

**„Synthese, ^{68}Ga -Markierung, Aufreinigung und Evaluierung
von divalenten DO2A-basierenden Radiopharmaka“**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

im Promotionsfach Chemie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Carsten Burchardt

geb. in Mainz

Mainz, 2010

Kurzzusammenfassung:

Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) bietet die Möglichkeit, nicht invasiv Stoffwechselprozesse *in vivo* zu visualisieren und quantifizieren. Mit dem $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Radionuklidgenerator wurde das PET-Nuklid ^{68}Ga überall, auch abseits von Zyklotronstandorten, verfügbar gemacht. Neben der Verfügbarkeit besitzt ^{68}Ga auch gute Umwandlungseigenschaften für die PET, muss aber koordinativ über einen Chelator in das Radiopharmakon eingebracht werden.

Es wurde gezeigt, dass divalente Radiopharmaka eine höhere Affinität zu einem bestimmten biologischen Target aufweisen als monovalente. In einem neuen Ansatz wurden zwei bioaktive Gruppen direkt an einen bifunktionellen Chelator für die Radiomarkierung von ^{68}Ga gekoppelt. Dieser Ansatz ist synthetisch deutlich leichter zugänglich als die bisher verwendeten dendrimere Strukturen, um mehrere Targeting Vektoren (TV) an einen Chelator zu koppeln. In dieser Arbeit wurden die beiden freien Ringstickstoffe von 1,7-Diessigsäure-1,4,7,10-Tetraazacyclododecan (DO2A) verwendet, um zwei TV einzuführen. Als TV wurden zwei Substanzen mit hohen Affinitäten zum Sulfonylharnstoffrezeptor SUR1 synthetisiert. Da SUR1 auf den β -Zellen der Langerhans'schen Inseln im Pankreas exprimiert wird, könnten diese Verbindungen zur Quantifizierung der β -Zell Masse dienen. Solch ein Tracer wäre eine entscheidende Weiterentwicklung in der Frühdiagnostik und Therapiekontrolle von Diabetes Mellitus Typ 1. Desweiteren wurde die Aminosäure Tyrosin divalent an DO2A gekoppelt und mit ^{68}Ga markiert. Diese Derivate wurden *in vitro* und *in vivo* evaluiert und zeigten vielversprechende Ergebnisse. Eine ^{68}Ga -markierte Aminosäure könnte aufgrund der hervorragenden Verfügbarkeit des Radionuklids über den $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Radionuklidgenerator ein sehr großes Potential für die Tumordiagnostik besitzen. Mit O-2-Fluorethyltyrosin (FET), einem bereits angewendeten, mit [^{18}F]-markierten PET-Tracer, wurde die Eignung von auf Oocyten exprimierten Aminosäuretransportern zur Bestimmung des Aufnahmemechanismus von Aminosäuretracern untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass dieses Modell sehr gut geeignet ist und neue Erkenntnisse über die Aufnahme von FET gewonnen werden. DO2A wurde außerdem noch mit verschiedenen kopplungsfähigen Gruppen, wie Isothiocyanaten oder Maleimid, funktionalisiert, um eine leichte Konjugation mit interessanten Biomolekülen zu erlauben. Nach den organischen Synthesen wurden die ^{68}Ga -Markierungen optimiert. Hierbei wurde der Einfluss aller Parameter untersucht und neben dem klassischen Heizen eine Markierungsmethode mit Hilfe einer Labormikrowelle etabliert. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich DO2A-basierende Radiopharmaka durchaus für ^{68}Ga -Markierung eignen und auch für die Dauer einer PET-Untersuchung stabil sind. In weiteren Markierungsarbeiten wurde der Einfluss des Puffers 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid (HEPES) untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass HEPES einen Komplex mit ^{68}Ga bildet und bei sehr kleinen Vorläuferkonzentrationen in Konkurrenz zum Markierungsvorläufer treten kann. Außerdem wurde eine Aufreinigungsmethode entwickelt, mit der es möglich ist, DOTA-konjugierte Radiopharmaka über Festphasenextraktionskartuschen sowohl von Radiometall, als auch vom eingesetzten Überschuss an Markierungsvorläufer zu trennen.

Abstract:

Positron-emission tomography (PET), a quantitative modality of molecular imaging enables the non-invasive visualization of biochemical processes *in vivo*. The $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -radionuclide generator makes the PET-nuclide ^{68}Ga anywhere available without an on-site cyclotron. Besides the perfect availability ^{68}Ga shows well suited nuclide properties for PET, but it has to be co-ordinated by a chelator to introduce it in a radiopharmaceutical.

It was demonstrated that divalent radiopharmaceuticals show a higher affinity to a specific biological target than monovalent ones. In a novel approach two bioactive groups were directly attached to the bifunctional chelator, supposed to be labeled with ^{68}Ga . This way to introduce two targeting vectors (TV) into a radiopharmaceutical is related with much less synthetic effort than the dendrimeric approach used before. In the presented work the two free ring-nitrogens of 1,7-diacetic acid-1,4,7,10-tetraazacyclododecane were utilized to attach two TVs. As one category of TVs derivatives with a high affinity to the sulfonyleurea-receptor SUR1 were synthesized. Due to the high expression of SUR1 on the β -cells in the islets of Langerhans in the pancreas these compounds could be used for the non-invasive quantification of the β -cell mass. A β -cell tracer would be of high interest for the early diagnosis and therapy control of diabetes mellitus type 1. Furthermore the amino acid tyrosine was coupled divalent to DO2A and labeled with ^{68}Ga . These derivatives were examined *in vitro* and *in vivo* and showed very promising results. Due to the perfect availability a ^{68}Ga -labeled amino acid would bear great potential for tumor-diagnostics. With O-2-Fluoroethyltyrosine, an established [^{18}F]-labeled PET-tracer was checked, if the expression of specific amino acid transporters on oocytes is a suitable model for the determination of the uptake mechanism of amino acid tracers. It was found that this method is well suited and new knowledge on the uptake of FET was achieved. DO2A was conjugated with different functional groups like isothiocyanates or maleimides, for the possibility of the attachment of interesting biomolecules. Besides the organic syntheses the ^{68}Ga -labeling procedures were optimized. The influence of all relevant parameters was studied and a microwave supported method was established. It was shown that DO2A is matching the requirements for ^{68}Ga -labeling and that ^{68}Ga -labeled DO2A-based radiopharmaceuticals have a sufficient stability for a PET study. In further labeling experiments 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid (HEPES) was investigated as buffer system in ^{68}Ga -labeling reactions. It was demonstrated that HEPES forms a ^{68}Ga -complex under labeling conditions and is competitive to the labeling precursor at very low precursor concentrations. And a method for the purification of DOTA-conjugated radiopharmaceuticals was developed. With this method it is possible to purify the formed DOTA-radiopharmaceutical from both, radiometal and labeling precursor.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Molekulare Bildgebung	1
1.2	Positronen-Emissions-Tomographie (PET).....	2
1.2.1	Funktionsweise der PET	2
1.3	Radionuklide für die PET	3
1.3.1	Zyklotron-produzierte β^+ -Emitter	3
1.3.2	Das PET-Nuklid ^{68}Ga	6
1.4	^{68}Ga -Radiopharmaka.....	8
1.4.1	System potentieller ^{68}Ga -Radiopharmaka	8
1.5	Bifunktionelle Chelatoren	10
1.6	Biologische Targets	13
1.6.1	Aminosäuren	14
1.6.2	β -Zell-Tracer zur Diagnostik des Diabetes Mellitus Typ 1.....	16
1.7	^{68}Ga -Markierungen	20
1.7.1	„Post-Processing“	20
1.7.2	Klassische Radiomarkierungen und Stabilitätsuntersuchungen.....	21
1.7.3	Mikrowellen-gestützte Radiosynthese	23
1.7.4	Aufreinigung der markierten Substanzen.....	24
1.8	Evaluierung der ^{68}Ga -Radiopharmaka	25
1.8.1	<i>In vitro</i> -Evaluierung.....	25
1.8.2	<i>In vivo</i> -Evaluierung.....	27
2	Manuskripte.....	32
2.1	„Multi-gram scale synthesis of various functionalized, divalent DO2A-based chelators for ^{68}Ga -PET“	33
2.2	„Verbindung aus einem Metallion und einem Markierungsvorläufer mit zwei oder mehreren Targetingvektoren und Verwendung der Verbindung“.....	47

2.3	„ ^{68}Ga]Ga-DO2A-(Obu-L-tyr) ₂ : Synthesis, ^{68}Ga -radiolabeling and in vitro studies of a novel ^{68}Ga -DO2A-tyrosine derivative as potential tumor tracer for PET”	81
2.4	„Divalent DO2A-conjugated SUR1-affine derivatives for the non-invasive quantification of the pancreatic β -cell-mass in vivo with ^{68}Ga -related positron-emission-tomography (PET)”	92
2.5	„ ^{68}Ga -labelling of DO2A-(butyl-L-tyrosine) ₂ with cation-exchanger post-processed ^{68}Ga : Practical aspects”	118
2.6	Radiochemical evidence for the competitive formation of Ga^{III} HEPES complexes in ^{68}Ga labeling reactions”	136
2.7	„Isolierung Radiometall-markierter Pharmaka auf Grundlage makrozyklischer Liganden“	144
2.8	„Investigation of the uptake mechanism of O-(2-[^{18}F]fluoroethyl)-L-tyrosine (FET)”	156
3	Zusammenfassung und Ausblick	170
3.1	Divalente Chelatoren	170
3.2	SUR1-Liganden	171
3.3	Aminosäuretransporter-Liganden	173
3.4	Spezifische Aktivität	180
3.5	Markierungen in HEPES	182
3.6	NMR-Analytik	182
3.7	Zusammenfassung	183

1 Einleitung

1.1 Molekulare Bildgebung

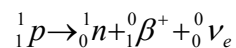
Die molekulare Bildgebung spielt in der modernen medizinischen Diagnostik eine immer entscheidendere Rolle, da sie es ermöglicht, nicht-invasiv Informationen aus dem lebenden Organismus („*in vivo*“) zu erhalten¹. Während die „klassischen“ Methoden, wie Röntgen, Ultraschall, Computertomographie oder Magnet-Resonanz-Tomographie die Morphologie des Gewebes teilweise sehr detailliert abbilden, können mittels den nuklearmedizinischen Methoden, wie der „Single-Photon-Emission-Computed-Tomography“ (SPECT) und der „Positronen-Emissions-Tomographie“ (PET), sowie der funktionellen Magnet-Resonanz-Bildgebung (fMRI) kleinste Veränderungen und Abnormalitäten der Stoffwechselfvorgänge im Körper abgebildet werden. In diesem Phänomen liegt auch der entscheidende Vorteil dieser Techniken begründet. Da bei zahlreichen Erkrankungen zunächst eine Veränderung der biochemischen Prozesse auftritt, die dann erst später morphologische Veränderungen auslöst, können diese Krankheiten deutlich früher erkannt und eine entsprechende Therapie eingeleitet werden. Beispiele hierfür sind die Frühdiagnostik neurodegenerativer Erkrankungen wie z. B. Alzheimer, die Diagnostik von Krebs, aber auch die Früherkennung von anderen Krankheiten, wie z. B. Diabetes. Die Vorteile der fMRI liegen in der sehr hohen Auflösung dieser Technik, allerdings ist sie wenig sensitiv. Die Sensitivität ist die große Stärke der radiopharmazeutisch/nuklearmedizinischen Verfahren. Diese basieren auf dem Tracerprinzip (G. de Hevesy, Nobelpreis 1943)², das darauf gründet, dass sehr geringe Mengen radioaktiver Sonden, die sog. Tracer, auf atomarer oder molekularer Ebene („molekulare Bildgebung“) in den zu untersuchenden Organismus eingeschleust werden und sich dort verhalten wie die entsprechenden nicht-radioaktiven Atome oder Moleküle. Durch die hervorragende Nachweisbarkeit radioaktiver Strahlung kann das Verhalten der Tracer *in vivo* von außen detektiert und so Rückschlüsse auf den zu untersuchenden Prozess gezogen werden. Für die SPECT/PET geeignete Tracer bestehen in den typischen Fällen aus einer pharmakophoren Gruppe, die die Selektivität im Körper bestimmt und einem Radionuklid für die Detektion. Der Tracer wird über die körpereigenen Wege transportiert und akkumuliert sich je nach biologischer Funktion im Zielgewebe. Die eingesetzten Mengen an Tracer sind

hierbei so gering, dass sie weder eine pharmakologische Wirkung haben, noch Schäden durch die radioaktive Strahlung entstehen. Der Vorteil der PET gegenüber der SPECT ist, dass sie eine deutlich höhere lokale und temporale Auflösung ermöglicht und auch quantifizierbar ist.

1.2 Positronen-Emissions-Tomographie (PET)

1.2.1 Funktionsweise der PET

Die PET beruht auf der zeitgleichen Detektion von zwei, im Winkel von fast genau 180° zueinander ausgesandten Photonen mit einer Energie von jeweils 511 keV. Diese sind ein Folgeprodukt der β^+ -Umwandlung. Bei der β^+ -Umwandlung wird in einem protonenreichen Kern unter Aussendung eines Positrons (Ladungserhalt) und eines Neutrinos (Spinierhalt), zur Stabilisierung des Kerns ein Proton in ein Neutron umgewandelt.



Die durch diesen Prozess freiwerdende Energie wird als kinetische Energie auf die beteiligten Teilchen übertragen. Die Verteilung erfolgt zufällig, man spricht von einer kontinuierlichen Energieverteilung. Das Positron kann also von einer β^+ -Energie knapp über Null (Null ist aufgrund der Abstoßung des positiv geladenen Positrons mit dem Kern nicht möglich) bis zum Übertrag der gesamten Energie auf das Positron (maximale β -Energie, β^{\max}) jegliche Energie besitzen. Diese Energie gibt das Positron anschließend durch Stöße mit seiner Umgebung ab (Thermalisierung), und legt dabei, je nach Energie, eine gewisse Wegstrecke zurück. Anschließend rekombiniert es mit einem Elektron aus der Umgebung. Zu einem bestimmten Anteil wird auch (intermediär) ein Positronium gebildet, das nach einer sehr kurzen Lebensdauer seine Ruhemasse nach der Formel $E=mc^2$ in Energie umwandelt (Annihilation)³. Diese Energie wird in Form der bereits oben erwähnten zwei Photonen mit einer Energie von jeweils 511 keV ausgesandt.

Die Detektion der Annihilation erfolgt mittels eines rund um den zu untersuchenden Patienten angeordneten Detektorringes nach dem Koinzidenzprinzip, d.h. die Detektion eines Photons wird nur dann als wahres Ereignis gewertet, wenn zeitgleich (innerhalb 10 ns) in einem Winkel von 180° ebenfalls ein Photon detektiert wird⁴. Aus diesem Grund ist der Detektorring in viele kleine Segmente unterteilt, die alle untereinander elektronisch verschaltet sind. Um eine möglichst hohe Nachweiswahrscheinlichkeit zu gewährleisten,

müssen die Detektoren verschiedenen Voraussetzungen erfüllen. Sie sollen idealerweise alle eintreffenden Photonen abfangen, also eine hohe „stopping power“ besitzen, aus jedem Photon ein Elektron an den angehängten Photomultiplier senden (hohe Quantenausbeute) und eine möglichst kurze Totzeit besitzen. Als Detektormaterialien sind heute vor allem Bismutgermanat (BGO) sowie Lutetium(oxy)orthosilikat (LSO) im Einsatz⁵. Die Signale der Detektoren werden anschließend von speziellen Computerprogrammen in ein Bild umgerechnet.

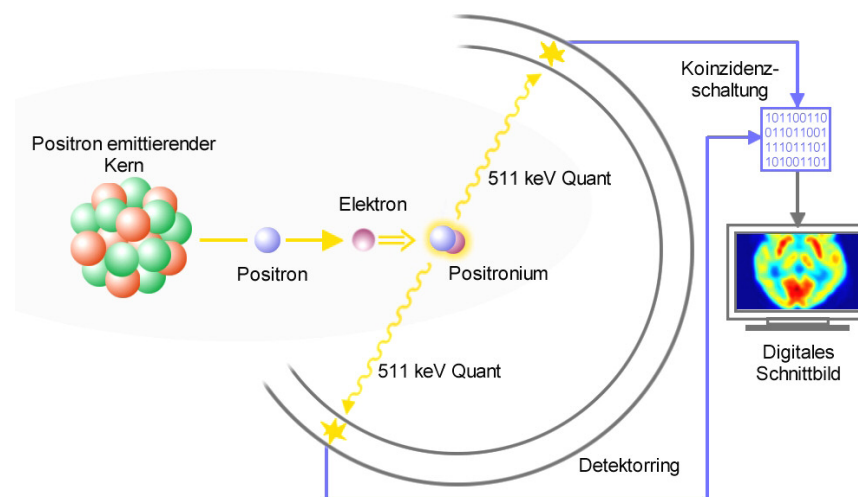


Abbildung 1: Prinzip einer PET-Untersuchung⁶

Die Ortsauflösung der PET hängt vor allem von zwei Faktoren ab. Zum einem von der maximalen β -Energie β^{\max} , da der Ort der Annihilation, der tatsächlich detektiert wird, sich mit steigender Energie weiter vom Ort der β^+ -Umwandlung entfernt. Außerdem von der räumlichen Ausdehnung der einzelnen Detektorsegmente, da diese eine räumliche Ausdehnung besitzen und, auch aus Kostengründen, nicht unendlich klein werden können, sowie von der Distanz Annihilation-Detektor.

1.3 Radionuklide für die PET

1.3.1 Zyklotron-produzierte β^+ -Emitter

Für die PET werden β^+ -Emitter benötigt. Diese sollten einen, im Vergleich zur möglichen Konkurrenzreaktion des Elektroneneinfangs, möglichst hohen Anteil an β^+ -Umwandlung,

Einleitung

eine nicht zu hohe β^{\max} und eine, für die Synthese des Radiopharmakons und die darauf folgende PET-Untersuchung, geeignete Halbwertszeit besitzen. Die Eigenschaften der wichtigsten Radionuklide für die PET sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Die wichtigsten Positronenemitter für die PET⁷

Radio-nuklid	Halbwertszeit Produktion	β_{\max} (keV) max. Reichweite in H ₂ O (mm)	Chemie	Bemerkungen
¹⁵ O	2.03 min Zyklotron	1732 keV, 8.0 mm	Schnelle on- line Gasphasen- chemie	<ul style="list-style-type: none"> • Begrenzte Anzahl markierter Moleküle • Nur vor Ort Nutzung möglich • Wiederholte Anwendung möglich
¹³ N	9.97 min Zyklotron	1198 keV, 5.1 mm	Schnelle organische Chemie	<ul style="list-style-type: none"> • Begrenzte Anzahl markierter Moleküle • Nur vor Ort Nutzung möglich • Wiederholte Anwendung möglich
¹¹ C	20 min Zyklotron	960 keV, 3.9 mm	Schnelle organische Chemie	<ul style="list-style-type: none"> • Sehr große Anzahl markierter Moleküle • Nur vor Ort Nutzung möglich • Wiederholte Anwendung möglich
⁶⁸ Ga	67.7 min Generator	1899 keV, 8.9 mm	Komplex- Chemie	<ul style="list-style-type: none"> • 88% β^+ Zerfall
¹⁸ F	109.8 min Zyklotron	634 keV, 2.3 mm	Schnelle organische Chemie	<ul style="list-style-type: none"> • Sehr große Anzahl markierter Moleküle • Lieferung/Transport möglich
⁶⁴ Cu	12.7 h Zyklotron	653 keV, 2.4 mm	Komplex- Chemie	<ul style="list-style-type: none"> • 18% β^+ Zerfall • 40% β^- Zerfall
⁸⁹ Zr	78.4 h Zyklotron	897 keV, 3.6 mm	Komplex- Chemie	<ul style="list-style-type: none"> • 23% β^+ Zerfall
¹²⁴ I	4.17 d Zyklotron	1535 keV (50%), 6.9 mm 2138 keV (50%), 10.2 mm	Organische Chemie	<ul style="list-style-type: none"> • 23% β^+ Zerfall • 77% EC • Hochenergetische γ-Strahlung (602, 722, 1691 keV)

Die relativ kurzlebigen Nuklide ^{11}C , ^{13}N und ^{15}O besitzen den großen Vorteil, dass sie in nahezu jedem organischen Molekül vorkommen. Es ist daher in diesen Fällen möglich, ein stabiles Atom gegen ein radioaktives auszutauschen. Die chemischen und pharmakologischen Eigenschaften werden durch diesen Isotopenaustausch nicht verändert. Man spricht hier auch von Isotopentracern. Aufgrund der kurzen Halbwertszeiten dieser Nuklide ist ein vor-Ort-Zyklotron für die Nuklidproduktion unerlässlich.

Tabelle 2: Herstellung wichtiger Radionuklide für die PET⁸

Radionuklid	$T_{1/2}$ [min]	Kernreaktion	Bemerkungen
^{11}C	20	$^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$	
^{13}N	10	$^{12}\text{C}(d,n)^{13}\text{N}$	
		$^{13}\text{C}(p,n)^{13}\text{N}$	angereichertes Target
^{15}O	2	$^{14}\text{N}(d,n)^{15}\text{O}$	
		$^{15}\text{N}(p,n)^{15}\text{O}$	angereichertes Target
^{18}F	110	$^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$	angereichertes Target
^{68}Ga	68		Generatorkern

Ein besonders interessantes Nuklid ist ^{18}F . Es besitzt sehr gute Umwandlungseigenschaften. Die Halbwertszeit von 109 Minuten erlaubt es, ^{18}F oder ein ^{18}F -markiertes Radiopharmakon an einem Zyklotronstandort zu produzieren und anschließend an den Ort der weiteren Verwendung zu transportieren, um dort PET-Untersuchungen durchzuführen. Allerdings ist Fluor nur in wenigen Biomolekülen vorhanden. Daher wird oft ein Atom, z. B. Wasserstoff, oder eine funktionelle Gruppe, z. B. eine Hydroxy-Gruppe, in einem Molekül durch ^{18}F ersetzt. Nach dieser Substitution muss allerdings noch nachgewiesen werden, dass sich das Radiopharmakon noch genauso oder zumindest sehr ähnlich zum Originalmolekül verhält. Man spricht in diesen Fällen von Analogtracern. Die Markierungschemie sowie die

wichtigsten Radiopharmaka der Zyklotron-produzierten Radiopharmaka wurden in der Literatur ausführlich beschrieben⁹.

1.3.2 Das PET-Nuklid ^{68}Ga

Das Nuklid ^{68}Ga nimmt eine Sonderstellung innerhalb der PET-Nuklide ein. Dieses Nuklid wird nicht direkt am Zyklotron produziert, sondern über den $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Radionuklidgenerator gewonnen. Hier macht man sich, analog zum für die SPECT benutzten $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Generator, die relativ seltene Ausnahme zu Nutze, dass ein längerlebigeres Nuklid (Mutter) in ein kürzerlebigeres (Tochter) zerfällt. Im Falle des $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Radionuklidgenerators besitzt die Mutter ^{68}Ge eine Halbwertszeit von ungefähr 271 Tagen, während die Tochter ^{68}Ga eine Halbwertszeit von nur 67,7 Minuten besitzt. Bei diesem Verhältnis, bei dem sich die Aktivität der Mutter während einer Halbwertszeit der Tochter praktisch nicht ändert, spricht man von einem „säkularen Gleichgewicht“. Demgegenüber steht das sog. „transiente Gleichgewicht“, das z.B. Generatorsysteme wie den $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Generator ($T_{1/2}(^{99}\text{Mo})=60\text{ h}$; $T_{1/2}(^{99\text{m}}\text{Tc})=6\text{ h}$) beschreibt.

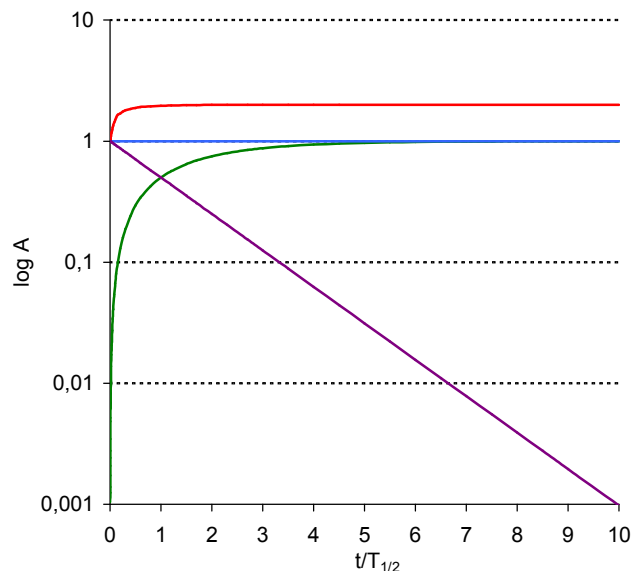


Abbildung 2: Säkulares Gleichgewicht des $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generators bezogen auf einen Trennvorgang, **rot:** Gesamtaktivität $^{68}\text{Ge} + ^{68}\text{Ga}$, **blau:** Aktivität ^{68}Ge , **grün:** Aktivität ^{68}Ga , **violett** Aktivität ^{68}Ga nach der Abtrennung¹⁰

Das für einen Generator benötigte ^{68}Ge wird in einer $^{69}\text{Ga}(p,2n)^{68}\text{Ge}$ -Kernreaktion hergestellt. Aufgrund der langen Halbwertszeit des gewünschten Produkts ist dies nur an Zyklotronanlagen mit einer relativ hohen Protonen-Energie von etwas 20 – 25 MeV. und einem sehr hohen Teilchenfluss in befriedigenden Ausbeuten möglich.

