin zou PET een centrale rol kunnen spelen in deze studies.