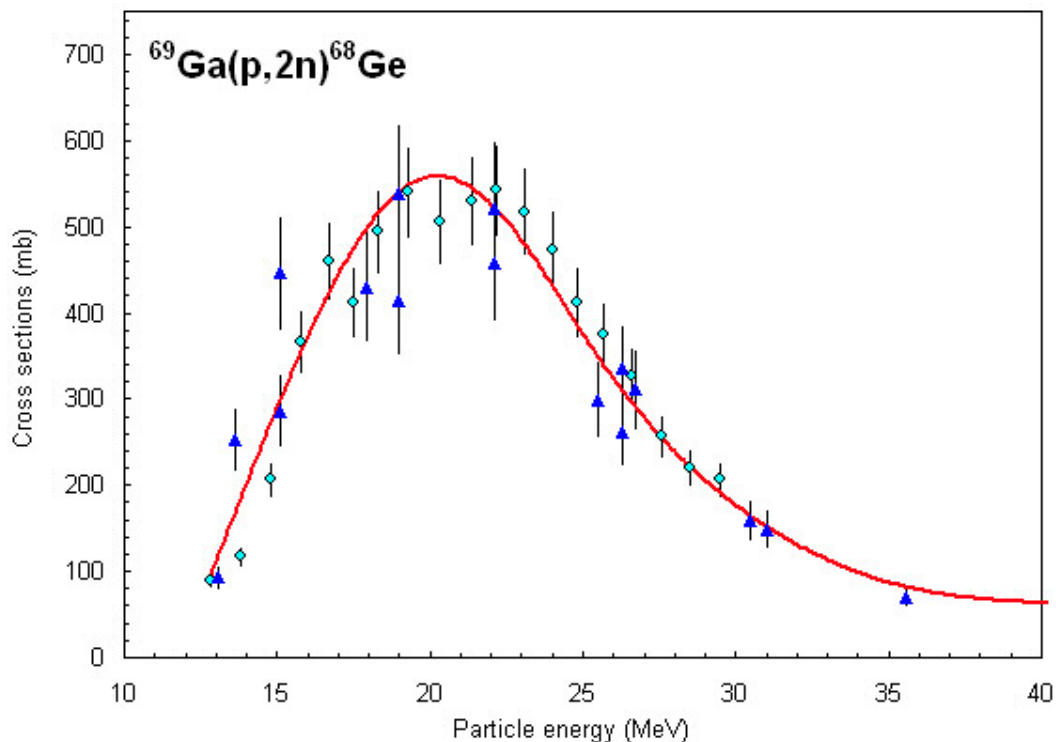


Abbildung 3: Wirkungsquerschnitt der $^{69}\text{Ga}(p,2n)^{68}\text{Ge}$ Kernreaktion¹¹

Das hergestellte ^{68}Ge wird anschließend auf einer organischen oder anorganischen Matrix, meistens TiO_2 , fixiert. Diese Matrix muss aufgrund der langen Halbwertszeit und der meist hohen Aktivitäten sehr beständig gegen Radiolyse sein. Die Mutter zerfällt nun in das gewünschte Nuklid ^{68}Ga , das mehrfach am Tag mittels 7 bis 10 mL 0,1 M HCl vom Generator eluiert und für die Synthese von ^{68}Ga -Radiopharmaka eingesetzt werden kann, während die Mutter fast zu 100% auf der Matrix verbleibt.

^{68}Ga ist mit einem β^+ -Anteil von 89%, einer β^{max} von 1,9 MeV und einer Halbwertszeit von 67,7 Minuten ein sehr geeignetes Nuklid für die PET. Der größte Vorteil liegt allerdings in der permanenten Verfügbarkeit im Vergleich zu Zyklotron-produzierten Radiopharmaka. Während ein 50 mCi $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Radionuklidgenerator, der mindestens ein Jahr verwendet werden kann, etwa 30.000 Euro kostet, belaufen sich, neben den Anschaffungskosten, allein

die jährlichen Betriebs- und Instandhaltungskosten eines Zyklotrons auf etwa 250.000 bis 500.000 US-Dollar¹². Angesichts dieser Punkte stellt die Entwicklung von ⁶⁸Ga-markierten Radiopharmaka eines der wichtigsten und aktuellsten Forschungsgebiete rund um die PET dar.

Die größte Herausforderung stellt die Integration des metallischen Radionuklids in ein potentiell Radiopharmakon dar. Gallium kommt in keinen Biomolekülen vor und bildet als Metall der dritten Hauptgruppe keine kovalenten Bindungen zu biologisch relevanten Molekülen aus. Gallium muss daher über koordinative Bindungen an das Molekül gebunden werden¹³. ⁶⁸Ga benötigt demzufolge eine komplett andere Markierungschemie als die Zyklotron-produzierten Radionuklide¹⁴.

1.4 ⁶⁸Ga-Radiopharmaka

Es gibt nur wenige Biomoleküle die dreiwertige Metalle, wie ⁶⁸Ga, stabil komplexieren können. Beispiele hierfür sind Porphyrine, die z.B. Magnesium in Chlorophyll oder Eisen in Transferrin komplexieren. Diese Metallbindungsstellen können auch mit ⁶⁸Ga markiert und als Radiopharmaka genutzt werden.

1.4.1 System potentieller ⁶⁸Ga-Radiopharmaka

In den Anfängen wurden auch Chelatoren wie Ethylendiamintertraessigsäure (EDTA)¹⁵ oder Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA)¹⁶ oder Citrat¹⁷ mit ⁶⁸Ga markiert und als Radiopharmaka für die PET eingesetzt. Diese Verbindungen hatten kein spezifisches biologisches Target und wurden hauptsächlich als Blutfluss-Tracer eingesetzt.

Eine Weiterentwicklung dieses System war der Einsatz von Chelatoren die gleichzeitig auch Gruppen mit biologischer Funktion enthalten. Hier sind besonders Chelatoren mit Phosphonat-Donoren zu nennen. Phosphonate sind auf der einen Seite in der Lage, als Donorfunktion für ⁶⁸Ga zu fungieren, auf der anderen Seite weisen Phosphonate eine Affinität zu Knochen auf. Sie sind daher geeignet, um z. B. Knochenmetastasen zu visualisieren.

Die meisten aktuellen ^{68}Ga -Radiopharmaka sind nach dem Prinzip Chelator-Spacer-Targeting Vektor aufgebaut. Dabei kommen den verschiedenen Bausteinen unterschiedliche Aufgaben zu. Der Chelator muss zum einen das Radionuklid ^{68}Ga thermodynamisch und kinetisch stabil komplexieren. Außerdem muss er die Möglichkeit bieten, über einen Spacer einen biologisch aktiven Targeting Vektor anzukoppeln. Daher spricht man in diesem Zusammenhang auch oft von bifunktionellen Chelatoren (BFC).

Der Spacer sorgt für Abstand zwischen dem Chelator/Radiometall und dem Targeting Vektor (TV). Dies ist oft notwendig, um die biologische Funktion des Targeting Vektors, z.B. die Bindung an einen Rezeptor, so wenig wie möglich zu beeinflussen.

Der Targeting Vektor ist für das biologische Verhalten des Radiopharmakons verantwortlich. Targeting Vektoren können dabei, ebenso wie die biologischen Targets im Organismus, verschiedenster Natur sein. Etabliert sind u.a. Rezeptorliganden¹⁸, spezifische Antikörper¹⁹, Transporterliganden²⁰ und Liganden für den Energiebedarf²¹. Das Spektrum an Targeting Vektoren ist so vielfältig, dass es kaum möglich ist alle zu nennen. Umso wichtiger ist die Wahl eines geeigneten Targets zu Beginn eines ^{68}Ga -Radiopharmaka-Projekts. Idealerweise ist die Bindung des Targeting Vektors an das Target spezifisch und bietet außerdem noch ein möglichst hohes Target/Hintergrund-Verhältnis.

In einer Erweiterung dieses Konzepts wurde gezeigt, dass eine höhere Anzahl Targeting Vektoren gekoppelt an einen bifunktionellen Chelator einen positiven Einfluss auf die Affinität zum biologischen Target besitzen.²² Zunächst wurden dendrimere Strukturen gebildet, um dieses „multivalency“-Konzept umzusetzen, in neueren Studien wurde aber gezeigt, dass man auch Struktur des bifunktionellen Chelators nutzen kann, um mehrere TV direkt anzukoppeln. Die Entwicklung der ^{68}Ga -Radiopharmaka ist schematisch in Abb. 4 dargestellt.

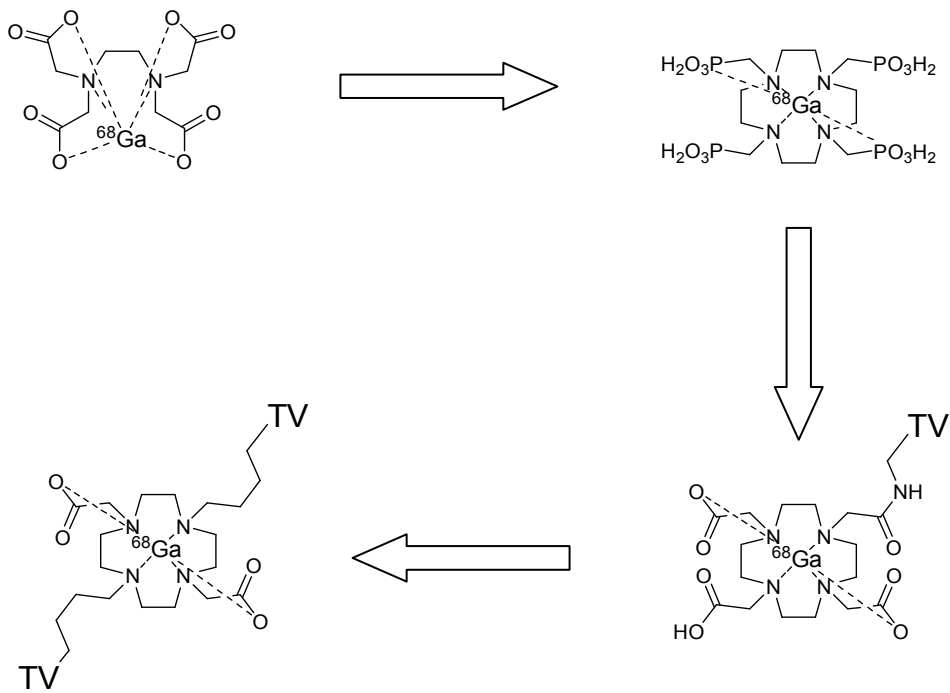


Abbildung 4: Entwicklung des Designs von ^{68}Ga -Radiopharmaka

1.5 Bifunktionelle Chelatoren

In stabilen Komplexen ist Gallium meist oktaedrisch koordiniert. Zum Komplexieren werden hauptsächlich Chelatoren basierend auf makrozyklischen Polyaminen, wie 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan (Cyclen) und 1,4,7-Triazacyclononan, verwendet. Die bekanntesten sind 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraacetat (DOTA)²³ und 1,4,7-Triazacyclononan-1,4,7-triacetat (NOTA)²⁴, sowie ihre Derivate.

Da DOTA acht Koordinationstellen besitzt, von denen jedoch nur sechs für die Komplexbildung benötigt werden, ist es möglich, auf eine oder sogar zwei Donor-Funktionen zu verzichten. Die dabei entstehenden Verbindungen sind 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7-triacetat (DO3A) und 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,7-diacetat (DO2A).

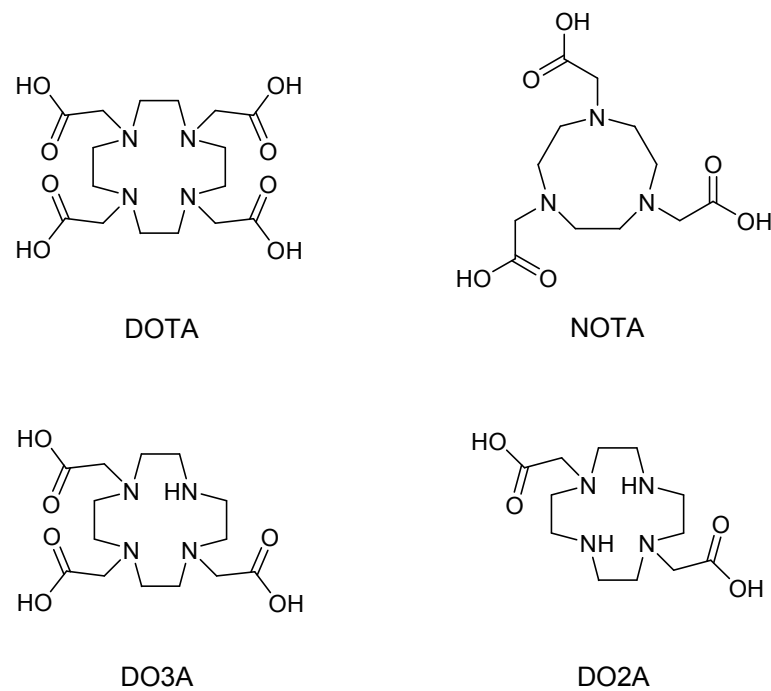


Abbildung 5: Verschiedene Chelatoren

Neben der Möglichkeit, eine der Acetat-Gruppen zur Bildung einer Amidbindung zu nutzen (DOTA) oder einen der freien Ringstickstoffe (DO2A/DO3A) mittels einer nukleophilen Substitution zu funktionalisieren, gibt es die Möglichkeit, orthogonale, kopplungsfähige funktionelle Gruppen einzuführen. Diese können anstatt einer Acetatgruppe in das Molekül eingebracht werden, seitenkettenverzweigt von einer der Acetatgruppen ausgehen oder an das Rückgrat des Makrozyklus gebunden sein. Bekannte funktionelle Gruppen sind primäre Amine, Halogene und andere kopplungsfähige Gruppen wie z.B. Tosylate, Isothiocyanate, Maleimid und phenolische Hydroxygruppen. Einige Beispiele sind in Abbildung 6 dargestellt.

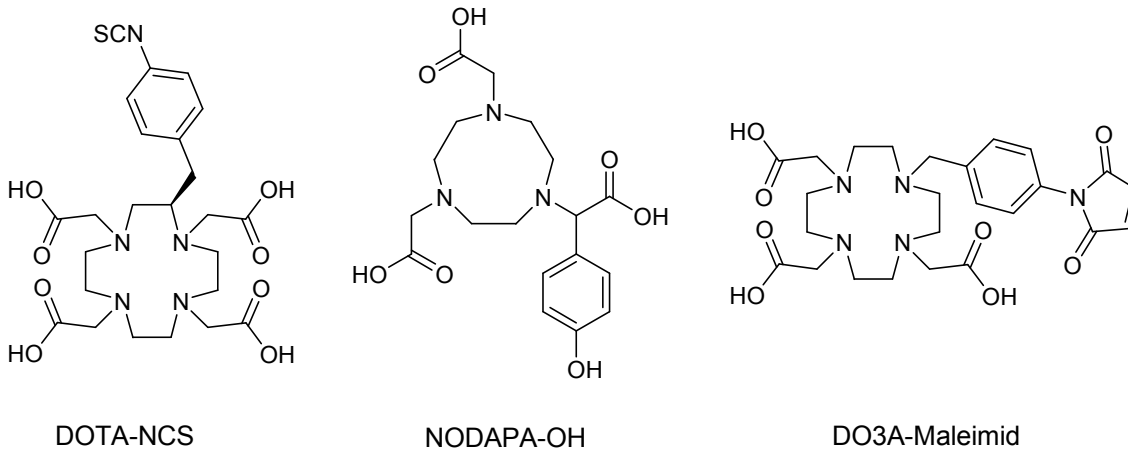


Abbildung 6: Verschieden funktionalisierte BFC

Eine weitere Variationsmöglichkeit stellt die Verwendung von anderen Donorfunktionen als den Acetat-Gruppen dar. So sind beispielsweise auch Phosphate, Phosphinate, Phenole oder Thiole bereits etabliert. Die Verwendung dieser Donorfunktionen kann Vorteile mit sich bringen. So lassen sich Phosphinate auch im stark sauren markieren oder sind Thiole weitaus lipophiler als die Acetat-Gruppen^{25,26}. Meistens werden jedoch die Acetat-Gruppen verwendet, da sie synthetisch leicht zugänglich sind und keine unerwünschten Nebenreaktionen, wie z. B. die Bildung von Disulfidbrücken bei Thiolen, auftreten.

Ein neuer Trend im Design von ⁶⁸Ga-Radiopharmaka sind, wie bereits erwähnt, bifunktionelle Chelatoren, die die Möglichkeit bieten, zwei oder mehr Targeting Vektoren an einen Chelator zu koppeln. Es wurde am Beispiel von ⁶⁴Cu-markierten divalenten RGD-Peptiden gezeigt, dass durch dieses „multivalency“-Konzept höhere Rezeptor-Affinitäten erreicht werden²⁷. Um dieses Konzept verwirklichen zu können, müssen BFC verfügbar sein, die es ermöglichen, zwei Targeting Vektoren anzubringen. Diese sind derzeit bei den kommerziellen Anbietern nicht erhältlich. In Abschnitt 2.1 wird eine synthetisch leicht zugängliche Route beschrieben, geeignete, verschieden funktionalisierte, bivalente Chelatoren schnell und im multi-Gramm-Maßstab herzustellen.

1.6 Biologische Targets

Wie bereits erwähnt spielt die Wahl eines geeigneten biologischen Targets eine entscheidende Rolle bei der Planung neuer Radiopharmaka. In dieser Arbeit wurden als Targets zum einen Aminosäuretransporter, zum anderen die β -Zellen der Langerhans'schen Inseln im Pankreas gewählt. Die daraus abgeleiteten TV sind Aminosäuren bzw. Sulfonylharnstoff-Liganden. Nähere Erläuterungen zu den Targets, den entsprechenden TV und bereits etablierten PET-Tracern finden sich in den folgenden Abschnitten.

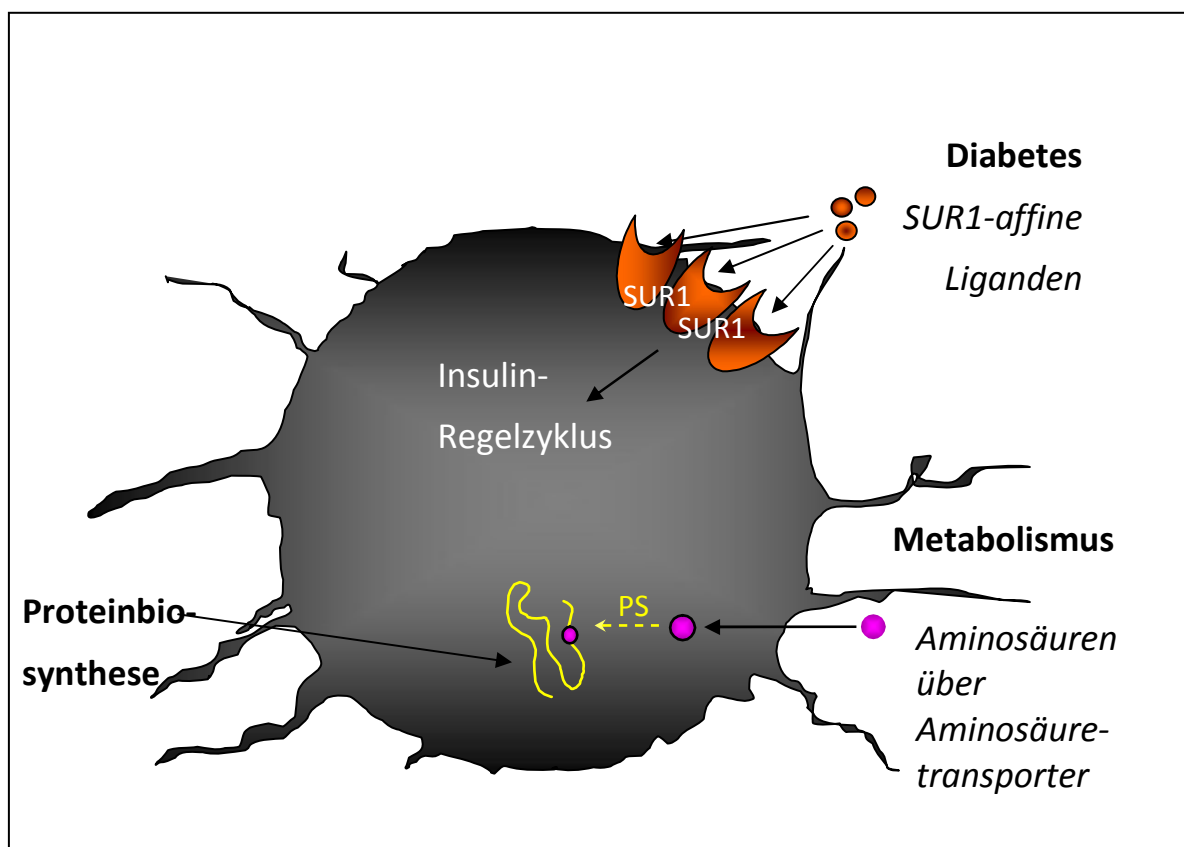


Abbildung 7: biologische Targets in dieser Arbeit: Sulfonylharnstoff-Liganden zur Quantifizierung der β -Zell-Masse bei Diabetes Mellitus Typ sowie Aminosäuretransporter und Proteinsyntheserate für Tumor-bezogene Diagnostik

1.6.1 Aminosäuren

Aminosäuren sind für Lebewesen von großer Bedeutung, da sie die elementaren Strukturuntereinheiten für Proteine bilden und an zahlreichen anderen Zellfunktionen beteiligt sind. Der Gedanke, Aminosäuren als Targeting Vektoren zu verwenden, um schnell proliferierende Tumore mittels PET abzubilden, ist nicht neu²⁸. Der Aminosäurestoffwechsel bietet mehrere Möglichkeiten für einen geeigneten PET-Tracer. Eine ist, die durch das schnelle Wachstum des Tumors stark erhöhte Proteinsyntheserate zu visualisieren. Hierfür geeignete Aminosäuren müssen allerdings idealerweise noch in Proteine eingebaut werden. Ein zweiter Ansatzpunkt ist die Aktivität der Aminosäuretransporter. Da Tumorzellen eine erhöhte Proteinsyntheserate besitzen, benötigen sie intrazellulär auch mehr Aminosäuren. Für dieses Konzept genügt es, wenn der Tracer über einen Aminosäuretransporter in die Zelle transportiert wird, ein Einbau in Proteine ist nicht mehr nötig. Man geht sogar davon aus, dass schon allein die Bindung an den Aminosäuretransporter ausreicht, um Tumore visualisieren zu können. Dies ist der Fall, da Tumore aufgrund des stark erhöhten Aminosäurebedarfs Aminosäuretransporter überexprimieren²⁹.

Aminosäuretracer werden vor allem in der Diagnostik von Glioblastomen angewendet, da das Gehirn einen sehr niedrigen Aminosäurestoffwechsel besitzt und so ein sehr guter Kontrast zwischen schnell wachsendem Tumor und normalem Hirngewebe erzielt werden kann.

Der erste Ansatz eines Aminosäure-PET-Tracers war das ¹¹C-markierte Methionin. Methionin wurde sowohl in der Seitenkette als auch an der Carbonsäurefunktion der Aminosäure markiert. Es zeigte sich allerdings, dass das Seitenketten-markierte Derivat L-[Methyl-¹¹C]Methionin (MET) dem L-[1-¹¹C]Methionin überlegen war, da ein großer Teil der Carbonsäuren decarboxyliert wurde und so als Metabolit [¹¹C]CO₂ entstand, das die Zelle wieder verlassen konnte und so für einen hohen Untergrund sorgte^{30,31}. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von ¹¹C war die Anwendung von MET allerdings auf Zyklotronstandorte beschränkt. Desweiteren wird für die Messung der Proteinsyntheserate eine Messzeit von 30 – 60 Minuten benötigt, was im Hinblick auf einen ¹¹C-markierten Tracer grenzwertig erscheint. Aufgrund der – in klinischer Hinsicht - eingeschränkten Verfügbarkeit von ¹¹C und um längere Prozesse darstellen zu können, wurde das L-2-[¹⁸F]-Fluortyrosin synthetisiert³². Dieser Tracer wird trotz der Substitution eines Wasserstoffatoms durch ¹⁸F in Proteine

eingebaut. Problematisch ist allerdings seine geringe radiochemische Ausbeute von nur 17 % und die Tatsache, dass er nur über eine elektrophile Fluorierung zugänglich ist.

Der nächste Schritt in der Entwicklung war daher die Synthese von [^{18}F]Fluorethyl-L-Tyrosin (FET). Dieser Tracer kann mittels nukleophiler Fluorierung über die prosthetische Gruppe 2- ^{18}F Fluorethyltosylat erhalten werden³³. So konnte die Ausbeute auf zunächst 40%, später, in einer verbesserten Methode, sogar auf 60% gesteigert werden³⁴.

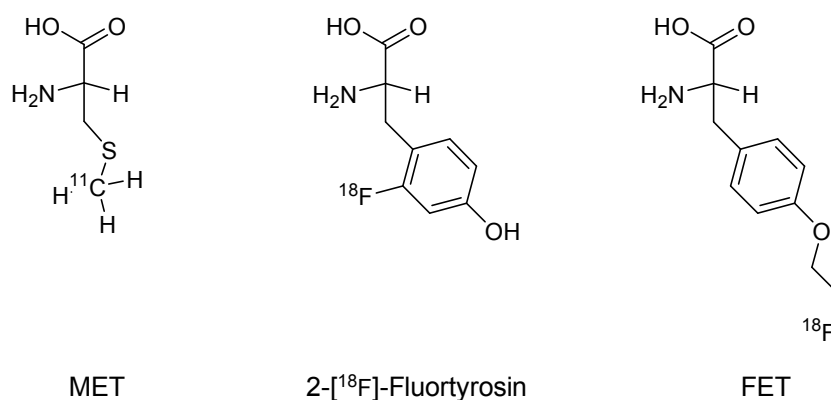


Abbildung 8: Aminosäure-Tracer für die PET

FET wird nicht mehr in Proteine eingebaut. In einer vergleichenden Studie mit MET konnte allerdings gezeigt werden, dass ein sehr enger Zusammenhang zwischen der Aufnahme über Aminosäuretransporter und der Proteinsyntheserate besteht³⁵. Ein weiterer Beweis dieser These wurde mit künstlichen, nicht proteinogenen Aminosäuren, wie 2-Amino-4- ^{18}F fluor-2-methylbutansäure (FMAB), 2-Amino-4- ^{18}F fluor-2-methylpropansäure (FMAP) oder 1-Amino-3- ^{18}F fluorocyclobutan-1-carbonsäure (FACBC) geführt (siehe Abbildung 9)³⁶. Mittels dieser Derivate war eine Visualisierung von Tumoren mittels der Messung der Aminosäuretransporteraktivität in nur 20 Minuten möglich.

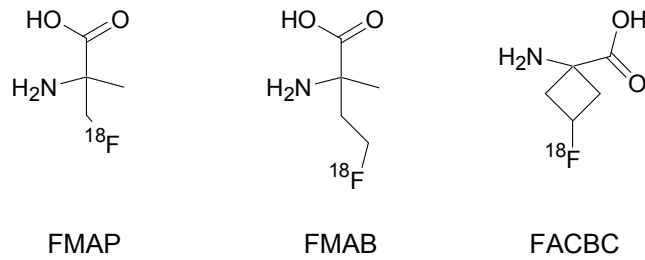


Abbildung 9: Künstliche Aminosäuren als Tracer für die PET

Aminosäuretransporter zeigen also eine relativ hohe Toleranz, was strukturelle Veränderungen an den Seitenketten der Aminosäuren betrifft. Aminosäuren könnten daher auch ein geeigneter TV sein, um sie mit einem BFC zu koppeln und anschließend mit ^{68}Ga zu markieren. Dies würde die sehr guten Targeting-Eigenschaften der Aminosäuren mit der hervorragenden Verfügbarkeit von ^{68}Ga über den $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generator kombinieren. Für die molekulare Diagnostik von (Hirn-)Tumoren wäre damit ein Tool verfügbar, das sich sehr leicht und in hohen Ausbeuten markieren und sich, aufgrund der Verfügbarkeit des Radionuklids über einen Generator, überall, auch abseits von Zyklotronstandorten, anwenden lässt³⁷. Ein weiterer Gewinn wären die deutlich gesenkten Kosten verglichen mit den derzeit verwendeten ^{11}C - bzw. ^{18}F -markierten Aminosäuren. Einen potentiellen Ansatz und erste Evaluierungen zu einem möglichen Tracer finden sich in Abschnitten 2.2 und 2.3.

1.6.2 β -Zell-Tracer zur Diagnostik des Diabetes Mellitus Typ 1

Diabetes mellitus (DM) ist eine in den letzten Jahren kontinuierlich zunehmende Stoffwechselerkrankung, bedingt durch einen relativen oder absoluten Insulinmangel. Man unterscheidet in DM Typ 1 und DM Typ 2. Typ 1 beschreibt hierbei eine Autoimmunerkrankung, bei der im Laufe der Zeit alle Insulin-produzierenden β -Zellen des Pankreas zerstört werden. Dies führt zu einem absoluten Insulinmangel und Patienten benötigen eine lebenslange Insulintherapie. Bei DM Typ 2 handelt es sich nicht um eine Autoimmunerkrankung, sondern um einen durch Insulinresistenz oder Hyperinsulinismus ausgelösten relativen Insulinmangel. Mit ungefähr 85% der Betroffenen ist DM Typ 2 die bei weitem häufiger auftretende Form.

Ein großes Problem bei DM Typ 1 ist, dass klinische Symptome erst dann auftreten, wenn schon ungefähr 90% der β -Zellen im Pankreas zerstört sind. Außerdem steht bisher mit dem intravenösen oralen Glukosetoleranztest nur eine relativ ungenaue diagnostische Methode zur Verfügung³⁸, die außerdem nur eine geringe Sensitivität aufweist. Eine nicht-invasive Nachweismethode der β -Zell-Masse mittels PET/CT hätte nicht nur den Vorteil einer besseren und früheren Diagnostik, sondern böte auch die Möglichkeit, die Transplantation von β -Zellen nachzuverfolgen.

Die PET bietet die Möglichkeit, die β -Zell-Masse *in vivo* zu quantifizieren. Ein mögliches biologisches Target hierzu ist der Sulfonylharnstoffrezeptor 1 (SUR1), der auf den β -Zellen exprimiert wird. Zu diesem Zweck wurden bisher schon verschiedene, auf insulinotropen Antidiabetika basierende SUR1-affine, ^{11}C - und ^{18}F -markierte PET-Tracer entwickelt.

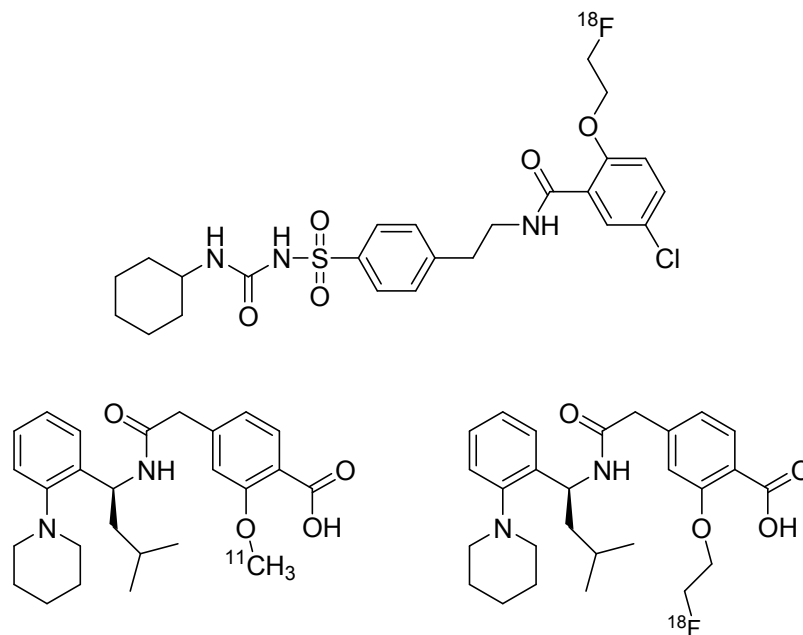


Abbildung 10: Strukturformeln des ^{18}F -markierten Glibenclamid- und der ^{11}C - und ^{18}F -markierten Repaglinid-Derivate

Der erste Ansatz war, ein ^{18}F -markiertes Glibenclamid-Derivat zu synthetisieren³⁹. Dazu wurde die Toleranz des SUR1-Rezeptors gegen strukturelle Veränderungen am Phenolring untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass sowohl eine strukturelle Modifikation an der phenolischen Hydroxygruppe als auch ein Halogenaustausch am Ring, vom Rezeptor toleriert werden. Anschließend wurde über die prosthetische Gruppe 2-[^{18}F]Fluorethyltosylat ein

[¹⁸F]fluorethylisiertes Glibenclamid-Derivat synthetisiert und evaluiert. Ein weiterer Ansatz war die Verwendung von Repaglinid, einem Derivat der dritten Generation dieser Klasse an Pharmazeutika. Diese „dritte Generation“ wird dadurch charakterisiert, dass die Derivate noch eine hohe Affinität zum SUR1-Rezeptor aufweisen, obwohl sie keine Sulfonylharnstoffgruppe mehr enthalten. Repaglinid besitzt zwar eine niedrigere Affinität zum SUR1 als Glibenclamid, dafür aber ein besseres SUR1/SUR2-Verhältnis. Repaglinid wurde daher mit ¹¹C- und ¹⁸F-markiert^{40,41}. Allerdings zeigten die Evaluierungen, dass weder das Glibenclamid- noch die Repaglinid-Derivate für eine Visualisierung der β -Zellen geeignet waren⁴². Das Hauptproblem dieser Verbindungen war – u. a. aufgrund hoher Lipophilie - die hohe Aufnahme in die Leber.

Einen weiteren, sehr interessanten Ansatz stellt ein divalentes Nateglinid-Derivat dar. Dabei wurden zwei Nateglinid-Einheiten an DTPA gekoppelt und mit ^{99m}Tc markiert. Nateglinid, ebenfalls ein Derivat der 3. Generation, besitzt zwar eine, verglichen mit Glibenclamid und Repaglinid, niedrige Affinität zum SUR1, dafür aber eine sehr schnelle Pharmakokinetik und „Blood Clearance“, was sich positiv auf das Signal zu Hintergrund Verhältnis auswirken sollte. Außerdem wurde versucht, die niedrigere Affinität durch das Einbringen von zwei Nateglinid-Molekülen auf einen Chelator für ^{99m}Tc zu kompensieren, da das multivalency-Konzept oft einen positiven Einfluss auf Affinitäten zeigt. Dieses Derivat zeigte in ersten Versuchen vielversprechende Ergebnisse (Abb. 9)⁴³.

Allerdings ist es mit SPECT nicht möglich, die β -Zell-Masse wirklich zu quantifizieren. Daher ist es ein vielversprechender Ansatz, dieses Konzept von zwei SUR1-affinen Targeting Vektoren gekoppelt an einen bifunktionellen Chelator auf ⁶⁸Ga zu übertragen. Das hätte außerdem noch den Vorteil, dass die Lipophilie drastisch verringert und so die Leberaufnahme eventuell gesenkt werden könnte. Die Synthesen von SUR1-affinen, DO2A-konjugierten Derivaten werden in Abschnitt 2.4 genauer beschrieben.

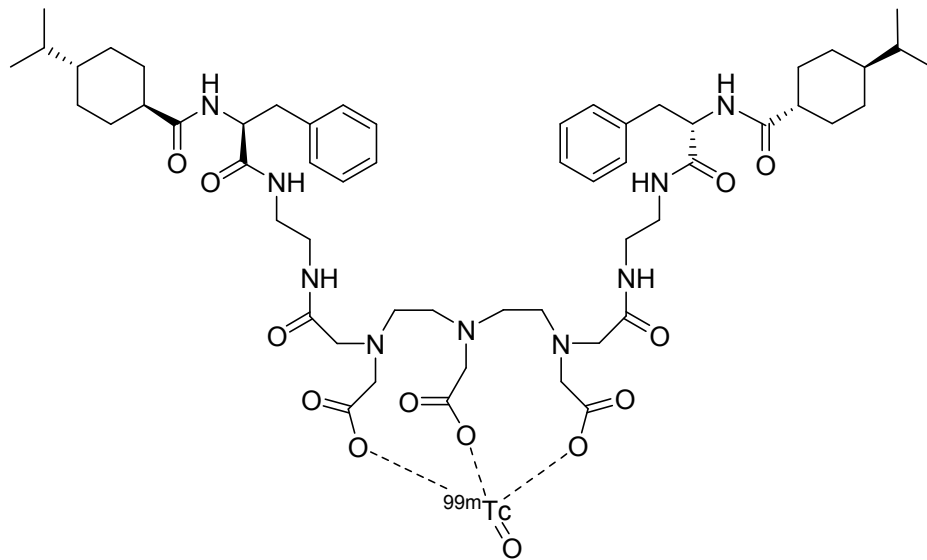


Abbildung 11: ^{99m}Tc -DTPA-(Nateglinid)₂

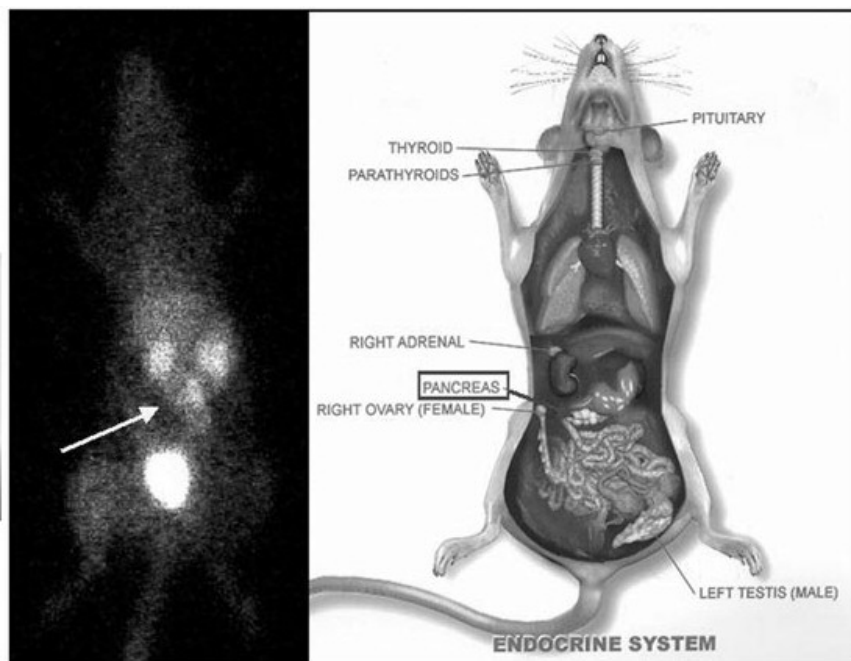


Abbildung 12: Gammaspektroskopische Visualisierung des Pankreas mittels ^{99m}Tc -DTPA-(Nateglinid)₂

1.7 ⁶⁸Ga-Markierungen

1.7.1 „Post-Processing“

Der ideale pH-Bereich für eine Markierungsreaktion mit ⁶⁸Ga ist zwischen 2,5 und 4. Der pH-Wert sollte nicht unter 2 liegen, da die komplexierenden Donor-Funktionen der Chelatoren deprotoniert sein müssen. Außerdem sollte er einen Wert von 4,5 nicht überschreiten, da sich sonst schwerlösliches Gallium-Hydroxid bildet, das nicht mehr an Komplexierungsreaktionen teilnimmt⁴⁴.

Der ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga-Radionuklidgenerator wird in der Regel mit 7-10 mL 0,1 M HCl eluiert. Dieses Volumen ist für Markierungsreaktionen zu groß und der pH-Wert ist deutlich zu niedrig. Ein weiteres Problem für die ⁶⁸Ga-Markierung ist die Kontamination des Generator-Eluats mit zahlreichen anderen Metallen, die während der Markierung mit den Gallium-Ionen konkurrieren würden. Hier ist vor allem das Mutternuklid ⁶⁸Ge zu nennen, da bereits eine Verunreinigung von 0,01% ⁶⁸Ge im Hinblick auf eine medizinische Anwendung und die lange Halbwertszeit grenzwertig erscheint. Diese Menge ist aber als Durchbruch in jeder Elution des Generators enthalten. Außerdem sind im Eluat Zink-, als Zerfallsprodukt von ⁶⁸Ga, sowie Titanionen aus der Matrix enthalten. Ein weiteres Problem stellen Eisenionen aus dem Herstellungs- und Transportprozess der Salzsäure und anderer Chemikalien dar.

Um das Volumen-, pH-Wert- und Verunreinigungsproblem zu lösen, wird ein sog. „post-processing“ des Generatoreluats benötigt. Dazu gibt es momentan drei anerkannte Methoden, die fraktionierte Elution des Generators, die Aufreinigung über einen Anionenaustauscher, sowie die Aufreinigung über einen Kationenaustauscher.

Bei der fraktionierten Elution wird das unterschiedliche Elutionsprofil von Gallium und Germanium ausgenutzt⁴⁵. Der Generator wird in kleinen Fraktionen von 0,25 mL eluiert und jede Fraktion wird im Curiemeter vermessen. Um auch das Volumen möglichst klein zu halten, werden nur die Hauptfraktionen des ⁶⁸Ga für die anschließende Markierung verwendet. Mit dieser Methode kann das Volumen auf 1 mL verkleinert und ein Großteil des ⁶⁸Ge-Durchbruchs abgetrennt werden.

Die Aufreinigung über einen Anionenaustauscher erfolgt nach der Elution des Generators⁴⁶. Das vom Generator eluierte GaCl₃ wird mittels 5,5 M HCl in das GaCl₄⁻ Anion überführt und auf einem Anionenaustauscher fixiert. Anschließend wird das ⁶⁸Ga mit Wasser vom

Anionenaustauscher eluiert und kann für Markierungen verwendet werden. Problem ist hier die fehlende Aufreinigung von Eisenionen, die ein ähnliches Adsorptionsverhalten zeigen.

Die dritte Methode ist die Aufreinigung über einen Kationenaustauscher⁴⁷. Das Generatoreluat wird über einen stark sauren Kationenaustauscher, bestehend aus einem quervernetzten Polystyrol-Harz (Bio-Rad AG 50W-X8), gegeben. Auf diesem Kationenaustauscher wird das ⁶⁸Ga, nicht aber das ⁶⁸Ge adsorbiert, wodurch die radiochemische ⁶⁸Ge-Kontamination auf weniger als 10⁸ % verringert wird. Die übrigen metallischen Kontaminationen werden durch 1 mL einer Mischung von 80% Aceton und 20% 0,15 M HCl vom Kationenaustauscher eluiert, während das ⁶⁸Ga vollständig auf dem Kationenaustauscher verbleibt. Das ⁶⁸Ga wird dann mit 400 µL einer weiteren Aceton/HCl-Mischung (97,6% Aceton/2,4% 0,05 M HCl) vom Kationenaustauscher eluiert. Mit Hilfe dieses „post-processings“ kann in weniger als fünf Minuten trägerfreies (no-carrier-added) ⁶⁸Ga in einem sehr kleinen Volumen erhalten und direkt zur Markierung eingesetzt werden. Eine weitere Möglichkeit, die der Einsatz der Kationenaustauscher-basierenden Aufreinigung bietet, ist, das auf dem Kationenaustauscher fixierte und bereits durch das erste Aceton-Salzsäure-Gemisch von Fremdionen gereinigte, ⁶⁸Ga, mittels Acetylacetonat zu eluieren. In diesem Prozess wird [⁶⁸Ga]Ga(acetylacetonat)₃ gebildet, welches zur Markierung in nicht-wässrigen Systemen eingesetzt werden kann⁴⁸.

1.7.2 Klassische Radiomarkierungen und Stabilitätsuntersuchungen

Ziel der Markierungsreaktionen ist es, das Generator-produzierte ⁶⁸Ga so schnell wie möglich quantitativ durch den Chelator des Markierungsvorläufers zu komplexieren. Dazu wird in der Regel ein großer Überschuss an Markierungsvorläufer (etwa 1000fach) verwendet. 100 MBq ⁶⁸Ga entsprechen etwa 10 pM. Die eingesetzten Mengen an Markierungsvorläufer liegen im niedrigen nanomolaren Bereich.

Eine entscheidende Rolle bei den ⁶⁸Ga-Markierungen spielt der pH-Wert. Wie bereits in Abschnitt 1.7.1 erwähnt, gibt es nur einen kleinen Bereich (2,5 – 4), in dem die Markierungsreaktionen ablaufen können. Um den pH-Wert bei den Markierungsreaktionen in diesem Bereich zu halten, müssen je nach Art des post-processing unterschiedliche Strategien angewendet werden. Sowohl beim Anionenaustauscher-basierenden System, als

auch bei der fraktionierenden Elution, ist der Einsatz eines Puffersystems unumgänglich. Hier werden meistens Acetat- oder Hydroxyethylpiperazinethylsulfonsäure (HEPES)-Puffer eingesetzt. Genauere Untersuchungen über den Einfluss von HEPES auf die ^{68}Ga -Markierungen sind in Abschnitt 2.6 dargestellt. Im Gegensatz zu den beiden anderen Arten ist es mit dem Kationenaustauscher-basierenden post-processing möglich, auf den Einsatz von Puffer zu verzichten. Hier kann der pH-Wert durch die Wahl geeigneter Mengen der Aceton/HCl-Mischung, mit der das ^{68}Ga vom Kationenaustauscher eluiert wird, und Millipore Wasser zwischen 2,3 und 3,4 eingestellt werden.

Um die Markierungsreaktion zu beschleunigen und um hohe Ausbeuten zu gewährleisten, müssen die Markierungen in der Regel bei höheren Temperaturen durchgeführt werden. Im Fall der 12-gliedrigen Makrozyklen (DOTA und Analoga) sind Temperaturen von bis zu 100 °C nötig, um gute Ausbeuten zu erzielen. Ein weiterer interessanter Aspekt bei den Markierungsreaktionen mit makrozyklischen Chelatliganden ist, dass normalerweise zunächst ein weniger stabiler „outer-sphere“-Komplex gebildet wird, bei dem das Radiometall zwar schon komplexiert wird, es sich aber noch nicht im Kern des Makrozyklus befindet. Um es in die stabile Konformation („inner-sphere“-Komplex) zu zwingen, sind, besonders im Fall der 12-gliedrigen Makrozyklen, hohe Temperaturen nötig. Bei den 9-gliedrigen Makrozyklen (NOTA und Analoga) reichen für die Markierung bereits deutlich niedrigere Temperaturen aus⁴⁹.

Um die Ausbeuten einer Radiomarkierung zu bestimmen, stehen im Allgemeinen zwei Methoden zur Verfügung. Die eine ist die analytische HPLC, die andere die Radio-Dünnschichtchromatographie (DC). Bei der Verwendung der DC ist anzumerken, dass man immer zwei unterschiedliche Laufmittel testen sollte, um mögliche Überlagerungen auszuschließen. Die Ausbeute wird dann als Anteil des gebildeten Produkts von der Gesamtaktivität angegeben.

Nach der erfolgreichen Radiomarkierung muss noch die Stabilität der gebildeten Komplexe überprüft werden. Dies ist notwendig, da mit der Eisenbindungsstelle des Transferrins ein starker Konkurrenzchelator in lebenden Systemen vorhanden ist⁵⁰. Eine Transchelatierung *in vivo* würde einen sehr hohen Hintergrund bedingen und die Auswertung der Ergebnisse erheblich erschweren. Um die Stabilität des gebildeten Komplexes zu überprüfen, wird zu dem markierten Radiopharmakon ein großer Überschuss eines leicht markierbaren Chelators, wie z. B. DTPA, oder Transferrin gegeben. Anschließend wird, um die Bedingungen

in vivo zu simulieren, auf 37 °C erhitzt und das Radiopharmakon in gewissen Abständen mittels DC auf Transchelatierung untersucht. Die zu untersuchende Zeitspanne liegt hier bei 2 – 3 Stunden, da die Dauer einer PET-Untersuchung mit ^{68}Ga 90 Minuten selten überschreitet.

Die praktische Durchführung aller hier aufgeführten Punkte, einschließlich der im nächsten Abschnitt erläuterten Mikrowellen-gestützten Synthese, werden in Abschnitt 2.5 exemplarisch an einem neuen, vielversprechenden ^{68}Ga -Radiopharmakon untersucht.

1.7.3 Mikrowellen-gestützte Radiosynthese

Eine neue Möglichkeit der Radiomarkierung bietet der Einsatz einer Labormikrowelle. Dank der positiven Überlagerung aller eingestrahlten Mikrowellen im Reaktionsbereich,

ist es mit dieser möglich, der Reaktion sehr große Energiemengen in sehr kurzer Zeit zuzuführen und so die Reaktion erheblich zu beschleunigen. Außerdem ist es möglich, die Reaktion dank eines Druckaufsatzes deutlich über den Siedepunkt des Lösungsmittels hinaus zu erhitzen. So können oft höhere Ausbeuten in kürzerer Zeit erzielt werden⁵¹. Allerdings kann es bei zu hohen Temperaturen über einen längeren Zeitraum auch zu Zersetzungsreaktionen des Markierungsvorläufers kommen.

Die Labormikrowelle kann in zwei verschiedenen Modi betrieben werden. Im „Run-Hold“-Modus wird das Reaktionsgemisch auf eine ausgewählte Temperatur erhitzt und für die eingestellte Zeitdauer bei dieser Temperatur gehalten. Im „Power-Time“-Modus wird für eine ausgewählte Zeitdauer mit einer eingestellten Energie eingestrahlt. Nach Beendigung der Reaktion wird das Reaktionsgefäß durch einen angelegten Luftstrom sehr schnell wieder abgekühlt.

Mit der Mikrowellen-gestützten Markierung ist es, wie in Abschnitt 2.5 beschrieben, im Falle der DO2A-basierenden Radiopharmaka gelungen, die Markierungsreaktionen zu beschleunigen und die Ausbeuten zu erhöhen.

1.7.4 Aufreinigung der markierten Substanzen

Bei der Aufreinigung der ^{68}Ga -markierten Substanzen sind grundsätzlich zwei Problematiken zu unterscheiden. Dies sind zum einen die Abtrennung des nicht komplexierten ^{68}Ga , das bei einer PET-Untersuchung an Transferrin binden und so einen hohen Hintergrund verursachen würde und zum anderen die Abtrennung des Überschusses an eingesetztem Markierungsvorläufer. Dies spielt eine entscheidende Rolle, da der nicht-markierte Vorläufer die biologischen Targets im Körper absättigt und somit die Ergebnisse der molekularen Bildgebung verfälscht. Besonders drastisch ist dieser Effekt bei Versuchen an Mäusen, da diese aufgrund ihrer geringen Größe deutlich weniger Bindungsstellen besitzen als beispielsweise Menschen.

Es gibt zwei mögliche Methoden zur Aufreinigung, High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC) oder Festphasenextraktionskartuschen. Mittels HPLC kann das nicht umgesetzte ^{68}Ga leicht vom markierten Produkt abgetrennt werden, da es als metallisches Kation sehr viel kürzere Retentionszeiten besitzt als die meisten Radiopharmaka. Auch die Abtrennung der Markierungsvorläufer gelingt bei kleineren Molekülen oft sehr gut, da die Unterschiede zwischen markiertem und nicht-markiertem Produkt so groß sind, dass sie eine Trennung erlauben. Bei größeren Targeting Vektoren, z. B. in DOTATOC, einem Somatostatin-analogen, DOTA-konjugierten Oktapeptid mit sehr hoher Affinität zum Somatostatin-Rezeptor, das, markiert mit ^{68}Ga , vor allem zur Diagnostik neuroendokriner Tumore eingesetzt wird, wird das Retentionsverhalten allerdings so stark vom Peptid beeinflusst, dass keine Trennung möglich ist.

Auch mittels Festphasenextraktionskartuschen ist eine Abtrennung der Radiopharmaka von nicht umgesetztem ^{68}Ga leicht zu realisieren. Hierzu werden entweder starke Kationenaustauscherkartuschen (SCX) oder organische Umkehrphasenkartuschen (C18) verwendet. Im Fall der SCX-Kartuschen wird das $^{68}\text{Ga(III)}$ auf der Kartusche adsorbiert, während das Produkt die Kartusche passiert oder leicht eluiert werden kann. Bei den C18-Kartuschen verhält es sich umgekehrt. Das Produkt wird auf der Kartusche fixiert, nicht markiertes ^{68}Ga wird nicht zurückgehalten.

Der Vorteil der Kartuschenabtrennung gegenüber der HPLC-Aufreinigung ist neben den geringeren Kosten auch die hohe Zeitersparnis. Wie es mittels dieser Methode auch möglich

ist, den nicht umgesetzten Vorläufer vom markierten Produkt zu trennen und so sehr hohe spezifische Aktivitäten zu ermöglichen, wird in Abschnitt 2.7 beschrieben.

1.8 Evaluierung der ^{68}Ga -Radiopharmaka

Nach der Vorläufersynthese und der Radiomarkierung stellt die biologische Evaluierung eines potentiellen Radiopharmakons eine weitere Herausforderung dar. Man kann diese in *in vitro*- und *in vivo*-Evaluierungen unterscheiden.

1.8.1 *In vitro*-Evaluierung

Normalerweise werden in der biologischen Evaluierung zunächst *in vitro*-Versuche durchgeführt. Diese Ergebnisse sind sehr wichtig, um aus einer großen Menge synthetisierter TV die vielversprechendsten herauszufiltern und diese dann später *in vivo* weiter zu evaluieren. Ohne dieses vorherige Screening würde die Anzahl der Tierstudien für die Entwicklung neuer Radiopharmaka eine unverantwortlich hohe Zahl annehmen und immense Kosten verursachen.

Unter die *in vitro*-Evaluierungen fallen auch Bestimmungen der Lipophilien. Die Bestimmung des LogD-Werts kann schon erste Hinweise über das spätere Verhalten des Tracers *in vivo* geben. Tracer mit hoher Lipophilie reichern sich häufig in der Leber an, während Tracer mit sehr niedriger Lipophilie oft renal ausgeschieden werden. Besonders wichtig ist die Bestimmung der Lipophilie im Hinblick auf Neurotracer für die PET, da Tracer mit einem LogD zwischen 1,5 und 2,5 eine relativ hohe Wahrscheinlichkeit besitzen die Blut-Hirn-Schranke zu passieren⁵².

Die Bestimmung der Lipophilien kann über zwei Methoden erfolgen. Eine Möglichkeit besteht in einer HPLC-Methode, bei der man die Retentionszeiten verschiedener Substanzen mit bekannter Lipophilie in einem Puffer/Methanol-System (0,01 M Sörensen Puffer pH 7,4/MeOH: 25/75) auf einer C18-Säule bestimmt und aus ihnen eine Standardgerade ermittelt⁵³. Die Retentionszeiten neuer Substanzen können dann gemessen und durch Ablesen aus der Standardgerade die LogD-Werte erhalten werden. Die zweite Möglichkeit

Einleitung

besteht in der Bestimmung des Partitionskoeffizienten der zu untersuchenden Verbindung in Wasser/Octanol⁵⁴. Dies ist vor allem bei der Anwendung mit Radiopharmaka eine gute Alternative, da die Verteilung leicht über die Aktivitätsverteilung zu messen ist. Allerdings weisen beide Methoden relativ hohe Fehler auf und die ermittelten Werte sind nur als Anhaltspunkt zu betrachten.

Ein nächster wichtiger Punkt ist die Durchführung von Zellstudien. Zellen, die das jeweilige biologische Target exprimieren sind sehr gut geeignet, um potentielle Radiopharmaka miteinander zu vergleichen. So kann beispielsweise die Aufnahme von ⁶⁸Ga-markierten Aminosäuren in Glioblastomzellen untersucht werden, da diese schnell wachsenden Zellen auf jeden Fall eine große Anzahl Aminosäuretransporter ausbilden. Diese Zellversuche haben allerdings das Problem, dass auf Zellen eine Vielzahl von Transportern und Rezeptoren exprimiert werden und man bei einer eventuellen Aufnahme keine Rückschlüsse darüber ziehen kann, über welchen oder welche Transporter die Aufnahme erfolgt. Darüber hinaus muss bei jedem Zellversuch die unspezifische Aufnahme bestimmt werden. Dies geschieht normalerweise durch Messung der Aufnahme von Substanzen, die nicht an das Target binden sollten oder durch sog. Blockexperimente, bei denen die Aufnahme des Radiopharmakons durch Zugabe eines großen Überschusses einer nicht-radioaktiven, für das jeweilige Target selektiven Substanz, geblockt wird. Die bei diesem Versuch erhaltene Restaufnahme wird als unspezifische Bindung gedeutet.

Ein weiteres Problem sind die in jedem Labor unterschiedlichen Messprotokolle, die eine Vergleichbarkeit mit anderen Messergebnissen erschweren und dass in einem Labor oft nur einige wenige Zelllinien etabliert sind, so dass man bei der Untersuchung verschiedener Targets meistens auf verschiedene Kooperationspartner angewiesen ist.

Ein interessanter Ansatz ist das Klonieren eines einzelnen Aminosäuretransporters auf Eizellen (Oocyten) des Krallenfrosches *Xenopus laevis*. So kann die Aufnahme von ⁶⁸Ga-markierten Aminosäuren über diesen speziellen Aminosäuretransporter untersucht werden. Auf diesen Zellen können derzeit Lat1, Lat2, b^{0,+}AT, ATB^{0,+}, γ⁺Lat1 und γ⁺Lat2 exprimiert werden⁵⁵. Um die Bindung an den jeweiligen Transporter zu überprüfen, werden Konkurrenzstudien mit tritiierten Aminosäuren durchgeführt. Um zu beweisen, dass auch wirklich ein aktiver Transport in die Zelle stattfindet, können die Oocyten auch mit tritiierten Aminosäuren beladen und anschließend mit der kalten, zu untersuchenden Substanz inkubiert werden. Da die meisten Aminosäuretransporter Gegentransporter sind, kann über

die Menge der nach außen transportierten tritiierten Aminosäure ein Rückschluss über die Menge des in die Zelle aufgenommenen kalten Tracers gezogen werden. Um die Tauglichkeit dieses Systems zu überprüfen, wurden Kompetitions- und Transstimulationsexperimente mit [¹⁹F]FET durchgeführt. Die genauen experimentellen Bedingungen und Ergebnisse sind in Abschnitt 2.8 dargestellt.

1.8.2 *In vivo*-Evaluierung

In vivo-Evaluierungen werden in der Regel nur mit Verbindungen durchgeführt, die *in vitro* bereits vielversprechende Resultate zeigten. Hier sind besonders die Studien an Nagetieren, wie Mäusen oder Ratten, zu erwähnen. Diese Versuche werden an einem speziellen Kleintier-PET-Scanner durchgeführt, der eine besonders hohe Auflösung besitzt. Die Messungen können hierbei statisch oder dynamisch erfolgen. Bei der statischen Messung wird das Radiopharmakon injiziert und nach einem gewissen Zeitraum für die Anreicherung des Tracers wird das Tier betäubt und die Messung durchgeführt. Es wird also die Anreicherung des Radiopharmakons zu einem bestimmten Zeitpunkt gemessen. Bei der dynamischen Messung verbleibt das Tier während der gesamten Dauer der Untersuchung, von der Injektion bis zum Ende des PET-Scans, narkotisiert im PET-Scanner und es wird während der gesamten Zeitdauer gemessen. Aus diesen Messungen können anschließend Summenbilder über einen gewünschten Zeitraum, z. B. 0 – 10 Minuten oder 30 -45 Minuten, berechnet werden und daraus Aufschlüsse über die Anflutung und Ausscheidung des Radiopharmakons gewonnen werden. Die dynamischen Messungen werden immer nur für den Teil des Tieres, der gerade von Interesse ist durchgeführt. Bei Neurotracern wird beispielsweise das Hirn, bei Tumortracern der Tumor gemessen. Die Messung von größeren Abschnitten ist aufgrund der Datenflut unmöglich. Es kann allerdings im Anschluss an eine dynamische Messung noch ein kurzer Ganzkörperscan durchgeführt werden. Außerdem ist zu beachten, dass vor oder nach einem Scan immer eine Transmissionsmessung durchgeführt werden muss, um die entsprechenden Korrekturen durchführen zu können.

Als Beispiel werden die Ergebnisse der im Verlauf dieser Arbeit durchgeführten Kleintierexperimente mit dem Tracer [⁶⁸Ga]Ga(butyl-L-Tyrosin)₂ im folgenden dargestellt.

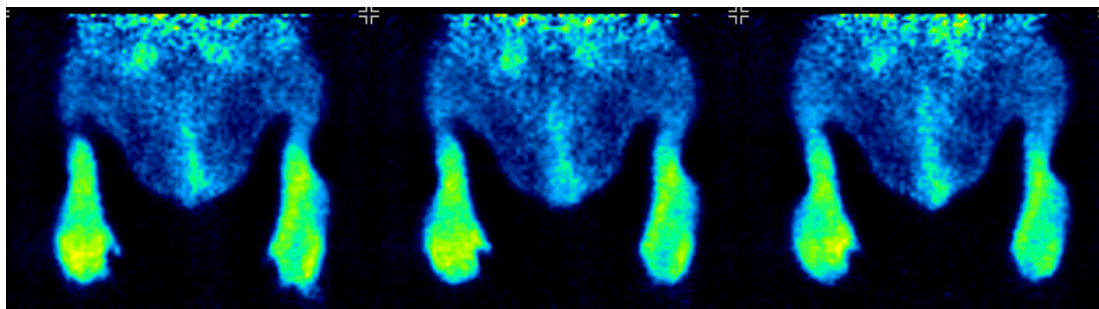


Abbildung 13: μ PET-Aufnahme mit [^{68}Ga]Ga-DO2A-(butyl-L-Tyrosin) $_2$

Das Tierexperiment wurde mit einer 217 g schweren Tumor-tragenden Kopenhagen-Ratte durchgeführt, der 17 Tage vor dem Experiment zwei AT1 Dunning Prostata Carcinome auf die Fußrücken implantiert wurden. Die beiden Tumore waren gut angewachsen und hatten jeweils einen Durchmesser von ungefähr 1 cm. Der Ratte wurden 20 MBq [^{68}Ga]Ga-DO2A-(butyl-L-Tyr) $_2$ injiziert, die Messzeit betrug 60 Minuten. Abbildung 13 zeigt die coronale Ansicht der PET-Aufnahmen der beiden Tumore. Man kann die beiden Tumore deutlich von Normalgewebe unterscheiden. Es hat also eine Anreicherung des ^{68}Ga -markierten DO2A-Bu-Tyr in den Tumoren stattgefunden.

¹ M. E. Phelps, *Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes*, Proc. Nat. Acad. Sci. 97, **2000**, 9226.

² G. de Hevesy, *Some applications of isotopic indicators*. Nobel Lecture, **1944**.

³ H.J. Ache, *Chemistry of the positron and of positronium*, Angew. Chemie, 11, **1972**, 179

⁴ H. Herzog, F. Rösch, *Chemie und Physik der Bildgebung: Pet- und SPECT-Technik*, Pharm. in unserer Zeit 34, **2005**, 468.

⁵ C. L. Melcher, *Scintillation Crystals for PET*, J. Nucl. Med. 41, **2000**, 1051.

⁶ Diplomarbeit Carsten Kroll, AK Rösch, 2007.

⁷ K. Serdons, A. Verbruggen, G. M. Bormans, *Developing new imaging probes for PET*, Methods 48, **2009**, 104.

⁸ a) S. M. Qaim, *Cyclotron production of medical radionuclides*, in: F. Rösch (Volume Editor), Handbook of Nuclear Chemistry – Volume 4: Radiochemistry and Radiopharmaceutical Chemistry in Life Science, 2003, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands; b) H. Lundquist, M. Lubberink, V. Tolmachev, *Positron emission tomography*, Eur. J. Phys. 19, **1998**, 537.

⁹ a) P. W. Millar, N. J. Long, R. Vilar, A. D. Gee, *Synthesis of ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O , and ^{13}N Radiolabels for Positron Emission Tomography*, Angew. Chem. Int. Ed. 47, **2008**, 8998; b) H. J. Wester, *^{18}F : Labeling chemistry and labelled compounds*, in: F. Rösch (Volume Editor), Handbook of Nuclear Chemistry – Volume 4: Radiochemistry and Radiopharmaceutical Chemistry in Life Science, 2003, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

¹⁰ M. Fellner, *^{68}Ga -Markierung und Evaluierung phosphonathaltiger Komplexligenanden zur Diagnostik von Knochenmetastasen mittels PET*, Diplomarbeit AK Rösch, **2007**

¹¹ www.IAEA.org

¹² a) P. S. Conti, J. S. Keppler, M. J. Halls, *Positron emission tomography: a financial and operational analysis*, Am. J. Roentgenol., 162, **1994**, 1279; b) T. Kuwert, P. Matheja, B. Vollet, G. Lottes, M. Schäfers, O. Schober, *Positronen-emissionstomographie: Kosten-Nutzen-Gesichtspunkte*, Der Radiologe, 36, **1996**, 337.

¹³ a) G. Bandoli, A. Dolmella, F. Disato, M. Porchia, F. Refosco, *Mononuclear six-coordinated Ga(III)-complexes: A comprehensive survey*, Coord. Chem. Rev. 253, **2009**, 56; b) T. J. Wadas, E. H. Wong, G. R. Weisman, C. J.

Anderson, *Coordinating radiometals of Copper, Gallium, Indium, Yttrium and Zirconium for PET and SPECT imaging of disease*, Chem. Rev. 110, **2010**, 2858.

¹⁴ a) H. Mäcke, S. Good, *Radiometals (non-Tc, non-Re) and bifunctional labelling chemistry*, in: F. Rösch (Volume Editor), *Handbook of Nuclear Chemistry – Volume 4: Radiochemistry and Radiopharmaceutical Chemistry in Life Science*, 2003, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands; b) M. Pagani, S. Stone-Elander, S. A. Larsson, *Alternative positron emission tomography with non-conventional positron emitters: effects of their physical properties on image quality and potential clinical applications*, Eur. J. Nucl. Med. Mol. I. 24, **1997**, 1301.

¹⁵ M. W. Sundberg, C. F. Meares, D. A. Goodwin, C. I. Diamanti, *Selective binding of metal ions to macromolecules using bifunctional analogs of EDTA*, J. Nucl. Med. 17, **1974**, 1304.

¹⁶ M. W. Brechbiel, O. A. Gansow, R. W. Atcher, J. Schlom, J. Esteban, D. Simpson, D. Colcher, *Synthesis of 1-(p-isothiocyanatobenzyl) derivatives of DTPA and EDTA: Antibody labeling and tumor-imaging studies*, Inorg. Chem. 25, **1986**, 2772.

¹⁷ C. L. Edwards, R. L. Hayes, *Tumor scanning with 67Ga-citrate*, J. Nucl. Med. 10, **1969**, 103.

¹⁸ a) M. Schottelius, H. J. Wester, *Molecular imaging targeting peptide receptors*, Methods 48, **2009**, 161; b) S. Lee, J. Xie, X. Chen, *Peptides and peptide hormones for molecular imaging and disease diagnosis*, Chem. Rev. 110, **2010**, 3087.

¹⁹ I. Verel, G. W. M. Visser, R. Boellaard, M. Stigter-van Walsum, G. B. Snow, G. A. M. S. van Dongen, ⁸⁹Zr Immuno-PET: *Comprehensive Procedures for the Production of ⁸⁹Zr-Labeled Monoclonal Antibodies*, J. Nucl. Med. 44, **2003**, 1271.

²⁰ P. J. Riss, R. Hummerich, P. Schloss, *Synthesis and monoamine uptake inhibition of conformationally constrained 2β-carbomethoxy-3β-phenyl tropanes*, Org. Biomol. Chem. 7, **2009**, 2688.

²¹ M. Reivich, D. Kuhl, A. Wolf, J. Greenburg, M. Phelps, T. Ido, V. Cassella, J. Fowler, E. Hoffman, A. Alavi, P. Som, L. Sokoloff, *The [¹⁸F]fluorodesoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization in man*, Circ. Res., 44, **1979**, 127.

²² R. Haubner, H. J. Wester, *Radiolabeled tracers for imaging of tumor angiogenesis and evaluation of anti-angiogenic therapies*, Curr. Pharm. Des. **2004**, 10, 1439.

²³ a) L. M. De Leon-Rodriguez, Z. Kovacs, *The synthesis and chelation chemistry of DOTA-peptide conjugates*, Bioconjugate Chem. 19, **2008**, 391; b) N. Viola-Villegas, R. P. Doyle, *The coordination chemistry of 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid: structural overview and analyses on structure-stability relationships*, Coord. Chem. Rev. 253, **2009**, 1906.

²⁴ P. J. Riss, C. Kroll, V. Nagel, F. Roesch, *NODAPA-OH and NODAPA-(NCS)_n: Synthesis, ⁶⁸Ga-radiolabelling and in vitro characterisation of novel versatile chelators for molecular imaging*, Bioorg. Med. Chem. Lett. 18, **2008**, 5364.

²⁵ J. Notni, P. Hermann, J. Havlickova, J. Kotek, V. Kubicek, J. Plutnar, N. Loktionova, P.J. Riss, F. Roesch, I. Lukes, *A triazacyclononan-based bifunctional phosphinate ligand for the preparation of multimeric ⁶⁸Ga tracers for positron emission tomography*, Chem. Eur. J. 16, **2010**, 7174.

²⁶ C. S. Cutler, M. C. Giron, D. E. Reichert, A. Z. Snyder, P. Herrero, C. J. Anderson, D. A. Quarless, S. A. Koch, M. J. Welch, *Evaluation of 68-gallium Tris(2-mercaptobenzyl)amin: A complex with brain and myocardial uptake*, Nucl. Med. Biol. 26, **1999**, 305.

²⁷ W. Liu, G. Hao, M. A. Long, T. Anthony, J.-T. Hsieh, X. Sun, *Imparting multivalency to a bifunctional chelator: A scaffold design for targeted imaging probes*, Angew. Chem. Int. Ed. 48, **2009**, 7346.

²⁸ W. Vaalburg, H. H. Coenen, C. Crouzel, P. H. Elsinga, B. Langström, C. Lemaire, G. J. Meyer, *Amino Acids for the Measurement of Protein Synthesis In Vivo by PET*, Int. J. Radiat. Appl. Instrum. Part B, 19, **1992**, 227.

²⁹ R. M. Johnstone, P. G. Scholefield, *Amino Acid Transport in Tumor Cells*, Adv. Cancer Res. 9, **1965**, 143.

³⁰ B. Langström, G. Antoni, P. Gullberg, C. Halldin, P. Malmberg, K. Nagren, A. Rimland, H. Svärd, *Synthesis of L- and D-[Methyl-¹¹C]Methionine*, J. Nuc. Med, 28, **1987**, 1037.

³¹ K. Ishiwata, W. Vaalburg, P. H. Elsinga, A. M. J. Paans, M. G. Woldring, *Comparison of L-Methyl-¹¹C]Methionine for Measuring in Vivo Protein Synthesis Rates with PET*, J. Nuc. Med., 29, **1988**, 1419.

³² H. H. Coenen, P. Kling, G. Stöcklin, *Cerebral metabolism of L-[2-¹⁸F]Fluorotyrosin, a new PET tracer for protein synthesis*, J. Nucl. Med. 30, **1989**, 1367.

³³ H. J. Wester, M. Herz, W. Weber, P. Heiss, R. Senekowitsch-Schmidtke, M. Schwaiger, G. Stöcklin, *Synthesis and Radiopharmakology of O-(2-[¹⁸F]fluoroethyl)-L-Tyrosine for Tumor Imaging*, J. Nucl. Med. 40, **1999**, 205.

³⁴ K. Hamacher, H. H. Coenen, *Efficient routine production of the ¹⁸F-labelled amino acid O-(2-[¹⁸F]fluoroethyl)-L-tyrosine*, Appl. Rad. Isot., 57, **2002**, 853.

- ³⁵ W. Weber, H. J. Wester, A. L. Grosu, M. Herz, B. Dzewas, H. J. Feldmann, M. Molls, G. Stöcklin, M. Schwaiger, *O*-(2-[¹⁸F]Fluoroethyl)-L-tyrosine and L-[methyl-¹¹C]methionine uptake in brain tumours: initial results of a comparative study, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. I.* 27, **2000**, 542.
- ³⁶ a) J. McConathy, L. Martanello, E. J. Malveaux, V. M. Camp, N. E. Simpson, C. P. Simpson, G. D. Bowers, Z. Zhang, J. J. Olson, M. M. Goodman, *Synthesis and evaluation of 2-amino-4-[¹⁸F]fluoro-2-methylbutanoic acid(FAMB): relationship of amino acid transport to tumor imaging properties of branched fluorinated amino acids*, *Nucl. Med. Biol.* 30, **2003**, 477; b) J. McConathy, L. Martanello, E. J. Malveaux, V. M. Camp, N. E. Simpson, C. P. Simpson, G. D. Bowers, J. J. Olson, M. M. Goodman, *Radiolabeled Amino Acids for Tumor Imaging with PET: Radiosynthesis and Biological Evaluation of 2-Amino-3-[¹⁸F]fluoro-2-methylpropanoic Acid and 3-[¹⁸F]Fluoro-2-methyl-2-(methylamino)propanoic Acid*, *J. Med. Chem.* 45, **2002**, 2240; c) T. M. Shoup, J. Olson, J. M. Hoffman, J. Votav, D. Eshima, L. Eshima, V. M. Camp, M. Stabin, D. Votav, M. M. Goodman, *Synthesis and Evaluation of [¹⁸F]1-Amino-3-fluorocyclobutane-1-carboxylic Acid to image Brain Tumors*, *J. Nucl. Med.* 40, **1999**, 331.
- ³⁷ R. Schirmacher, S. Comagic, E. Schirmacher, F. Rösch, *Synthesis of a technetium-99m labelled L-Tyrosine derivative with the ^{99m}Tc(I)(CO)₃-core using a simple kit-procedure*, *J. Label. Compd.* 47, **2004**, 477.
- ³⁸ S. Mrena, K. Savola, P. Kulmala, H. K. Akerblom, M. Knip, *Staging of preclinical type 1 diabetes insiblings of affected children*, *Pediatrics* 104, **1999**, 925.
- ³⁹ A. Schmitz, C. Y. Shiue, Q. Feng, G. G. Shiue, S. Deng, M. T. Pourdehnad, R. Schirmacher, M. Vatamaniuk, N. Doliba, F. Matschinsky, B. Wolf, F. Roesch, A. Naji, A. A. Alavi, *Synthesis and evaluation of fluorine-18 labeled glyburide analogs as β -cell imaging agents*, *Nucl. Med. Biol.* 31, **2004**, 483.
- ⁴⁰ B. Wängler, S. Schneider, O. Thews, E. Schirmacher, S. Comagic, P. Feilen, C. Schwanstecher, M. Schwanstecher, C.-Y. Shiue, A. Alavi, S. Höhnemann, M. Piel, F. Rösch, R. Schirmacher, *Synthesis and evaluation of (S)-2-(2-[¹⁸F]fluoroethoxy)-4-([3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butyl-carbamoyl]-methylbenzoic acid ([¹⁸F]repaglinide): a promising radioligand for quantification of pancreatic β -cell mass with positron emission tomography (PET)*, *Nucl. Med. Biol.* 31, **2004**, 639.
- ⁴¹ B. Wängler, C. Beck, C. Y. Shiue, S. Schneider, C. Schwanstecher, M. Schwanstecher, P. J. Feilen, A. Alavi, F. Rösch, R. Schirmacher, *Synthesis and in vitro evaluation of (S)-2-([¹¹C]methoxy)-4-[3-methyl-1-(2-piperidine-1-yl-phenyl)-butyl.carbamoyl]-benzoic acid ([¹¹C]repaglinide): a potential β -cell imaging agent*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14, **2004**, 5205.
- ⁴² S. Schneider, P. J. Feilen, M. Schreckenberger, M. Schwanstecher, C. Schwanstecher, H. G. Buchholz, O. Thews, K. Oberholzer, A. Korobeynikov, A. Bauman, S. Comagic, M. Piel, E. Schirmacher, J. Y. Shiue, A. A. Alavi, P. Bartenstein, F. Roesch, M. M. Weber, H. H. Klein, R. Schirmacher, *In vitro and in vivo evaluation of novel glibenclamide derivatives as imaging agents for the non-invasive assessment of the pancreatic islet cell mass in animals and humans*, *Exp. Clin. Endocrin. Diabetes* 113, **2005**, 388.
- ⁴³ A. Azhdarinia, C. Oh, S. Kohanim, M. Chanda, D.-F. Yu, M. Ito, J. L. Bryant, E. E. Kim, D. J. Yang, *Targeted imaging pancreas β -cell activity with ^{99m}Tc-labeled nateglinide*, *J. Labelled Comp. Radiopharm.* 48 Supplement 1, **2005**, S269.
- ⁴⁴ A. M. Green, M. J. Welch, *Gallium radiopharmaceutical chemistry*, *Int.J. Radiat. Appl. Instrum. Part B.* 16, **1989**, 435.
- ⁴⁵ W. A. P. Breeman, M. de Jong, E. de Blois, B. F. Bernard, M. Konijnenberg, E. P. Krenning, *Radiolabelling DOTA-peptides with ⁶⁸Ga*, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. I.* 32, **2005**, 478.
- ⁴⁶ G. J. Meyer, H. Mäcke, J. Schuhmacher, W. H. Knapp, M. Hofmann, *⁶⁸Ga-labelled DOTA-derivatised peptide ligands*, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. I.* 31, **2004**, 1097.
- ⁴⁷ a) K.P. Zhernosekov, D.V. Filosofov, R.P. Baum, P. Aschoff, H. Bihl, A.A. Razbash, M. Jahn, M. Jennewein, F. Rösch, *Processing of generator-produced ⁶⁸Ga for medical application*, *J. Nucl. Med.* 48, **2007**, 1741; b) M. Asti, G. De Pietri, A. Fraternali, E. Grassi, R. Sghedoni, F. Fioroni, F. Roesch, A. Versari, D. Salvo, *Validation of ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga generator processing by chemical purification for routine clinical application of ⁶⁸Ga- DOTATOC*, *Nucl. Med. Biol.* 35, **2008**, 721.
- ⁴⁸ F. Zoller, P. J. Riss, F. P. Montforts, F. Roesch, *Efficient post-processing of generator eluates facilitates ⁶⁸Ga-labeling under anhydrous conditions*, *Radiochim. Acta* 98, **2010**, 157.
- ⁴⁹ I. Velikyan, H. R. Mäcke, B. Langström, *Convenient preparation of ⁶⁸Ga-based PET-radiopharmaceuticals at room temperature*, *Bioconjugate Chem.* 19, **2008**, 569.
- ⁵⁰ W. R. Harris, L. Messori, *A comparative study of aluminium(III), gallium(III), indium(III), and thallium(III) binding to human transferrin*, *Coord. Chem. Rev.* 228, **2002**, 237.
- ⁵¹ I. Velikyan, G. J. Beyer, B. Langström, *Microwave supported preparation of ⁶⁸Ga-bioconjugates with high specific activity*, *Bioconjugate Chem.* 15, **2004**, 554

⁵² D. D. Dischino, M. J. Welch, M. Kilbourn, M. E. Raichle, *Relationship between lipophilicity and brain extraction of C-11-labeled radiopharmaceuticals*, J. Nucl. Med. 24, **1983**, 1030.

⁵³ J. D. Krass, B. Jastorff, H. G. Genieser, *Determination of by gradient-elution high-performance liquid chromatography*, Anal. Chem. 69, **1997**, 2575.

⁵⁴ OECD Guidelines for the testing of chemicals, Section 1 107, Partition Coefficient, **1995**.

⁵⁵ a) A. Habermeier, S. Wolf, U. Martine, P. Graef, E. I. Closs, *Two amino acid residues determine the low substrate affinity of human cationic amino acid transporter-2A*. J. Biol. Chem. 278(21), **2003**, 19492; b) A. Rotmann, E. I. Closs, J. F. Liewald H. Nawrath, *Intracellular accumulation of L-Arg, kinetics of transport, and potassium leak conductance in oocytes from Xenopus laevis expressing hCAT-1, hCAT-2A, and hCAT-2B*. Biochim. Biophys. Acta1660(1-2), **2004**, 138; c) A. Rotmann, D. Strand, U. Martine, E. I. Closs, *Protein kinase C activation promotes the internalization of the human cationic amino acid transporter hCAT-1. A new regulatory mechanism for hCAT-1 activity*. J. Biol. Chem. 279(52), **2004**, 54185; d) E. I. Closs, J.-P. Boissel, A. Habermeier, A. Rotmann, *Structure and Function of Cationic Amino Acid Transporters (CATs)*. J. Membr. Biol. 213(2), **2006**, 67; e) A. Rotmann, A. Simon, U. Martine, A. Habermeier, E. I. Closs, *Activation of classical protein kinase C decreases transport via systems y+ and y+L*. Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 292(6), **2007**, C2259.

2 Manuskripte

Die vorliegende Arbeit basiert auf folgenden 8 Manuskripten:

- I) C. Burchardt, P. J. Riss, J. Peters, F. Roesch, *Multi-gram scale synthesis of various functionalized, divalent DO2A-based chelators for ^{68}Ga -PET*, Bioconjugate Chem. **2010**, eingereicht
- II) F. Roesch, P. Riss, C. Burchardt, *Verbindung aus einem Metallion und einem Markierungsvorläufer mit zwei oder mehreren Targetingvektoren und Verwendung der Verbindung*, PCT Int. Appl. **2009**, 40pp. CODEN: PIXXD2 WO 2009124764 A1 20091015
- III) C. Burchardt, Patrick J. Riss, F. Zoller^a, S. Maschauer, O. Prante, T. Kuwert, F. Roesch, *[^{68}Ga]Ga-DO2A-(Obu-L-tyr)₂: Synthesis, ^{68}Ga -radiolabeling and in vitro studies of a novel ^{68}Ga -DO2A-tyrosine derivative as potential tumor tracer for PET*, Bioorg. Med. Chem. Lett. **19**, **2009**, 3498.
- IV) C. Burchardt, M. J. Zimny, P. J. Riss, F. Roesch, *Divalent DO2A-conjugated SUR1-affine derivatives for the non-invasive quantification of the pancreatic β -cell-mass in vivo with ^{68}Ga -related positron-emission-tomography (PET)*, Bioorg. Med. Chem. **2010**, in Vorbereitung
- V) C. Burchardt, P. J. Riss F. Roesch, *Systematic ^{68}Ga -labelling of DO2A-(butyl-L-tyrosine)₂ with cation-exchanger post-processed ^{68}Ga : Practical aspects*, Contrast Media Mol. I. **2010**, eingereicht
- VI) P. J. Riss, A. A. Coarasa, C. Burchardt, C. Kroll F. Roesch, *Radiochemical evidence for the competitive formation of Ga^{III} HEPES complexes in ^{68}Ga labeling reactions*, Bioorg. Med. Chem. **2010**, eingereicht
- VII) C. Burchardt, P. J. Riss, F. Rösch, *Isolierung Radiometall-markierter Pharmaka auf Grundlage makrozyklischer Liganden*, in Vorbereitung zum Einreichen beim dt. Patentamt
- VIII) B. Sandhöfer, C. Burchardt, A. Habermeier, E. I. Closs, F. Rösch, *Investigation of the uptake mechanism of O-(2-[^{18}F]fluoroethyl)-L-tyrosine (FET)*, Eur. J. Nucl. Med. Mol. I. **2010**, in Vorbereitung

2.1 „Multi-gram scale synthesis of various functionalized, divalent DO2A-based chelators for ^{68}Ga -PET”

Multi-gram scale synthesis of various functionalized, divalent DO2A-based chelators for ^{68}Ga -PET

C. Burchardt¹, P. J. Riss^{1,2}, J. Peters³, F. Roesch¹

¹Institute of Nuclear Chemistry, JohannesGutenberg-University Mainz, Germany

²The Wolfson Brain Imaging Center, University of Cambridge, England

³Institute of Organic Chemistry, Technical University Delft, The Netherlands

Abstract

The synthesis of three novel, functionalized bifunctional chelators, namely 1,7-diacetic acid-tert.-butylester-4,10-di-(4-amino-)benzyl-1,4,7,10-tetraazacaclo-dodecane (DO2A-(benzyl-NH₂)₂), 1,7-diacetic acid-4,10-di-(4-isothiocyanate-)benzyl-1,4,7,10-tetraazacaclo-dodecane (DO2A-(benzyl-NCS)₂) and 1,7-diacetic acid-4,10-di-(4-maleimide-)benzyl-1,4,7,10-tetraazacaclo-dodecane (DO2A-(benzyl-maleimide)₂) is presented. All three bifunctional chelators are designed to attach two targeting vectors with simple conjugation chemistry. Thus all chelators are suitable for the so-called multivalency approach, which has shown to have a positive influence to the affinities of radiopharmaceuticals. This straightforward, high-yielding synthesis route, which was scaled up to the multi-gram level, opens the access to a broad variety of novel potential radiopharmaceuticals. To prove the applicability of the new chelators an initial ^{68}Ga -labeling was performed and the stability of the formed complex was checked.

Introduction

Radiopharmaceuticals labeled with ^{68}Ga for positron-emission-tomography (PET) are a rapidly increasing field in molecular imaging [1]. Due to its favorable decay properties ($t_{1/2}$: 67.7 min; β^+ (max): 1.8 MeV; β^+ -abundance: 89%) and the perfect availability of ^{68}Ga via the $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -radionuclide generator, ^{68}Ga has become a real alternative to cyclotron-produced positron-emitters like ^{11}C or ^{18}F [2]. However, in comparison to such established nuclides a

completely different labeling strategy is needed [3]. Gallium, like most other metals, lacks the opportunity to form covalent bonds. Consequently, labeling method based on bifunctional chelators which form stable complexes with the desired radiometals are the labeling strategies of choice. Hence, ^{68}Ga radiopharmaceuticals usually consist of a targeting vector, which is connected by a spacer or linker to the bifunctional chelator. This approach has already proven its applicability in well-known examples such as the DOTA-conjugated somatostatin analogues DOTATOC, DOTATATE and DOTANOC [4]. Recently, the so-called multivalency-approach has gained increasing interest in radiopharmaceutical chemistry. It was shown that an increasing number of targeting vectors attached to a chelator system is able to enhance the affinity of the radiopharmaceutical [5]. The first approaches utilized complex organic chemistry to form targeting vector containing dendrimers. These dendrimers were further attached to a bifunctional chelator. One major drawback of this concept is the high synthetic effort which often leads only to moderate yields. Recent studies used the natural structure of bifunctional chelators as scaffolds to attach two targeting vector bearing moieties [6]. This approach was also applied to a ^{64}Cu -labeled divalent RGD-derivative clearly showing an increased affinity to the target $\alpha_v\beta_3$ -integrin [7]. Although the concept of multivalency and the corresponding class of compounds is very promising and gains more and more attention, at the moment there are no functionalized divalent chelators available at commercial suppliers. Therefore, a simple and high-yielding synthesis which enables easy access to various different functionalized compounds is of major importance.

The chelator 1,4,7,10-tetraazacyclododecan-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid (DOTA) bears 8 donorfunctions for coordination of metal cations [8]. On the other hand, the highest coordination number of a gallium(III) cation is 6[9]. Accordingly, this combination provides the opportunity to substitute two acetate groups of DOTA with functionalities to attach targeting vectors. In case of DOTA, this leads to disubstituted 1,4,7,10-tetraazacyclododecan-N,N''-diacetic acid DO2A-derivatives.

Different methods have proven suitability to attach targeting vectors to bifunctional chelators. The most commonly applied approach is the formation of an amide bond. But also the use of isothiocyanates for the coupling of primary amines and maleimides to attach thiols has already shown excellent applicability [10, 11]. Both functional groups, isothiocyanate and maleimide, are directly synthesized from the primary amines. Thus, the

synthetic route to the amine intended for an amide formation, also enables access to further derivatives. In this work, we describe the synthesis of new divalent isothiocyanate and maleimide derivatives of the DO2A chelator to facilitate an easy access to convenient attaching chemistry for targeting vectors. Initial labeling tests using ^{68}Ga and stability studies of the new structures are presented.

Results and discussion

We planned a synthetic route starting from tert.-butyl protected DO2A (**1**), which was synthesized in three steps from cyclen following a described procedure [12]. The complete synthesis scheme is depicted in figure 1.

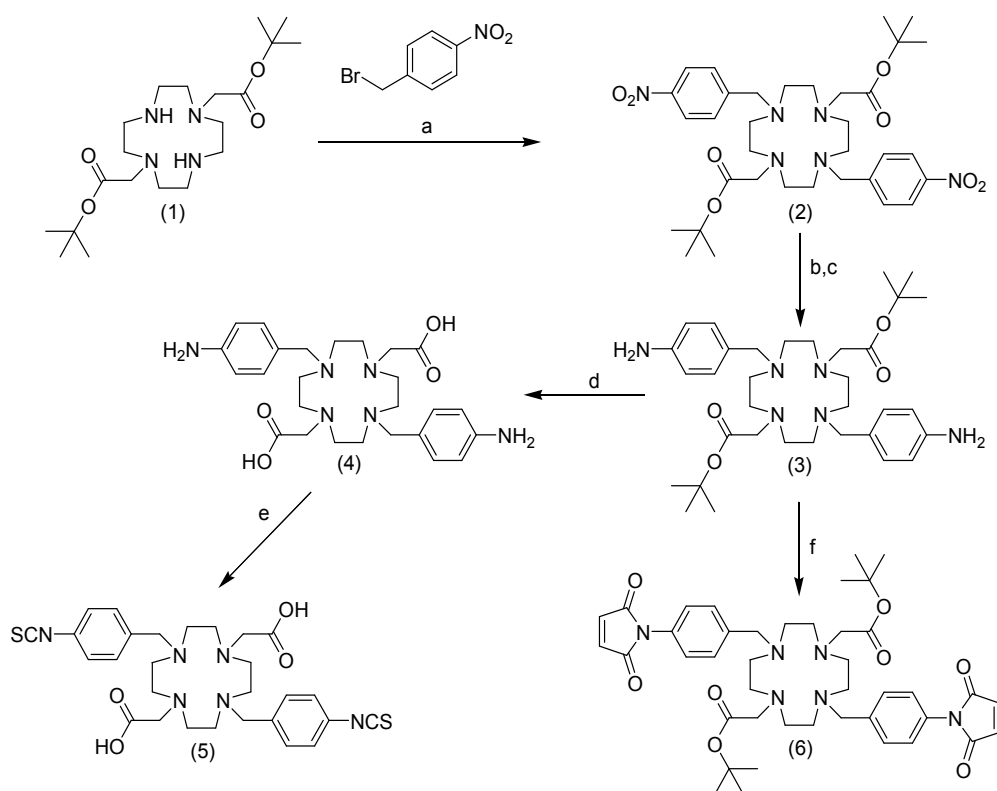


Figure 1: Synthesis scheme leading to the divalent bifunctional chelators (**3**), (**5**) and (**6**); a) MeCN, DIPEA, 16h, 45°C, 78% yield; b) MeOH, Pd/C, H₂; NaOH 83% yield c) CH₃COOH, Fe, 3h, 62% yield; d) TFA, RT, 24h, 99% yield; e) thiophosgene, CHCl₃/H₂O, RT, 3h, 75% yield; f) H₂O, NaHCO₃ RT, 15min, 83% yield

In the first step the reaction of (**1**) with two equivalents of p-nitrobenzyl bromide and diisopropylethylamine was successfully carried out in acetonitrile at 45 °C. Conveniently, the

product of this reaction precipitates in acetonitrile. The pure product (2) was filtered off, washed and directly used in the subsequent step. In this way, difficult and yield-decreasing purification processes could be avoided. In the following reduction of the nitro functionalities to the amines is a crucial step in the synthesis. Due to the high sensitivity of benzyl groups to catalytic hydrogenation conditions, reaction conditions had to be found, that are specific to the reduction of the nitro groups to amines and still guarantee high yields. Standard procedures for the reduction utilizing Pd-catalyzed hydrogenation failed due to the simultaneous cleavage of one or both benzyl functionalities. The side reactions could be avoided using iron and glacial acetic acid. Under these conditions the desired product (3) could be received, but the reaction led only to moderate yields. So, in attempts to optimize the catalytic hydrogenation methods, the addition of NaOH allowed selective reduction of the nitro groups by retaining the benzyl functionalities.

At this point the amine moieties offer coupling reactions with carboxylic acids, halogens or tosylates for attaching targeting vectors or spacers. Moreover, the amines can be further converted to isothiocyanates or maleimides. To perform these conversions, the tert-butyl ester protective groups were cleaved with trifluoroacetic acid in quantitative yields. The introduction of the isothiocyanate was achieved in a heterogenic two phase reaction, due to the poor solubility of the deprotected amino compound in organic solvents. Thiophosgene was dissolved in chloroform and the diaminobenzyl-DO2A in water, mixed together and stirred heavily. A HPLC-purification afforded the pure product (5) in good yields of 75%. The dimaleimide compound (6) was synthesized by reacting the protected amino compound (3) with a large excess of maleimidecarboxylic acid methylester. The desired product (6) was obtained in high yields of 83 %. Starting from DO2A, the products were received in 48% (diisothiocyanate derivative) and 53% yield (dimaleimide derivative) over four steps. Starting from cyclen, the yields over seven steps are 34% and 37%, respectively. All synthesis steps were also successfully applied to multi-gram scale.

For a “proof of principle” an initial ^{68}Ga -labeling with the diisothiocyanate-derivative was performed [13]. Prior to the labeling an established cation-exchanger based post-processing method was carried out to purify the ^{68}Ga [14]. The labeling was facilitated in 5 mL Millipore water at pH 3.2 using 10 μg labeling precursor at various temperatures. The labeling yields were determined by radio-TLC and radio HPLC. It was found that the ^{68}Ga -labeling procedure

of this precursor required high temperatures to achieve satisfying yields. At 50 °C, the yields were just around 30% after 10 minutes, which could be increased to 71% at 95 °C.

To further improve the yields, the reaction mixture was heated up to 140 °C at a pressure of 6 bar in a pressure resistant lab microwave [15]. Using this microwave supported heating, quantitative yields were achieved after 2 minutes reaction time. The temperature-dependent time-courses of labeling yields at 50 °C and 70 °C are shown in figure 2.

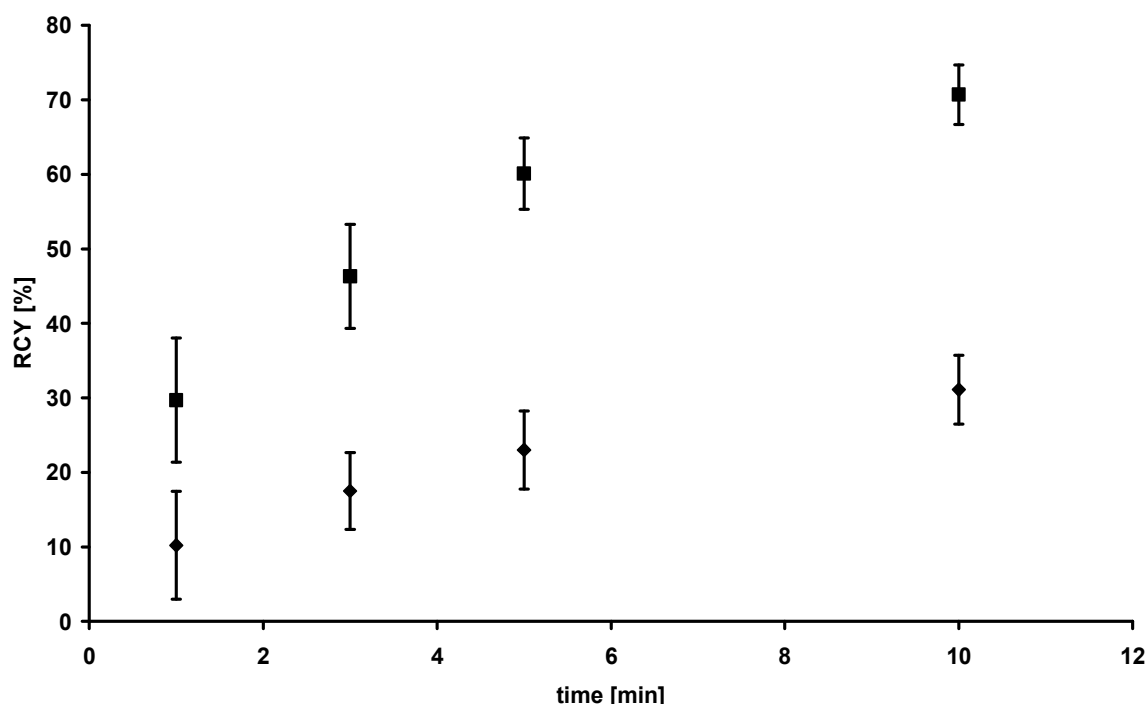


Figure 2: Time-dependency of ^{68}Ga -labeling in 5 mL Millipore water with 10 μg (17 nmol) labeling precursor at two different temperatures: 50 °C (diamonds) and 70 °C (squares). Errors are given ± 1 standard deviation.

After labeling, the stability of the formed complex was investigated. The stability was tested by a transchelating experiment (challenge) employing transferrin. Transferrin is a very strong competition chelator *in vivo* which shows a ubiquitous presence in blood. An *in vivo* transchelation by transferrin would lead to a dramatically increased background and impair a visualization of a specific accumulation of radioactivity in the target tissue [16]. To prove the stability, the labeled product was incubated with a very large excess of transferrin in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) at 37 °C. This mixture was monitored by radio-TLC

over a period of two hours. This time is sufficient, because a usual ^{68}Ga -PET-scan does not take longer than 90 minutes. Over the period of two hours, no degradation of transchelation of the ^{68}Ga -labeled product was observed. The results of the stability study are presented in figure 3.

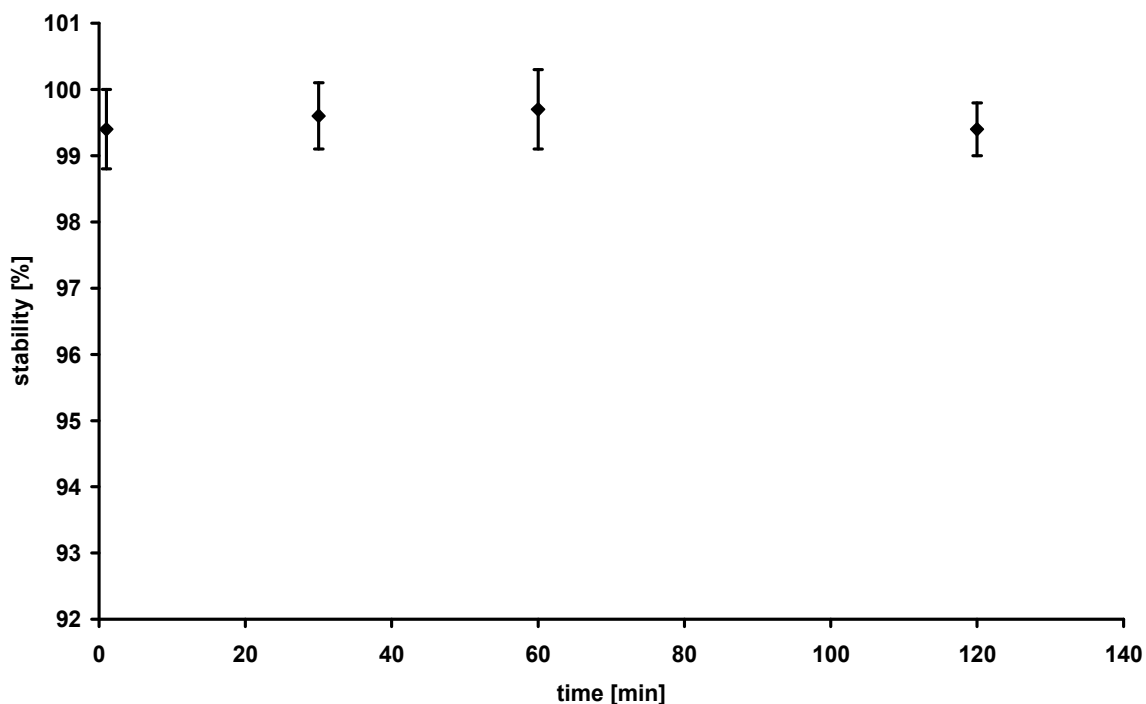


Figure 3: Challenge experiment with APO-transferrin to check the stability of the formed $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -1,7-diacetic acid-4,10-di-(4-isothiocyanate)-benzyl-1,4,7,10-tetraazacacloclododecane

Summary and conclusion

The successful synthesis of three novel, divalent bifunctional chelators, diaminobenzyl-DO2A, diisothiocyanate-DO2A and dimaleimide-DO2A, was performed using a straightforward synthesis route. All compounds are suitable for the multivalency approach. Due to the “click-chemistry”-like attachment of targeting vectors to the introduced functional groups, an easy derivatizing chemistry can be applied. All products were received in very high yields and purity. The synthetic strategy could successfully be transferred to the multi-gram level. All materials are cheap, commercially available standard chemicals, making this route very cost-effective. The ^{68}Ga -labeled product showed excellent stability over two hours, which is sufficient for ^{68}Ga -PET-studies, in a transferring challenge experiment. The only slight constraints are the harsh labeling conditions of two minutes microwave heating

at 140 °C to obtain high yields of the labeled product. This limits the applications of this group of bifunctional chelators to heat-insensitive targeting vectors like small peptides or molecules. For other applications, requiring lower labeling-temperatures, a NOTA-based approach would be a suitable alternative [17].

Acknowledgement

The authors gratefully acknowledge support from the European Union over the COST action D38.

References

- [1] F. Roesch, P. J. Riss, *The renaissance of the $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ radionuclide generator initiates new developments in ^{68}Ga radiopharmaceutical chemistry*, *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, accepted.
- [2] M. Fani, J. P. Andre, H. Mäcke. *^{68}Ga -PET: A powerful generator-based alternative to cyclotron-based radiopharmaceuticals*. *Contrast Media Mol. I.* **3**, **2008**, 67.
- [3] T. J. Wadas, E. H. Wong, G. R. Weisman, C. J. Anderson, *Coordinating radiometals of Copper, Gallium, Indium, Yttrium and Zirconium for PET and SPECT imaging of disease*, *Chem. Rev.* **110**, **2010**, 2858.
- [4] a) M. Schottelius, H. J. Wester, *Molecular imaging targeting peptide receptors*, *Methods* **48**, **2009**, 161; b) S. Lee, J. Xie, X. Chen, *Peptides and peptide hormones for molecular imaging and disease diagnosis*, *Chem. Rev.* **110**, **2010**, 3087.
- [5] R. Haubner, H. J. Wester, *Radiolabeled tracers for imaging of tumor angiogenesis and evaluation of anti-angiogenic therapies*, *Curr. Pharm. Des.* **2004**, **10**, 1439.
- [6] a) C. Burchardt, P. J. Riss, F. Zoller, S. Maschauer, O. Prante, T. Kuwert, F. Rösch, *[^{68}Ga]Ga-DO2A-(OBu-L-tyr)₂: Synthesis, ^{68}Ga -radiolabeling and in vitro studies of a novel ^{68}Ga -DO2A-tyrosine conjugate as potential tumor tracer for PET*, *Bioorg. Med Chem. Lett.* **19**, **2009**, 3498; b) T. Mukai, J. Suwada, K. Sano, M. Okada, F. Yamamoto, M. Maeda, *Design of Ga-DOTA-based bifunctional radiopharmaceuticals: Two functional moieties can be*

conjugated to radiogallium–DOTA without reducing the complex stability, *Bioorg. Med. Chem.* 17, **2009**, 4285.

[7] W. Liu, G. Hao, M. A. Long, T. Anthony, J.-T. Hsieh, X. Sun, *Imparting multivalency to a bifunctional chelator: A scaffold design for targeted imaging probes*, *Angew. Chem. Int. Ed.* 48, **2009**, 7346.

[8] a) L. M. De Leon-Rodriguez, Z. Kovacs, *The synthesis and chelation chemistry of DOTA-peptide conjugates*, *Bioconjugate Chem.* 19, **2008**, 391; b) N. Viola-Villegas, R. P. Doyle, *The coordination chemistry of 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid: structural overview and analyses on structure-stability relationships*, *Coord. Chem. Rev.* 253, **2009**, 1906.

[9] G. Bandoli, A. Dolmella, F. Disato, M. Porchia, F. Refosco, *Mononuclear six-coordinated Ga(III)-complexes: A comprehensive survey*, *Coord. Chem. Rev.* 253, **2009**, 56.

[10] M. S. Cooper, E. Sabbah, S. J. Mather, *Conjugation of chelating agents to proteins and radiolabeling with trivalent metallic isotopes*, *Nat. Protoc.* 1, **2006**, 314.

[11] J. Schlesinger, C. Fischer, I. Koezle, S. Vonhoff, S. Klussmann, R. Bergmann, H. J. Pietzsch, J. Steinbach, *Radiosynthesis of new [⁹⁰Y]-DOTA-based maleimide reagents suitable for the prelabeling of thiol-bearing L-oligonucleotides and peptides*, *Bioconjugate Chem.* 20, **2009**, 1340.

[12] Z. Kovacs, A. D. Sherry, *A general synthesis of 1,7-disubstituted 1,4,7,10-tetraazacyclododecanes*, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 2, **1995**, 185.

[13] C. Burchardt, P. J. Riss, F. Roesch, *Systematic ⁶⁸Ga-labelling of DO2A-(butyl-L-tyrosine)₂ with cation-exchanger post-processed ⁶⁸Ga: Practical aspects*, *Contrast Media Mol. I.* 5, **2010**, submitted.

[14] a) K.P. Zhernosekov, D.V. Filosofov, R.P. Baum, P. Aschoff, H. Bihl, A.A. Razbash, M. Jahn, M. Jennewein, F. Rösch, *Processing of generator-produced ⁶⁸Ga for medical application*, *J. Nucl. Med.* 48, **2007**, 1741; b) M. Asti, G. De Pietri, A. Fraternali, E. Grassi, R. Sghedoni, F. Fioroni, F. Roesch, A. Versari, D. Salvo, *Validation of ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga generator processing by chemical purification for routine clinical application of ⁶⁸Ga- DOTATOC*, *Nucl. Med. Biol.* 35, **2008**, 721.

- [15] I. Velikyan, G. J. Beyer, B. Langström, *Microwave supported preparation of ⁶⁸Ga-bioconjugates with high specific activity*, *Bioconjugate Chem.* 15, **2004**, 554.
- [16] W. R. Harris, L. Messori, *A comparative study of aluminium(III), gallium(III), indium(III), and thallium(III) binding to human transferrin*, *Coord. Chem. Rev.* 228, **2002**, 237.
- [17] I. Velikyan, H. R. Mäcke, B. Langström, *Convenient preparation of ⁶⁸Ga-based PET-radiopharmaceuticals at room temperature*, *Bioconjugate Chem.* 19, **2008**, 569; b) P. J. Riss, C. Kroll, V. Nagel, F. Roesch, *NODAPA-OH and NODAPA-(NCS)_n: Synthesis, ⁶⁸Ga-radiolabelling and in vitro characterisation of novel versatile chelators for molecular imaging*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18, **2008**, 5364; c) J. Notni, P. Hermann, J. Havlickova, J. Kotek, V. Kubicek, J. Plutnar, N. Loktionova, P. J. Riss, F. Roesch, I. Lukes, *A triazacyclononan-based bifunctional phosphinate ligand for the preparation of multimeric ⁶⁸Ga tracers for positron emission tomography*, *Chem. Eur. J.* 16, **2010**, 7174.

Supporting material:

Experimental

General methods:

All used chemicals were commercially available at Acros Organics, Bachem, Fluka, Sigma Aldrich, STREM or VWR and used without further purification. All used solvents were freshly distilled prior to use.

The measurement of the ¹H-NMR spectra was performed on a Bruker AC 200 FT-NMR and a Bruker Avance 2 NMR spectrometer. ¹³C-MNR spectra were recorded on a Bruker Avance 2 spectrometer at 100 MHz and on a Bruker AC 200 FT-NMR at 75 Mhz. Chemical Shifts are given in parts per millions downfield from TMS ($\delta = 0$ ppm) referred to the solvent residual signal.

For the purification of the compounds a semi-preparative Dionex P680 HPLC with an UVD170U UV-detector (254 and 360 nm) and a Phenomenex® Synergy Max RP 15x250mm HPLC-column (H₂O/MeOH 75:25, 0.01% TFA) was used. TLC was performed on self-cut Merck

Silica 60 F₂₅₄ plates. Column chromatography was carried out on Acros silica gel 60, 0.063 – 0.200 mesh.

For the radiolabeling a commercially available ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga-generator (Cyclotron AG, Obninsk, Russia) has been used. Radio-TLCs were performed on Merck Silica F₂₅₄ TLC-Plates and analysed with a Canberra Instant Imager.

1,7-diacetic acid-tert.-butylester-4,10-di-(4-nitro-)benzyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (2)

1,7-diacetic acid-tert.-butylester-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (6 g, 15 mmol) and diisopropylethylamine (6.42 g, 48 mmol) were dissolved in 80 mL acetonitrile. Then p-nitrobenzylbromide (7.2 g, 33.3 mmol) dissolved in 35 mL acetonitrile was added and stirred for 16 hours at 45 °C. The precipitate was filtered off and washed three times with 30 mL N-hexane. After evaporation in vacuo 7.85 g (11.7 mmol, 78%) pure product (**3**) was obtained as white solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ in ppm) 8.18 (d, J = 8.7 Hz, 4H), 7.68 (d, J = 8.7 Hz, 4H), 3.65 (s, 4H), 3.09 (s, 4H), 2.83 (m, 8H), 2.65 (m, 8H), 1.39 (s, 18H)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (in ppm) 170.8, 148.4, 146.9, 129.4, 123.4, 80.8, 59.3, 56.4, 53.2, 52.6, 28.2

MS (FD): m/z (%): 470.4 (83.9), 471.4 (100), 472.5 (40.2)

1,7-diacetic acid-tert.-butylester-4,10-di-(4-amino-)benzyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (3)

a) 1,7-diacetic acid-tert.-butylester-4,10-di-(4-nitro-)benzyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (3 g, 4.5 mmol) were dissolved in 70 mL methanol and 10 mL 1 M NaOH, 100 mg palladium on charcoal (5%) were added. A stream of hydrogen was flushed through the reaction mixture for three hours. The charcoal was filtered off with Celite and the solvent was removed in vacuo. The residue was taken up in 30 mL 0.1 M hydrochloric acid washed two times with 30 mL chloroform. The water was turned basic again with 10 mL 1 M NaOH and the product was extracted with 3 x 30 mL chloroform. The chloroform was evaporated in vacuo and the product (**4**) was obtained as yellow solid (2.27 g, 3.7 mmol, 83%).

b) 1,7-diacetic acid-tert.-butylester-4,10-di-(4-nitro-)benzyl-1,4,7,10-tetraazacaclo-dodecane (4 g, 6 mmol) iron powder (2.8 g), glacial acetic acid (25 mL) and water (10 mL) were mixed and stirred for 3 hours. The solvent was removed in vacuo and the residue was taken up in 50 mL 2 M NaOH and the product was extracted with 5 times 50 mL chloroform. The combined organic phases were dried over sodium sulfate and the solvent was removed to receive 2.26 g (3.7 mmol, 62%) yellow product (4).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (in ppm) 7.16 (d, J = 8.2 Hz, 4H), 6.64 (d, J = 8.2 Hz, 4H), 3.61 (s, 4H), 3.45 (bs, 4H), 3.15 (s, 4H), 2.84 (m, 8H), 2.61 (m, 8H), 1.40 (s, 18H)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (in ppm) 171.3, 147.2, 145.0, 130.2, 126.1, 80.5, 59.6, 56.3, 52.4, 52.1, 28.2

MS (FD): m/z (%): 611.4 (100), 612.4 (32.7)

1,7-diacetic acid-4,10-di-(4-amino-)benzyl-1,4,7,10-tetraazacaclo-dodecane (TFA-salt) (4)

1,7-diacetic acid-tert.-butylester-4,10-di-(4-amino-)benzyl-1,4,7,10-tetraazacaclo-dodecane (3 g, 4.9 mmol) was dissolved in 40 mL trifluoroacetic acid and stirred for 24 hours. The acid was removed in vacuo and 3.68 g (4.9 mmol, 99%) of the desired product were received. In the ¹H-NMR spectra was no protective group signal left.

¹H NMR (300 MHz, D₂O): δ (in ppm) 7.73 (d, J = 8.2 Hz, 4H), 7.53 (d, J = 8.2 Hz, 4H), 4.57 (s, 4H), 3.44 (m, 8H), 3.21 - 2.87 (m, 12H)

¹³C NMR (75 MHz, D₂O): δ (in ppm) 174.1, 132.9, 131.7, 124.1, 117.8, 56.9, 53.2, 50.0, 48.1

MS (ESI): m/z (%): 499.31 (100), 500.31 (18.46), 521.33 (43.63), 522.32 (9.63)

1,7-diacetic acid-4,10-di-(4-isothiocyanate-)benzyl-1,4,7,10-tetraazacyclo-dodecane (5)

3 g (4mmol) of the TFA-salt of 1,7-diacetic acid-4,10-di-(4-amino-)benzyl-1,4,7,10-tetraazacyclo-dodecane were dissolved in 20 mL water and the pH value was adjusted to 7-8 with 1 M NaOH. Thiophosgene (1.82 g, 16mmol) was dissolved in 20 mL chloroform. Both phases were mixed and heavily stirred for three hours at room temperature. The phases were separated and the water phase was washed with 3 x 15 mL chloroform. The water

phase was lyophilized and purified by HPLC. 1.74 g (3 mmol) of the yellow, solid product (5) was obtained.

¹H NMR (300 MHz, MeOH-d₄): δ (in ppm) 7.83 (d, J = 8.5 Hz, 4H), 7.44 (d, J = 8.5 Hz, 4H), 4.65 (s, 4H), 3.57 (m, 4H), 3.05-2.03 (m, 16H)

¹³C NMR (75 MHz, D₂O): δ (in ppm) 175.1, 145.3, 134.3, 127.7, 120.1, 116.2, 61.1, 59.0, 54.0, 51.6

MS (ESI): m/z (%): 583.24 (100), 584.27 (31.27), 605.24 (66.39), 606.26 (13.33)

1,7-diacetic acid-tert.-butylester-4,10-di-(4-maleimide-)benzyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (6)

500 mg (0.66 mmol) of the TFA-salt of 1,7-diacetic acid-tert.-butylester-4,10-di-(4-amino)-benzyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecane was dissolved in 20 mL 1M NaHCO₃-solution. To this mixture 3 g (19.4 mmol) of methoxycarbonylmaleimide dissolved in 10 mL dioxane were added. The reaction mixture was stirred for 15 minutes at room temperature. Then the pH-value was raised 12 with 2 M NaOH and the product was extracted with 25 mL chloroform and dried over sodiumsulfate. After removing the solvent 362 mg (0.55 mmol, 83%) of the desired product (6) was received as pale yellow solid.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (in ppm) 7.53 (d, J = 8.5 Hz, 4H), 7.27 (d, J = 8.5 Hz, 4H), 6.82 (s, 4H), 3.58 (s, 4H), 3.14 (s, 4H), 2.84 (m, 8H), 2.64 (m, 8H), 1.39 (s, 18 H)

¹³C NMR (75 MHz, D₂O): δ (in ppm) 173.3, 159.8, 138.4, 132.2, 131.7, 127.6, 121.1, 81.8, 59.6, 57.3, 53.2, 51.2, 28.2

MS (ESI): m/z (%): 771.41 (100), 772.40 (38.66)

General procedure for the ⁶⁸Ga-radiolabeling of 1,7-diacetic acid-4,10-di-(4-isothiocyanate)-benzyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecane

10 µg (17 nmol) of the labeling precursor 1,7-diacetic acid-4,10-di-(4-isothiocyanate)-benzyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (10 µL of 1 mg/1mL stock solution) were added to 5 mL Millipore water. In case of conventional heating the mixture was preheated for 2 minutes to the desired labelling temperature. Then 50 µL of the generator-derived and cation-

exchanger post processed ^{68}Ga were given to the reaction vial ending up in a pH-value of 3.2. After defined timepoints (1, 3, 5, 10 minutes) 1 μL were spotted on a TLC-plate. To develop the TLCs a mixture of 5% NaCl-solution and ethanol (3:1) was used. The yield was given as product activity / total activity.

Stability control of the labelled product [^{68}Ga]Ga-1,7-diacetic acid-4,10-di-(4-isothiocyanate)-benzyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecane

A solution of 3 mg/mL of apo-transferrin in PBS-buffer pH 7.4 was prepared. To 1 mL of this mixture 300 μL of the product containing microwave irradiated labelling solution was added. The mixture was stored at 37 °C and after defined timepoints (1, 30, 60, 120 minutes) radio-TLCs were prepared to check transchelation.

2.2 „Verbindung aus einem Metallion und einem Markierungsvorläufer mit zwei oder mehreren Targetingvektoren und Verwendung der Verbindung“

Verbindung aus einem Metallion und einem Markierungsvorläufer mit zwei oder mehreren Targetingvektoren und Verwendung der Verbindung

Die Erfindung betrifft eine Verbindung aus einem Metallion und einem Markierungsvorläufer mit zwei oder mehreren Targetingvektoren und die Verwendung der Verbindung.

In der medizinischen Bildgebung werden Metallkomplexe zur Funktions- und Lokalisationsdiagnostik, sowie in der Therapie angewandt.

In der Diagnostik stellen die bildgebenden Verfahren Positron-Emission-Tomography (PET) und Single-Photon-Emission-Computed-Tomography (SPECT) nach dem Tracer-Prinzip vor allem die biochemische Funktion eines Organs oder Gewebes dar, während die bildgebenden Verfahren Computertomographie (CT) und Kernspintomographie (MRI) die morphologische Struktur beispielsweise von Organen oder des Knochenskeletts zeigen. Wird beispielsweise ein Radiopharmakon verwendet, das bevorzugt von knochenbildenden Zellen aufgenommen wird, so zeigt normales Knochengewebe in der Tomographie niedrige Aktivität. Im Gegensatz zu krankhaftem Knochengewebe, dessen erhöhte Aktivität verstärkten Knochenumbau anzeigt, beispielsweise verursacht durch Krebs, gutartigen Knochentumor, Frakturen, Arthrosen oder Entzündungen.

Aminosäuren zur Tumordiagnostik

Aminosäuren stellen, vor allem in der Onkologie, nützliche Targetingvektoren für PET- bzw. SPECT dar. Sie werden über verschiedene Aminosäuretransportsysteme in Zellen transportiert und dort in bestimmten Fällen in der Proteinbiosynthese weiter zu Proteinen umgesetzt. Das schnelle Wachstum dieser Tumore bedingt neben einer erhöhten Proteinsyntheserate auch eine erhöhte Aminosäuretransporteraktivität und -dichte. Die

erhöhte Anreicherung der radioaktiv markierten Aminosäure in Tumorzellen begründet sich also in der Regel in der hohen Proliferationsrate maligner Tumore. Die Akkumulation erfolgt im Idealfall durch den Einbau der markierten Aminosäuren in Proteine. Parallel dazu ist es möglich, dass markierte Aminosäuren in die Zelle transportiert, dort aber nicht mehr in Proteine eingebaut werden. Studien zeigen einen direkten Zusammenhang zwischen Proteinsyntheserate und Aminosäuretransporteraktivität. Daher ist es für eine Anreicherung der markierten Aminosäure in der Zelle nicht unbedingt notwendig, dass diese auch in Proteine eingebaut wird, was eine Variation der Struktur der radioaktiv markierten Aminosäure in jedem Maß zulässt, das durch den Aminosäuretransporter toleriert wird. Dies ist beispielsweise für das O-(2-[¹⁸F]Fluorethyl)-L-Tyrosin (FET) der Fall.

Momentan werden für die PET bereits ¹¹C- oder ¹⁸F- markierte Aminosäuren, wie das L-[Methyl-¹¹C]Methionin (MET), das 2-[¹⁸F]Fluor-L-Tyrosin, das O-(2-[¹⁸F]Fluorethyl)-L-Tyrosin (FET) und andere ¹¹C- bzw. ¹⁸F-markierte Aminosäuren als Tumortracer klinisch eingesetzt. Man geht davon aus, dass die Bindung eines Tracers an einen Aminosäuretransporter ausreicht, um eine Anreicherung im Vergleich zum normalen Gewebe zu erhalten und den Tumor abbilden zu können. Dies gewährt einen noch deutlich größeren Spielraum bei der Variation der eingesetzten Strukturen.

Zusätzlich wurden radioaktiv markierte künstlichen Aminosäuren beschrieben, wie beispielsweise 1-Amino-3-[¹⁸F]fluorocyclobutan-1-carbonsäure (FACBC), die über den Aminosäuretransporter in die Zelle transportiert werden und sich dort akkumulieren.

Eine besondere Bedeutung besitzen radioaktiv markierte Aminosäuren bei der Diagnostik von Hirntumoren, da ein gesundes Hirn einen niedrigen Stoffwechsel an Aminosäuren besitzt und dort lokalisierte maligne Tumore einen deutlich höheren Aminosäurestoffwechsel aufweisen.

Klinisch etabliert ist beispielsweise der Zusammenhang von PET-Tumordiagnostik mit markierten Aminosäuren als prä-therapeutische Diagnostik zur Vorbereitung chirurgischer oder strahlen-basierter Therapien.

Dies erfordert eine hohe Verfügbarkeit der markierten Aminosäuren in der klinischen Routine.

Metall-basierte Radiopharmaka

In der funktionellen Bildgebung mittels PET oder SPE(C)T werden beispielsweise Biomoleküle bekannter Funktion (Nukleotide, Neurotransmitter oder Zucker) radioaktiv markiert, um intelligente Sonden zu erhalten, die in ihrer Funktion mit dem Original identisch (Isotopentracer) oder ihm ausreichend ähnlich sind (Analogtracer). In vielen Fällen besitzen Analogtracer spezifische biologische Funktionen, die einen wertvollen Rückschluss auf das Verhalten der Originale erlauben.

Die Einführung eines sperrigen Metallkomplexes in ein biologisch relevantes (kleines) Molekül ist jedoch oft mit drastischen Änderungen der Moleküleigenschaften verbunden, da sich physikalische Parameter (Lipophilie, Solvatisierung, molare Masse, Diffusions- und Permeationseigenschaften u.Ä.) wie auch chemisch-physikalische Parameter (Aktivierungsenergien von essentiellen Konformationsänderungen, Elektronenverteilungen, Komplexstabilitäten und -bildungsgeschwindigkeiten o.a.) signifikant ändern.

Metall-Komplexbildner besitzen andererseits eine wichtige Funktion in der diagnostischen funktionellen Bildgebung. Ihre Metallkomplexe können als Kontrastmittel für die Computertomographie (Röntgentomographie), für die Kernspintomographie (MRI) und die Bildgebung mittels Ultraschall eingesetzt werden, sowie als Komplexe radioaktiver Metalle in der nuklearmedizinischen Diagnostik und Therapie. Komplexe mit stabilen Lanthaniden

oder anderen schweren Elementen mit Atomgewichten größer als das von Iod ($M_{\text{Atom}} > \text{Iod}$) besitzen eine hohe Absorption für Röntgenstrahlung und können somit als Röntgenkontrastmittel dienen. Komplexe mit hoher Röntgenabsorption besitzen zum Teil auch ausreichende Ultraschall-Streu- oder Reflektionseigenschaften, um als Ultraschallkontrastmittel eingesetzt werden zu können. Paramagnetische Elemente mit symmetrischem elektronischem Grundzustand (z.B. Gd(III) oder Fe(III)) bilden Komplexe mit Chelatoren, die als Spin-Relaxations-Katalysatoren für die Anwendung in der MRI eingesetzt werden können. Durch die Kombination von Chelatoren mit paramagnetischen Elementen, die einen unsymmetrischen Elektronengrundzustand besitzen, werden shift-Reagenzien für die MRI erhalten. Zahlreiche Lanthanidkomplexe makrozyklischer Chelatoren besitzen vorteilhafte (z.B. pH-abhängige) Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften im Bereich des sichtbaren Lichts. Sie eignen sich insbesondere für die Anwendung in modernen, lichtmikroskopischen Methoden der molekularen Bildgebung.

Voranstehend genannte Chelatoren und Komplexe können auch bifunktionell sein, d.h. neben der Komplexbildung des Metallions können sie eine weitere Funktionalität besitzen, die neue chemische, physikalische oder biologische Eigenschaften mit sich bringt. Die Komplexbildner in der vorliegenden Erfindung sollen zwei solcher Funktionalitäten beinhalten, die als sogenannte Targetingvektoren (TV), die selektive Anreicherung des Metallkomplexes in einem definierten Gewebe *in vivo* bewirken. Dadurch erhält der Komplex für die funktionelle Bildgebung entscheidende Vorteile.

⁶⁸Ga als Radionuklid-basierter und leicht verfügbarer Positronen-Emitter für die Synthese von PET-Radiopharmaka

In der nuklearmedizinischen Diagnostik bzw. Therapie können Gamma- oder Positronenemitter für die Bildgebung mittels SPE(C)T (z.B. mit ^{99m}Tc oder ¹¹¹In) und Positronen-Emissions-Tomographie (PET) (z.B. mit ⁶⁸Ga und ⁶⁴Cu) eingesetzt werden. Dagegen besitzen α -(¹⁷⁷Lu) oder β^- -Emitter (⁹⁰Y) zum Teil vorteilhafte Eigenschaften für die Endoradiotherapie (ERT).

Das Positronen-emittierende ^{68}Ga mit einer physikalischen Halbwertszeit $T_{1/2} = 67,7$ min ist von großer praktischer Bedeutung für die klinische Diagnostik mittels PET.

Den Radionuklidgeneratoren zur Gewinnung von radioaktiven metallischen Radionukliden liegt ein Konzept der effektiven radiochemischen Separation von Mutter- und Tochter-Radionuklidssystemen in solcher Weise zugrunde, dass das Tochternuklid in chemisch und radiochemisch möglichst reiner Form erhalten werden soll.

Im Vergleich zu in-house-Radionuklidproduktionsanlagen wie Beschleunigern oder Nuklearreaktoren bietet die Verfügbarkeit kurzlebiger Radionuklide von Radionuklidgeneratoren eine preiswerte und einfache Alternative. Die Entwicklung von Radionuklidgeneratoren war und ist stets geprägt durch das wachsende Spektrum der Anwendung von Radionukliden und markierten Pharmaka in der Medizin, insbesondere für die nuklearmedizinische Diagnostik und Therapie. Diese wachsende Verfügbarkeit von Radionuklidgeneratoren wiederum hat eine breite Entwicklung von neuen biologisch relevanten Molekülen stimuliert, die mit den Radionukliden aus Radionuklidgeneratoren markiert werden.

Die breite Nutzung des $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Generatorsystems in der Nuklearmedizin ist ein typisches Beispiel für die Anwendung von Radionuklidgeneratoren in Klinika und bei Herstellern einer großen Palette diagnostischer Radiopharmaka. Mehr als 35 000 diagnostische Studien mit $^{99\text{m}}\text{Tc}$ werden täglich allein in den USA, das sind mehr als 12 Millionen Anwendungen pro Jahr, geschätzter Weise durchgeführt.

Radionuklidgenerator-Entwicklungen sind oft systematisiert worden. Detaillierte Berichte hierüber haben sich verschiedenen Aspekten gewidmet: Mutter-Tochter Halbwertszeiten, Reaktor-produzierte Nuklide, Beschleuniger-produzierte Nuklide, Zyklotron-Produktion von Generatormutter-Nukliden, ultrakurzlebige Generator-produzierte Radionuklide, Generator-basierte Positron-emittierende Radionuklide und klinische Anwendungen.

Inzwischen wurden verschiedene andere Generatorsysteme entwickelt und einige davon haben signifikante praktische Bedeutung erlangt. Zurzeit bieten ^{68}Ge ($T_{1/2} = 270.95 \text{ d}$) / ^{68}Ga ($T_{1/2} = 67,7 \text{ min}$)-Generatorsysteme eine neue, vielversprechende Perspektive zur qualitativ und quantitativ verbesserten Verfügbarkeit neuer PET-Radiopharmaka.

^{68}Ga -basierte Tumordiagnostika

Seit einigen Jahren steht mit ^{68}Ga ein Generatorkern auch für die PET zur Verfügung. Erste Generatorsysteme sind kommerziell erhältlich. Die Routineproduktion eines tumoraffinen Peptids zur bildgebenden Diagnostik vor allem neuroendokriner Tumore ist in Form des [^{68}Ga]DOTATOC (^{68}Ga -DOTA-DPhe¹-Tyr³-octreotid) grundsätzlich etabliert.

Im Fall der Synthese bzw. Anwendung von Ga-Radiopharmaka kann zwischen einfachen Ga-Ligand-Komplexen (z.B. [$^{67,68}\text{Ga}$]Citrat) und markierten Targetingvektoren (z.B. markierten Peptide wie [$^{67,68}\text{Ga}$]DOTATOC) unterschieden werden. Vor allem die zweite Kategorie bietet die interessantesten und vielfältigsten Möglichkeiten zur nuklearmedizinischen Diagnostik. Chemisch liegt diesem Ansatz die Verwendung bifunktioneller Chelatoren zugrunde.

Geeignete bifunktionelle Chelatoren müssen in der Lage sein, das ^{68}Ga mindestens über den Zeitraum einer PET-Untersuchung stabil zu komplexieren und gleichzeitig die Möglichkeit besitzen, kovalent an die benötigten Targetingvektoren gebunden zu werden. Hier hat sich für viele Fragestellungen 1,4,7,10-Tetraazacyclododekan-1,4,7,10-tetraessigsäure (DOTA), ein makrozyklischer Chelatligand, der bereits in der Komplexierung hochkoordinierender Lanthanide Verwendung findet und präparativ leicht zugänglich ist, bewährt.

Da der Chelator acht Koordinationsstellen besitzt und das für die Markierung zugängliche Ga(III) sechsfach koordiniert, verbleiben zwei der acht Koordinationsstellen im DOTA frei. Bei diesen handelt es sich um zwei Carboxylgruppen der Essigsäurereste, welche beispielsweise

für die Konjugation mit einem Biomolekül zur Verfügung stehen. Im Falle des $[^{68}\text{Ga}]\text{DOTATOC}$ wird beispielsweise nur eine der zwei freien Carboxylgruppen verwendet, um den TV (D $\text{Phe}^1\text{-Tyr}^3\text{-Octreotid}$) an den Galliumkomplex zu binden. Die verbleibende freie Carboxylgruppe liegt bei physiologischem pH als Carboxylat vor, wodurch sich die chemischen Eigenschaften gegenüber vollständig koordinierten Verbindungen deutlich verändern. Dennoch weist $[^{68}\text{Ga}]\text{DOTATOC}$ gegenüber seinem SPECT-Analogen $[^{111}\text{In}]\text{Octreoscan}$ eine erheblich bessere Affinität auf, so dass nicht generell auf eine Verschlechterung der pharmakologischen Eigenschaften geschlossen werden kann.

Einige tripodale, tetraedrisch koordinierenden Chelatoren, insbesondere solche die Schwefeldonoren beinhalten, sind ebenfalls bekannt, werden aber aufgrund ihrer zumeist aufwendigen Synthese nicht eingesetzt. Für die Kopplung von Ga-Targetingvektoren verwendet man zur Zeit in der Regel das kommerziell erhältliche DOTA und seine Derivate. Das neun-Ring-analoge NOTA gilt ebenfalls als sehr geeignet, konnte sich jedoch bisher aufgrund seiner aufwendigen synthetischen Darstellung noch nicht durchsetzen.

1,4,7,10-Tetraazacyclododekan-1,4,7,10-tetraessigsäure (DOTA) und das ebenfalls oft verwendete 1,4,7-Triazacyclononan-1,4,7-triessigsäure (NOTA) sind in Fig. 1 dargestellt.

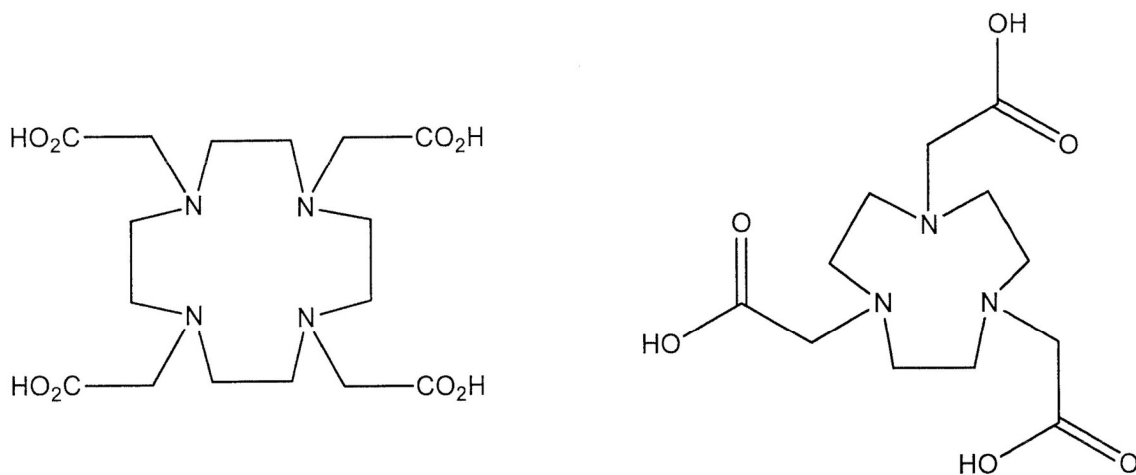


Fig. 1: Strukturformeln von DOTA und NOTA

Aufgabe der Erfindung ist die Schaffung von Verbindungen aus einem Metallion und einem Markierungsvorläufer bestehend aus dem bifunktionellen Chelator mit konjugierten Targetingvektoren.

Dabei soll es sich zum einen um Derivate handeln, bei denen zwei oder mehrere Aminosäure-Targetingvektoren pro Chelatormolekül eingesetzt werden. (Fig. 2)

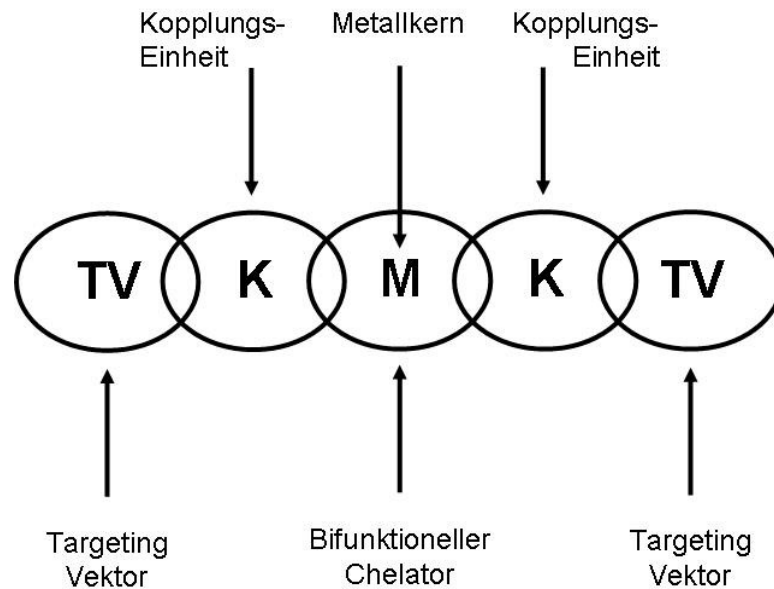


Fig. 2: Schematische Darstellung der Zielstruktur

Diese Aufgabe wird in der Weise gelöst, dass der Markierungsvorläufer aus einem bifunktionellen makrozyklischen Chelator, einer Kopplungseinheit zumindest zwei Targetingvektoren aufgebaut ist.

Das Metallion ist insbesondere ein Radionuklid.

In Ausgestaltung der Erfindung umfasst der makrozyklische Chelator 9- bis 16-gliedrige Polyazamakrozyklen.

In vorteilhafter Weise ist der Chelator in der Verbindung ein makrozyklisches Polyamin, das an allen Stickstoffatomen substituiert ist, wobei das zentrale Metallion mit den benachbarten Stickstoffatomen 5- bzw. 6-Ring-Chelate bildet. Insbesondere ist bzw. sind an

den Chelator eine bzw. mehrere Kombinationen aus Spacer, Linker und zwei oder mehrerer Aminosäuren als Targetingvektor gebunden.

Die Konjugation der beiden oder mehrerer Targetingvektoren erfolgt jeweils über verschiedene Ringstickstoff-Atome des makrozyklischen Chelators und / oder verschiedener Kohlenstoffatome des Chelators.

In Ausgestaltung der Erfindung wird ein Chelator verwendet, der aus Polyaminopolycarbonsäuren und gegebenenfalls komplexbildenden Donoren aus der Gruppe CNHOH, CSOH, COOH, CH₂OH, CH₂SH, PO(OH)₂, CH₂SO₃H aufgebaut ist. Des Weiteren kann ein Chelator verwendet werden, der aus Polyaminopolycarbonsäuren aufgebaut ist, die zusätzlich oder anstelle einer oder mehrerer Carbonsäureeinheiten auch SH-Gruppen enthalten.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen weisen fünf-, sechs- oder mehrfach-kordinierende bifunktionelle Chelatoren sowie deren Komplexe mit Metallionen, insbesondere Radionukliden, zur Kopplung an Aminosäuren auf.

Die Chelatoren sind zur thermodynamisch stabilen und kinetisch inerten Komplexierung von Metallionen wie Radionukliden bzw. Radioisotopen, insbesondere von ⁶⁸Ga und anderen Radiogalliumisotopen befähigt und an die Chelatoren werden in geeigneter Weise Aminosäuren kovalent gebunden.

Die Chelatoren sind des Weiteren zur Bindung von mehr als einer Aminosäure je bifunktionellem Chelator geeignet. Dadurch wird dem resultierenden Komplex-Biomolekül-Konjugat eine molekulare Grundlage verliehen, die eine erhöhte Affinität zu einem Tumor bewirkt.

Die erfindungsgemäße Weiterbildung der Verbindung ergibt sich aus den Ansprüchen 11 bis 27.

Die Verbindung wird erfindungsgemäß zum Abbilden von Tumorgeweben mittels der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) oder der Single-Photon-Emission-Computed-Tomography (SPECT), durch selektive Anreicherung des Metallkomplexes der Verbindung in dem zu untersuchenden Tumorgewebe *in vivo* verwendet.

In weiterer Verwendung zum Bestrahlen von Zielgewebe wird die Verbindung systemisch oder direkt in das Zielgewebe eingebracht. Insbesondere wird die Verbindung zum Abbilden von Herz-, Blutgefäß-, Hirn-, Nieren-, Lungen-, Leber- und Drüsengewebe sowie Knochen mittels PET verwendet.

Weitere Verwendungen der Verbindung sind in den Ansprüchen 31 bis 34 beschrieben.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen eignen sich für die molekulare Bildgebung mit PET oder anderen Bildgebungsverfahren und werden in der nuklearmedizinischen Diagnostik und/oder Therapie eingesetzt. Insbesondere werden die Verbindungen zur nuklearmedizinischen Diagnostik von Tumoren mittels der Positronen-Emissions-Tomographie PET oder der Single-Photon-Emission-Computed-Tomography SPECT verwendet, die durch selektive Anreicherung in dem zu untersuchenden Zielgewebe *in vivo* ermöglicht wird.

Ebenso werden über die Verbindungen wie Radiogalliumpharmaka auf Aminosäure-Basis hinaus auch die zur Bildgebung bzw. Therapie von Tumoren relevanten Molekülen aus der Gruppe der Zucker, Purin- und Pyrimidinbasen, Nukleotide, Nukleoside und deren Derivate, Antikörper, Antikörperfragmente, Enzym- oder Rezeptorliganden als Targetingvektoren verwendet.

Darüber hinaus sind die Verbindungen in Gestalt von Radiogalliumpharmaka zur Markierung von Polymeren, Kolloiden, Nanopartikeln zur Darstellung bzw. Bildgebung von nicht-endogenen Strukturen verwendbar.

Des Weiteren werden die Verbindungen für die Endoradiotherapie (ERT) durch (in)-direktes Einbringen von Radiopharmaka in das Zielgewebe verwendet.

Nachfolgend werden die Bestandteile des Markierungsvorläufers näher beschrieben.

a) Chelatoren

Allgemeine Strukturformeln der beschriebenen Chelatoren sind in Fig. 3a dargestellt. Der Chelator ist ein makrozyklisches Polyamin bestehend aus Polyaminopolycarbonsäuren und gegebenenfalls komplexbildenden Donoren, wie nachstehend erwähnt. Die Polyaminopolycarbonsäuren können zusätzlich oder anstelle einer oder mehrerer Carbonsäureeinheiten SH-Gruppen enthalten.

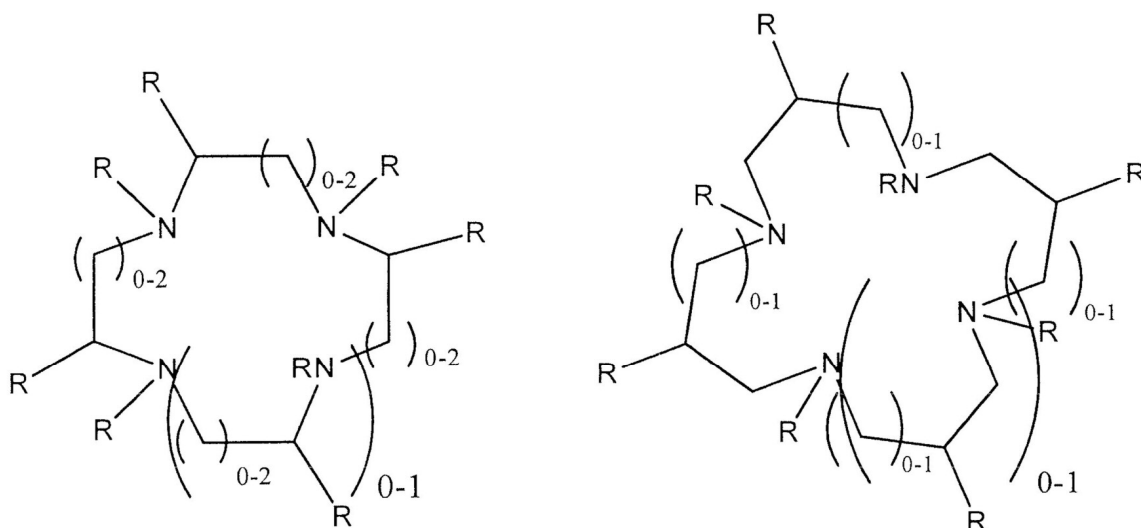


Fig. 3a: Allgemeine Strukturformeln der erfindungsgemäßen Chelatoren

Die Reste R können in beiden Typen folgende Gruppen verkörpern: Wasserstoff, Alkyl, Aryl, Heteroaryl, Alkenyl, Alkynyl oder Kombination Kopplungseinheit-Aminosäure. Dabei können alle R-Gruppen identisch oder voneinander verschieden sein, solange das Produkt gleichzeitig mindestens zwei bioaffine Gruppen enthält und in der Lage ist, ein zentrales Metall bzw. Metallion im Chelator thermodynamisch und kinetisch stabil zu komplexieren. Als Komplex-bildende Donorfunktionen kommen vor allem CNHOH, CSOH, COOH, CH₂OH, CH₂SH, PO(OH)₂, CH₂SO₃H oder vergleichbare Gruppen zum Einsatz.

b) Kopplungen und Kopplungseinheiten

Verbindungen zwischen bifunktionellem Chelator und Targetingvektoren können die Kopplungseinheiten bestehend aus Spacer und / oder Linker enthalten.

Der Spacer ist aus linearen, verzweigten oder heterosubstituierten, gesättigten, ungesättigten oder aromatischen Kohlenwasserstoffen aller Oxidationsstufen oder aus Zuckern aufgebaut.

Der Spacer ist in der Regel eine lineare, verzweigte oder heterosubstituierte Alkyl-, Alkyliden-, Aryl-, Polyether- oder Peptidkette, die kovalent unter Beibehaltung der Aminofunktionalität der Chelatorstickstoffe an zwei gegenüberliegende oder benachbarte Stickstoffatome im Makrozyklus des Chelators gebunden ist, um eine hinreichende Distanz, sowie ausreichende konformative Flexibilität zwischen dem bioaffinen Targetingvektor und dem körperfremden Komplex zu gewährleisten. Dabei ist die Spacerfunktion prinzipiell für die Einführung mindestens einer oder mehrerer Linkergruppen und damit von Targetingvektoren geeignet.

Geeignete Linker können eine Abgangsgruppe wie beispielsweise I, Cl, Br, OTs, OMs, OTf, ONf oder ONs etc. oder eine aliphatische oder aromatische Amino-, Hydroxy-, Mercapto-, Alken-, Alkin-, CO₂H-, CONH₂-, CNOH-, Epoxy-, NCS-, COOH-, Aktivester-, NCO-, COX, B(OH)₂-, Maleinimid-, PR₃-, P(OR)₃-Gruppe, Isothiocyanat/Thioharnstoff oder Analoga enthalten, die eine Bindungsknüpfung mit einem Targetingvektor ermöglicht. Neben den beschriebenen

Funktionen können die verbliebenen Reste R beispielsweise Wasserstoff, Alkyl-, Alkoxy-, Alkylthio-, Alkylamino-, Alkylformamido-, Aryl-, Aryloxy-Funktionen sein.

Unter „Abgangsgruppe“ oder „Fluchtgruppe“ ist der bei einer chemischen Reaktion abgespaltene Molekülbereich zu verstehen. Dabei kann es sich sowohl um einzelne Atome oder Ionen, aber vor allem um Moleküle und funktionelle Gruppen handeln.

Beispielhaft werden an 9-, 10- und 12-Ringen die verschiedenen Möglichkeiten zur Verbrückung zweier Targetingvektoren über den Chelator aufgezeigt. Analog dazu kann dieses Konzept auch auf 11-, 13-, 14-, 15- sowie 16-Ringe angewendet werden. Außerdem ist es möglich, nach diesem Konzept auch drei, vier oder mehr Targeting-Vektoren in das Molekül zu integrieren.

Die in den Fig. 3b-3d dargestellten Moleküle bestehen aus einem makrozyklischen Chelator sowie seinen Donorfunktionen D und Resten R, wobei, abweichend von Fig. 3a, R in den Fig. 3b-d eine Kombination aus Kopplungseinheit und Targetingvektor darstellt. Optional kann R eine zusätzliche Donorfunktion beinhalten.

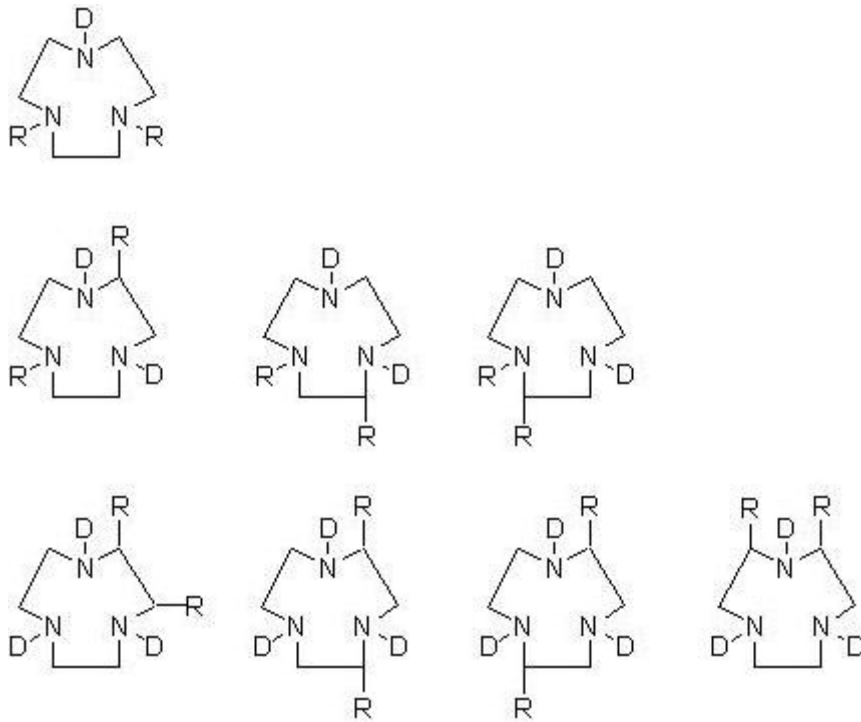


Fig. 3b: Kopplungsmöglichkeiten von zwei Targetingvektor-beinhaltenen Resten R an 9-Ring-Chelatoren

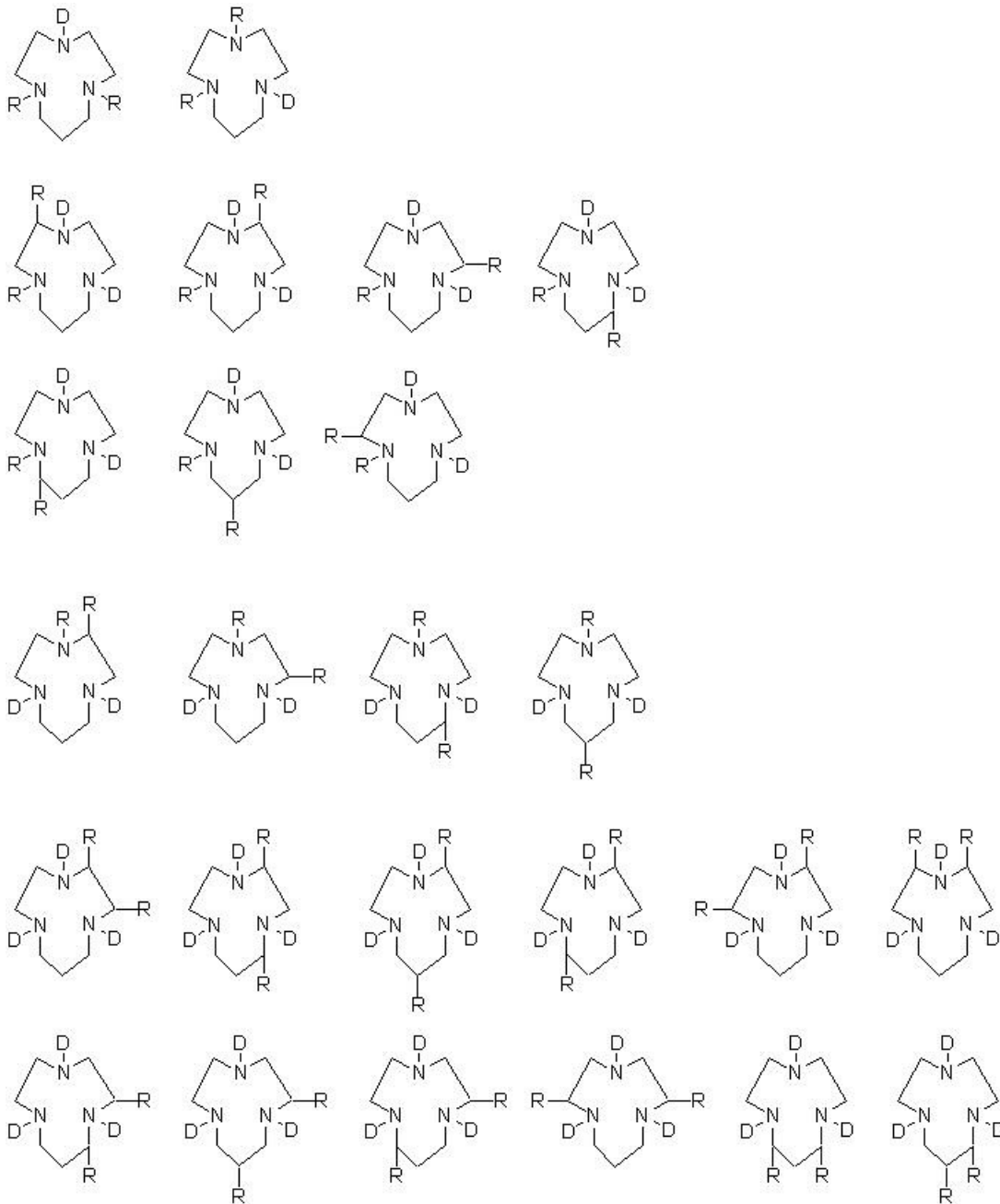


Fig. 3c: Kopplungsmöglichkeiten von zwei Targeting-Vektor beinhaltenden Resten R an 10-Ring-Chelatoren

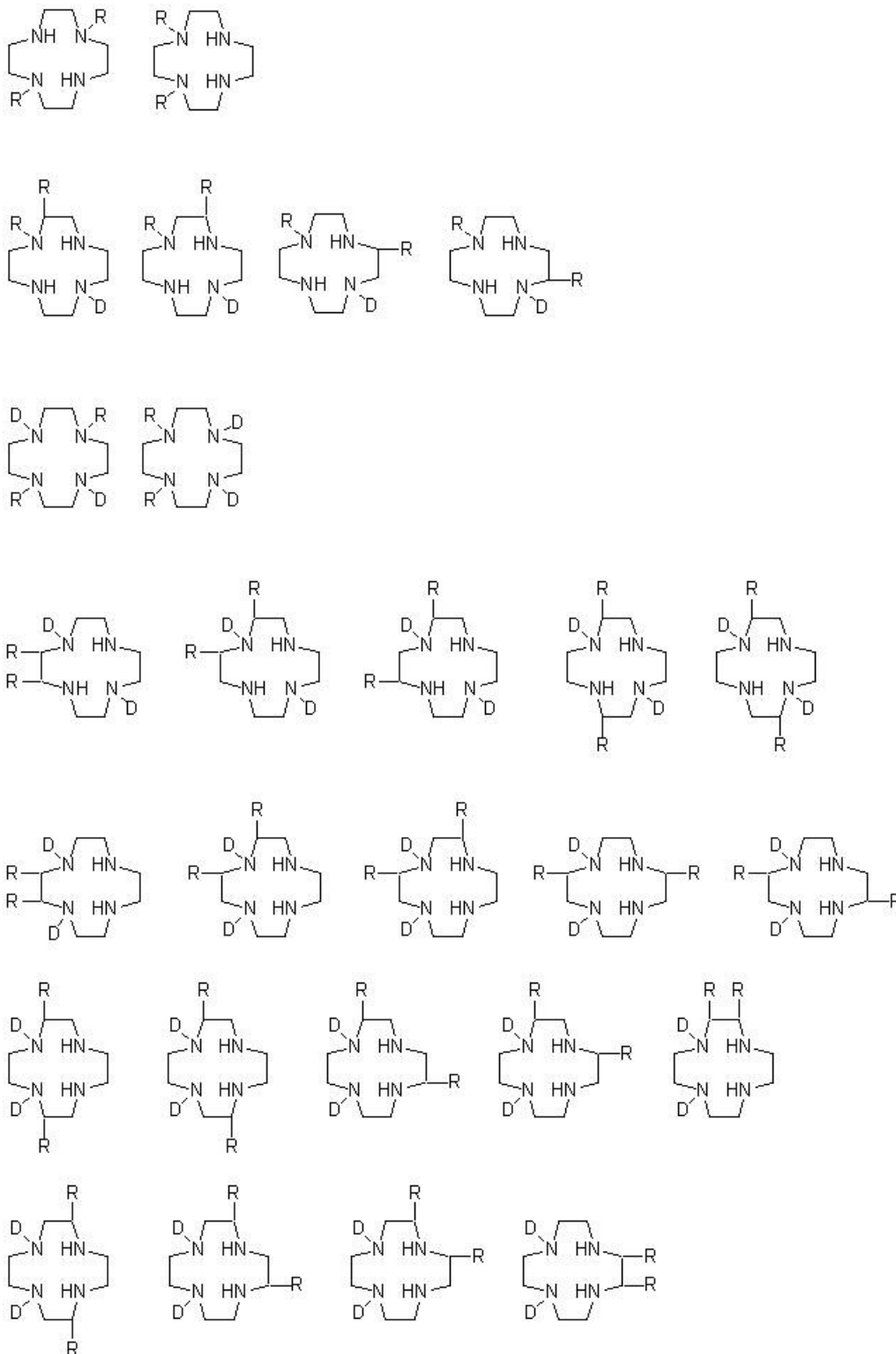


Fig. 3d (1): Kopplungsmöglichkeiten von zwei Targeting-Vektor beinhaltenden Resten R an 12-Ring-Chelatoren

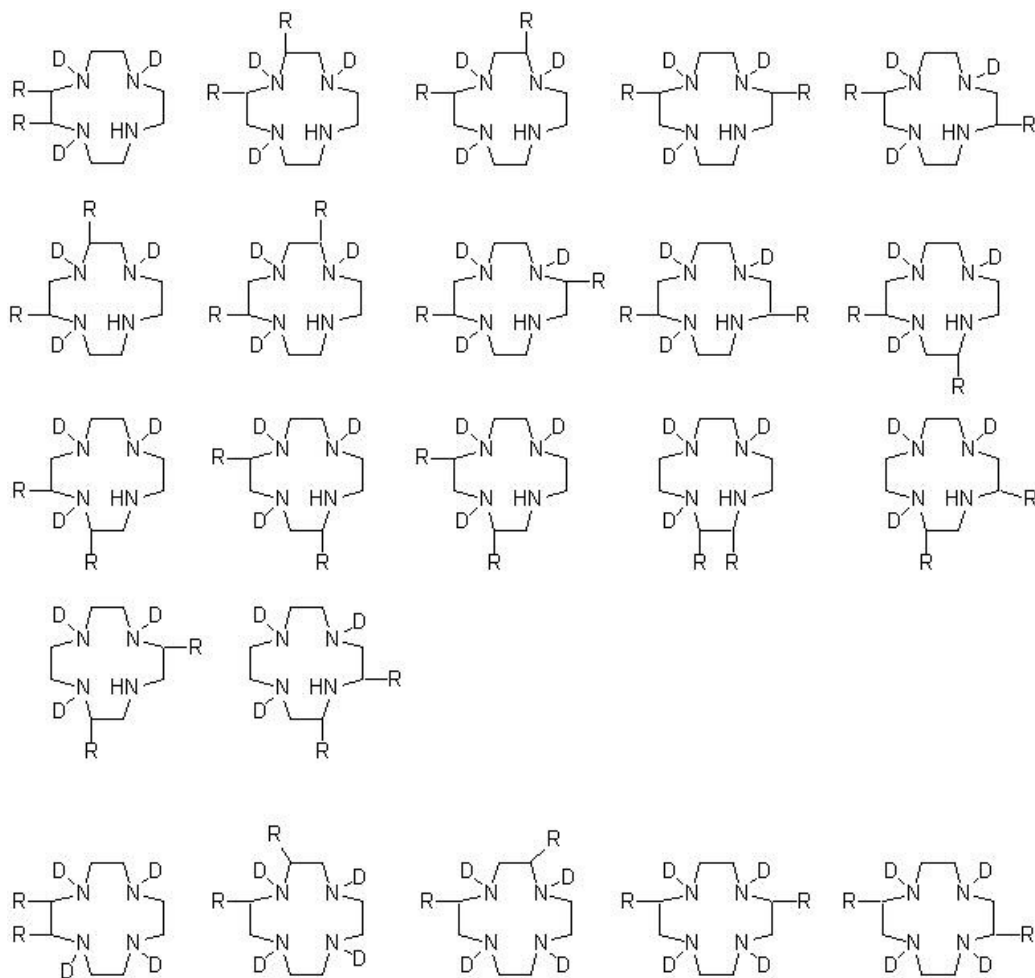


Fig. 3d (2): Fortsetzung der Kopplungsmöglichkeiten von zwei Targeting-Vektor beinhaltenden Resten R an 12-Ring-Chelatoren

Die Donorfunktionen D können in jeder Struktur gleich oder voneinander verschieden sein; die Reste R können ebenfalls in jeder Struktur gleich oder voneinander verschieden sein. Dies gilt jeweils unter der Voraussetzung, dass jede Struktur mindestens 6 Donorfunktionen (inklusive der Ringstickstoffe) und mindestens 2 Targeting-Vektoren enthält.

c) Aminosäuren

Als Targetingvektoren kommen primär Aminosäuren in Betracht. Diese werden über verschiedene Transportsysteme in die Zellen transportiert. In den nachfolgenden

Ausführungsbeispielen wurden die proteinogenen Aminosäuren L-Tyrosin, L-Serin und L-Lysin, die für Aminosäuren mit aromatischer und aliphatischer Seitenkette stehen, verwendet. Der Transport in die Zellen erfolgt über den jeweiligen Aminosäuretransporter. Beim Tyrosin erfolgt der Transport größtenteils über das Transportsystem L für Aminosäuren mit voluminösen Seitenketten, beim Lysin überwiegend über den kationischen Aminosäuretransporter und beim Serin vornehmlich über das natriumabhängige Transportsystem A. Da diese Aufnahmemechanismen bekannt sind, kann in *in vitro*-Experimenten die spezifische Aufnahme der neuen Verbindungen bestätigt werden. Die Substraterkennung des Aminosäuretransporters geschieht über die α -Amino-Carbonsäure-Gruppe. Die Kopplung an den Spacer erfolgt in den Seitenketten der Aminosäuren.

Es sind prinzipiell alle Verbindung geeignet, die eine α -Amino-Carbonsäure-Gruppe beinhalten. Diese Aminosäuren können sowohl proteinogen als auch künstlich sein. Die proteinogenen Aminosäuren sind geeignet, solange sie über einen Spacer/-Linker an den Chelator gekoppelt werden können. Die Seitenketten können sowohl neutral als auch polar, aromatisch oder aliphatisch sein und Amino-, Carboxyl- und Hydroxylgruppen beinhalten. Außerdem kann die Aminosäure L-Prolin verwendet werden, die eine nichtessentielle, neutrale, genetisch codierte Aminosäure ist und als proteinbildende Aminosäure eine sekundäre Aminogruppe aufweist.

Geeignete künstliche Aminosäuren sind alle nicht proteinogenen α -Amino-Carbon-säuren, die eine Affinität zum Target besitzen.

Im Allgemeinen sind ein, zwei oder mehrere Aminosäuren als Targetingvektoren in dem Markierungsvorläufer vorhanden, wobei diese Aminosäure-Targetingvektoren identisch oder voneinander verschieden sind.

Der oder die Targetingvektoren besteht bzw. bestehen aus niedermolekularen Targetingvektoren aus der Gruppe anorganischer Komponenten wie beispielsweise Bisphosphonate, Zucker, DNA-Komponenten, Hypoxie-Tracern, extra- oder interzellulären

Enzym- oder Rezeptorliganden, Zellmembran-Komponenten, Glutamin oder ähnlichen biologisch aktiven Strukturen gebildet sein.

Der Chelator ist mit beispielsweise zwei-, drei- oder vierwertigen metallischen Radionukliden markiert. Hierzu zählt u.a. dreiwertiges ^{68}Ga aus einem $^{68}\text{Ge}/\text{Ga}$ -Generatoreluat. Bevorzugt ist der Chelator mit einem Gallium-Radioisotop aus der Gruppe ^{65}Ga , ^{66}Ga , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{72}Ga markiert.

Die Erfindung wird im Folgenden anhand von Zeichnungen näher erläutert. Dabei zeigen:

- Fig. 1 1,4,7,10-Tetraazacyclododekan-1,4,7,10-tetraessigsäure (DOTA) und 1,4,7-Triazacyclononan-1,4,7-triessigsäure (NOTA);
- Fig. 2 eine schematische Darstellung der Zielstruktur mit zwei, über den Chelator verbrückten Targetingvektoren;
- Fig. 3a Allgemeine Strukturformeln der erfindungsgemäßen Chelatoren
- Fig. 3b Kopplungsmöglichkeiten von zwei Targetingvektor-beinhaltenen Resten R an 9-Ring-Chelatoren;
- Fig. 3c Kopplungsmöglichkeiten von zwei Targeting-Vektor beinhaltenen Resten R an 10-Ring-Chelatoren;
- Fig. 3d Kopplungsmöglichkeiten von zwei Targeting-Vektor beinhaltenen Resten R an 12-Ring-Chelatoren;
- Fig. 4 einen auf Cyclen basierenden Ansatz gemäß Beispiel 1, wobei die beiden Komplexbildenden Carboxyldonoren sind an sich gegenüberliegenden Ringstickstoffatome gebunden. Als Spacer dient eine 3-Oxapentylkette. Zwei gleiche Aminosäuren werden als Targetingvektoren verwendet. Die nicht spezifizierten Reste R bestehen aus Wasserstoff;
- Fig. 5 einen weiteren auf Cyclen basierenden Ansatz gemäß Beispiel 2, wobei die beiden Komplexbildenden Carboxyldonoren wiederum an sich gegenüberliegenden Ringstickstoffatome gebunden sind. Als Spacer dient wiederum eine 3-Oxapentylkette. Im Gegensatz zu Beispiel 1 werden hier zwei verschiedene Aminosäuren als Targetingvektoren verwendet. Es handelt sich um einen symmetrischen sechszähligen Chelator mit zwei verschiedenen Aminosäuren L-

Tyrosin und L-Serin. L-Tyrosin ist darüber hinaus über eine Aryl-Alkyletherfunktion, das L-Serin über eine Alkyl-etherfunktion an den Spacer gekoppelt;

Fig. 6 einen Ansatz gemäß Beispiel 3, bei dem keine Aminosäuren als TV eingesetzt werden. Auf Basis des 1,4,7-Triazacyclononans, bei dem die 3 Ringstickstoffatome nicht symmetrisch alkyliert sind, dienen hier zwei Desoxyglukose-Derivate als TV. Dieser auf NOTA basierende Chelator weist eine Acetat-Gruppe und zwei Phenylacetat-Gruppen, Thioharnstofflinker und zwei Desoxyglukose-Derivate als Targetingvektoren auf. Während die Position 1 einen einfachen Donorrest auf Basis der Essigsäure enthält, sind die Substituenten in Position 4 und 7 verzweigt, um die Anbindung eines TV zu ermöglichen. Als Spacer dient in diesem Fall der planare Phenylring, in dessen Position 4 der reaktive Isothiocyanat/Thioharnstofflinker steht. Als Targetingvektor dienen in diesem Fall die terminal über Spacer und Linker an zueinander benachbarten Stickstoffatomen angebrachten Glukoseeinheiten. Die nicht spezifizierten Reste R bestehen in diesem Fall ebenfalls aus Wasserstoff; und

Fig. 7 eine Kombination zweier orthogonal adressierbarer Linkerfunktionen gemäß Beispiel 4, die die Einführung zweier identischer oder voneinander verschiedener TV ermöglichen. Zwei L-Lysin-TV sind über einen Ethyl-Phenyl-Spacer und eine Isothiocyanat/Thioharnstofffunktion direkt mit dem Rückgrat des makrozyklischen Polyamins verbunden, während zwei weitere L-Tyrosin-TV über einen Propylspacer mit einem 1,2,3-Triazollinker aus einer Huisgen-1,3-dipolaren Cycloaddition an den Chelator gekoppelt wurden. Somit wurden zwei voneinander verschiedene Targetingvektoren jeweils dimerartig mit dem Chelator verknüpft. Die nicht spezifizierten Reste R bestehen in diesem Fall aus Wasserstoff. Es handelt sich um DO2A mit zwei L-Tyrosin-TV (verknüpft über eine Huisgen-1,3-dipolare Cycloaddition) und zwei L-Lysin-TV, die über eine backbone-Verzweigung mit Thioharnstofflinkern gekoppelt sind.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen unterscheiden sich von bekannten Verbindungen, wie sie z.B. in „Improving Tumor Uptake and Pharmacokinetics of ⁶⁴Cu-Labeled Cyclic RGD

Peptide Dimers with Gly₃ and PEG₄ Linkers"; Jiyun Shi[†], Young-Seung Kim[†], Shizhen Zhai[†], Zhaofei Liu[‡], Xiaoyuan Chen[‡] and Shuang Liu^{*†}; Publication Date (Web): March 25, 2009 DOI: 10.1021/bc800455p, offenbart sind, durch die Verzweigung am Chelator mit zwei bioaktiven Molekülen bzw. Targetingvektoren. Erfindungsgemäß werden zwei direkt am Chelator lokalisierte Funktionen bereitgestellt, wobei die beiden Funktionen aufgrund der strukturellen Kombination Spacer-Linker-Targetingvektor unabhängig voneinander ausgebildet sein können. Die strukturelle Kombination Spacer-Linker-Targetingvektor vergrößert den Abstand zwischen den beiden Targetingvektoren in beträchtlichem Maße und gestattet es, die Funktionen der beiden Targetingvektoren unabhängig voneinander auszubilden.

Die Funktionalität der erfindungsgemäßen Verbindung zeigt sich in Zellexperimenten anhand ihrer spezifischen Anreicherung.

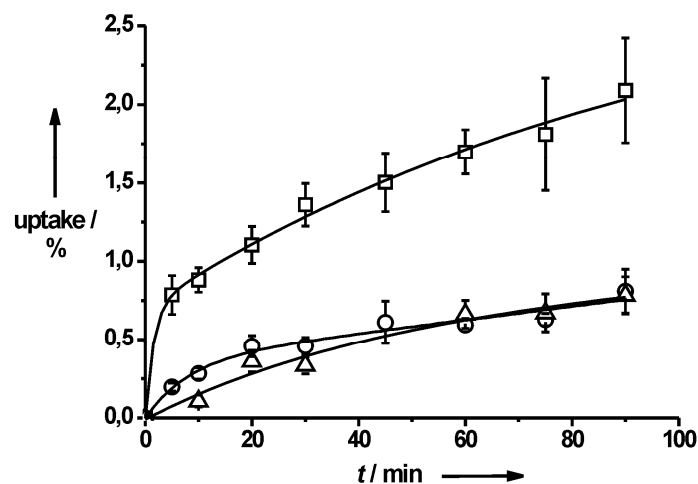


Fig. 8: Aktivitätsanreicherung von [⁶⁸Ga]Ga-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,7-diessigsäure-4,10-di-(O-butyl)-L-tyrosin in F98-Glioblastomzellen

In Fig. 8 ist der zeitliche Verlauf der Aktivitätsanreicherung in F98-Glioblastomzellen wiedergegeben. Man erkennt die Anreicherung von [⁶⁸Ga]Ga-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,7-diessigsäure-4,10-di-(O-butyl)-L-tyrosin (zugehörige Meßpunkte sind als Quadrate dargestellt), sowie die Anreicherung von [⁶⁸Ga]Ga-DO2A (Kreise) zur Bestimmung der unspezifischen Anreicherung. Im weiteren zeigt Fig. 8 die Resultate eines Blockexperiments

(zugehörige Meßpunkte sind als Dreiecke dargestellt), in dem durch Zugabe einer Mischung aus L-Serin, L-Tryptophan und 2-aminobicyclo(2,2,1)heptan-2-carbonsäure (BCH) (jeweils 5 mM) die Anreicherung von [^{68}Ga]Ga-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,7-diessigsäure-4,10-di-(O-butyl)-L-tyrosin auf das Niveau von [^{68}Ga]Ga-DO2A verringert werden konnte.

Ausführungsbeispiele:

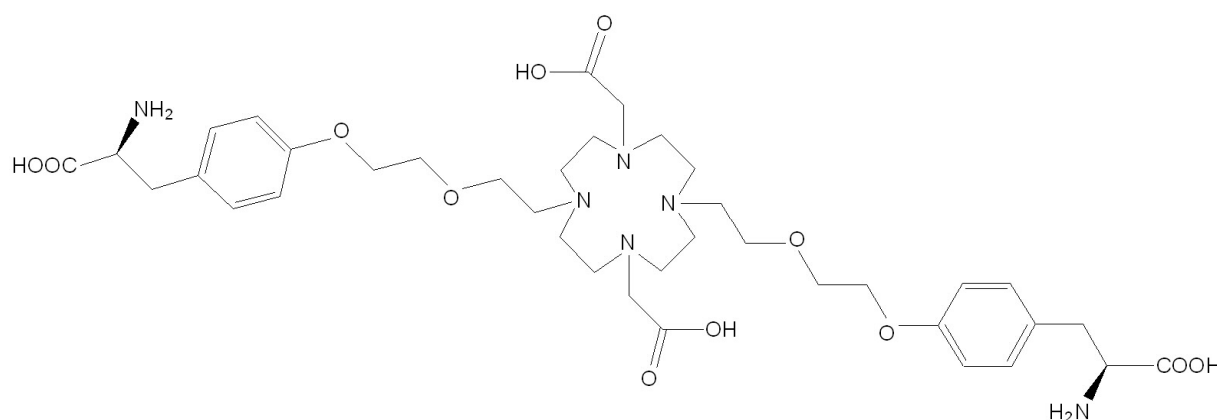


Fig. 4

Beispiel 1

zeigt in Fig. 4 einen auf Cyclen basierenden Ansatz. Die beiden komplexbildenden Carboxyldonoren sind an sich gegenüberliegenden Ringstickstoffatome gebunden. Als Spacer dient wiederum eine 3-Oxapentylkette. Zwei gleiche Aminosäuren werden als Targetingvektoren verwendet. Die in Fig. 4 nicht spezifizierten Reste R bestehen aus Wasserstoff.

Die Markierungsvorläufer sind aus kommerziell erhältlichen Chemikalien aufgebaut, die in lehrbuchbekannten (vgl. z. B. K Schwetlick, Organikum, Wiley VCH: Heidelberg (2009); Science of Synthesis, Thieme: Stuttgart, 2002-2009) Routineschritten, z. B. durch nukleophile Substitutionen, miteinander umgesetzt werden.

Beispielhaft für die erfindungsgemäßen Verbindungen sind die $^1\text{H-NMR}$ Daten, aufgenommen mit einem Bruker AC 200 FT-NMR, für das in Fig. 4 gezeigte Ausführungsbeispiel 1 angegeben.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, D_2O): δ (in ppm) 7.21 (d, $J = 8$ Hz, 4H; $\text{O-C}_{\text{Ar}}\text{-C}_{\text{Ar}}\text{H}$), 6.94 (d, $J = 8$ Hz, 4H; $\text{CH}_2\text{-C}_{\text{Ar}}\text{-C}_{\text{Ar}}\text{H}$), 4.22 (dd, $J = 6$ Hz, $J = 7$ Hz, 2H; CH-NH_2), 4.18-4.12 (m, 4H; $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-O-CH}_2$), 3.95-3.88 (m, 4H; $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2$), 3.83-3.78 (m, 4H; $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$), 3.57-3.50 (m, 4H; $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$), 3.46 (s, 4H; $\text{CH}_2\text{-COOH}$), 3.50-3.35 (m, 8H; $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2\text{-COOH}$), 3.22 (dd, $J = 6$ Hz, $J = 15$ Hz, 2H; $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-CH}_2\text{-CH}$) 3.12 (dd, $J = 7$ Hz, $J = 15$ Hz; $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-CH}_2\text{-CH}$), 3.10-2.91 (m, 8H; $\text{CH}_2\text{-N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$)

Beispiel 2

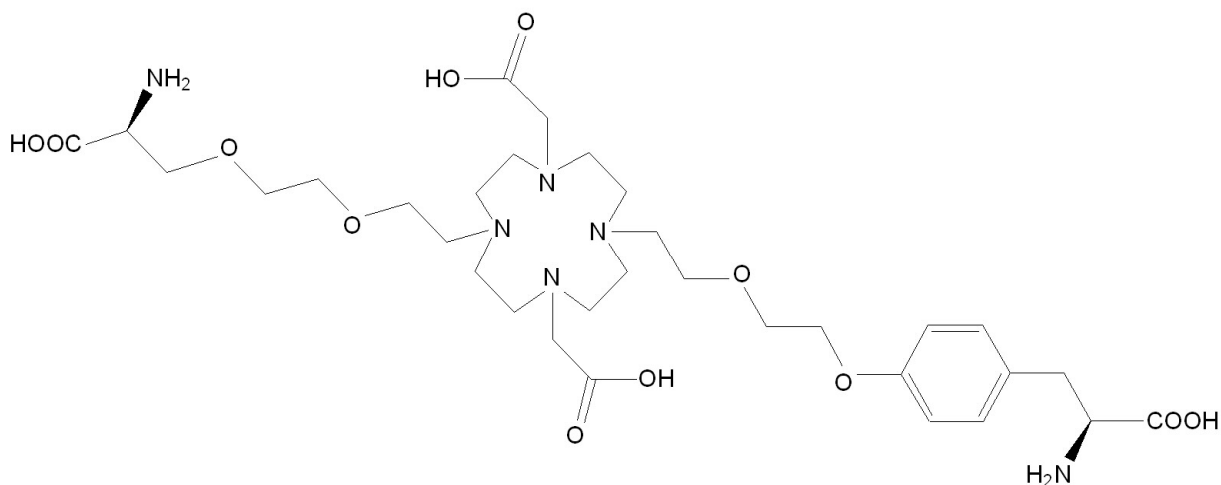


Fig. 5

zeigt in Fig. 5 einen auf Cyclen basierenden Ansatz. Die beiden komplex-bildenden Carboxyldonoren sind wiederum an sich gegenüberliegenden Ringstickstoffatome gebunden. Als Spacer dient wiederum eine 3-Oxapentylkette. Im Gegensatz zu Beispiel 1 werden hier zwei verschiedene Aminosäuren als Targetingvektoren verwendet. L-Tyrosin ist darüber hinaus über eine Aryl-Alkyletherfunktion, das L-Serin über eine Alkyl-etherfunktion an den Spacer gekoppelt.

Es handelt sich um einen symmetrischen sechszähligen Chelator mit zwei verschiedenen Aminosäuren L-Tyrosin und L-Serin (s. Fig. 5).

Beispiel 3

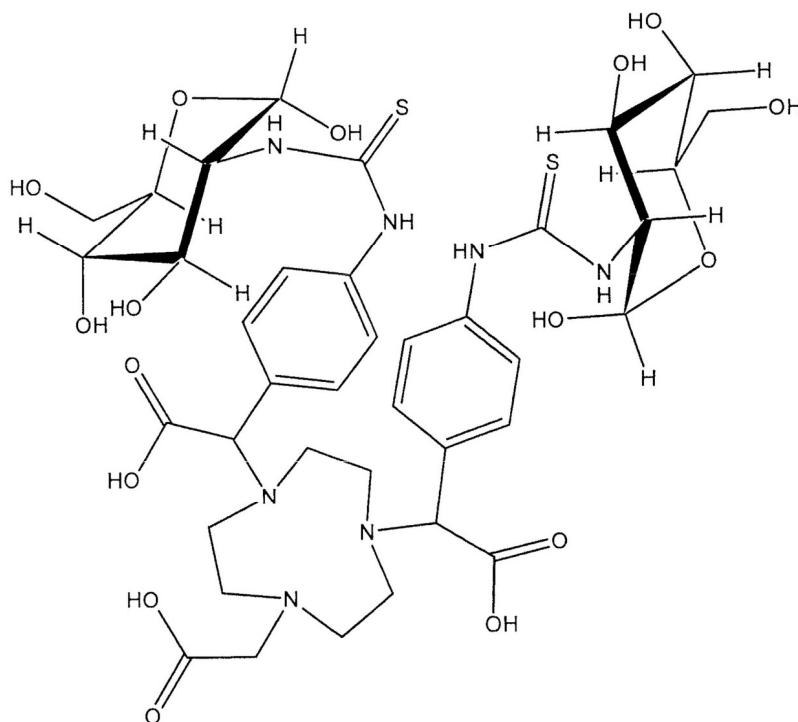


Fig. 6

zeigt in Fig. 6 einen alternativen Ansatz bei dem keine Aminosäuren als TV eingesetzt werden. Auf Basis des 1,4,7-Triazacyclononans, bei dem die 3 Ringstickstoffatome nicht symmetrisch alkyliert sind, dienen hier zwei Desoxyglukose-Derivate als TV. Während die Position 1 einen einfachen Donorrest auf Basis der Essigsäure enthält, sind die Substituenten in Position 4 und 7 verzweigt, um die Anbindung eines TV zu ermöglichen. Als Spacer dient in diesem Fall der planare Phenylring, in dessen Position 4 der reaktive Isothiocyanat/Thioharnstofflinker steht. Als Targetingvektor dienen in diesem Fall die terminal über Spacer und Linker an zueinander benachbarten Stickstoffatomen angebrachten Glukoseeinheiten. Die in Fig. 6 nicht spezifizierten Reste R bestehen in diesem Fall ebenfalls aus Wasserstoff.

Dieser auf NOTA basierende Chelator weist eine Acetat-Gruppe und zwei

Phenylacetat-Gruppen, Thioharnstofflinker und zwei Desoxyglukose-Derivate als Targetingvektoren auf (s. Fig. 6).

Beispiel 4

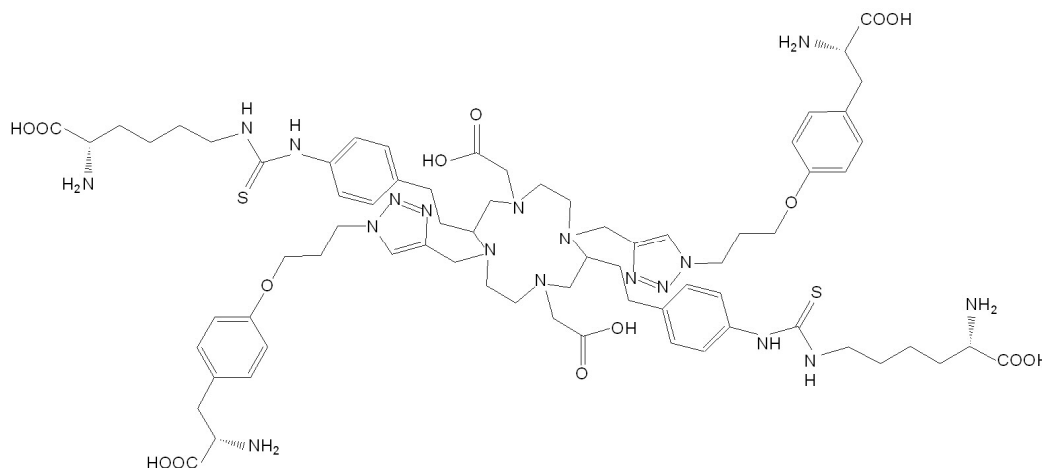


Fig. 7

zeigt in Fig. 7 die Kombination zweier orthogonal adressierbarer Linkerfunktionen, die die Einführung zweier identischer oder voneinander verschiedener TV ermöglichen. Zwei L-Lysin-TV sind über einen Ethyl-Phenyl-Spacer und eine Isothiocyanat/Thioharnstofffunktion direkt mit dem Rückgrat des makrozyklischen Polyamins verbunden, während zwei weitere L-Tyrosin-TV über einen Propylspacer mit einem 1,2,3-Triazollinker aus einer Huisgen-1,3-dipolaren Cycloaddition an den Chelator gekoppelt wurden. Somit wurden zwei voneinander verschiedene Targetingvektoren jeweils dimerartig mit dem Chelator verknüpft. Die in Fig. 7 nicht spezifizierten Reste R bestehen in diesem Fall aus Wasserstoff. Es handelt sich um DO2A mit zwei L-Tyrosin-TV (verknüpft über eine Huisgen-1,3-dipolare Cycloaddition) und zwei L-Lysin-TV, die über eine backbone-Verzweigung mit Thioharnstofflinkern gekoppelt sind (s. Fig. 7).

Patentansprüche:

1. Verbindung aus einem Metallion und einem Markierungsvorläufer, dadurch gekennzeichnet, dass der Markierungsvorläufer aus einem bifunktionellen, makrozyklischen Chelator und zumindest zwei, über Kopplungseinheiten mit dem Chelator verbundenen Targetingvektoren aufgebaut ist.
2. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Metallion ein Radionuklid ist.
3. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der makro-zyklische Chelator 9-, 10-, 11-, 12-, 13-, 14-, 15- oder 16-gliedrige Polyazamakrozyklen umfasst.
4. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Chelator ein makrozyklisches Polyamin ist, das an allen Stickstoffatomen substituiert ist, wobei das zentrale Metallion mit den benachbarten Stickstoffatomen 5-Ring-Chelate bildet.
5. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Chelator ein makrozyklisches Polyamin ist, das an allen Stickstoffatomen substituiert ist, wobei das zentrale Metallion mit den benachbarten Stickstoffatomen 6-Ring-Chelate bildet.
6. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass an den Chelator zwei oder mehrere Kombinationen aus Kopplungseinheit und Targetingvektor gebunden ist.
7. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass jede Kombination aus Kopplungseinheit und Targetingvektor an den Chelator jeweils über verschiedene Ringstickstoff-Atome und / oder verschiedener Kohlenstoffatome des Chelators gebunden ist.

8. Verbindung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass der Chelator komplexbildende Donoren aus der Gruppe CNHOH, CSOH, COOH, CH₂OH, CH₂SH, PO(OH)₂, CH₂SO₃H enthält.
9. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 5 und 8, dadurch gekennzeichnet, dass ein Chelator verwendet wird, der aus Polyaminopolycarbonsäuren und gegebenenfalls komplexbildenden Donoren aus der Gruppe CNHOH, CSOH, COOH, CH₂OH, CH₂SH, PO(OH)₂, CH₂SO₃H aufgebaut ist.
10. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, 8 und 9, dadurch gekennzeichnet, dass ein Chelator verwendet wird, der aus Polyaminopolycarbonsäuren aufgebaut ist, die zusätzlich oder anstelle einer oder mehrerer Carbonsäureeinheiten auch SH-Gruppen enthalten.
11. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die an der Ringstruktur des makrozyklischen Polyamins substituierten Reste R aus der Gruppe umfassend Wasserstoff, Alkyl, Aryl, Heteroaryl, Alkenyl, Alkynyl, Kombination aus Kopplungseinheit/Targetingvektor ausgewählt sind.
12. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass alle Reste R identisch oder verschieden voneinander sind.
13. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Spacer aus linearen, verzweigten oder heterosubstituierten, gesättigten, ungesättigten oder aromatischen Kohlenwasserstoffen aller Oxidationsstufen oder aus Zuckern aufgebaut ist.
14. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Spacer eine lineare, verzweigte oder heterosubstituierte Alkyl-, Alkylen, Alkyliden-, Aryl-, Polyether -oder Peptidkette ist, die kovalent unter Beibehaltung ihrer Aminofunktionalität gebunden ist.

15. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Spacer eine 3-Oxapentylkette, ein Phenylring, eine 2-Phenyl-Acetat-Gruppe oder eine Ethyl-Phenyl-Gruppe ist.

16. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Linker als funktionelle Gruppe eine aliphatische oder aromatische Amino-, Hydroxy-, Mercapto-, Alken-, Alkin, CO₂H-, CONH₂, CNOH-, Epoxy-, NCS-, COOH-, Aktivester-, NCO-, COX-, B(OH)₂-, Maleinimid-, PR₃-, P(OR)₃-Gruppe, Isothiocyanat/Thioharnstoff oder analoge Gruppen enthält.

17. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Linker eine Abgangsgruppe I, Cl, Br, OTs, OMs, OTf, ONf, ONs enthält.

18. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass sowohl Spacer als auch Linker aus Kombinationen mehrerer Atome, Moleküle, funktioneller Gruppen und Abgangsgruppen aufgebaut sind.

19. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der oder die Targetingvektor(en) aus proteinogenen oder künstlichen Aminosäuren, die jeweils eine α -Amino-Carbonsäure-Gruppe aufweisen, aufgebaut ist bzw. sind.

20. Verbindung nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass die Seitenketten der proteinogenen und künstlichen Aminosäuren neutral als auch polar, aromatisch oder aliphatisch sind und Amino-, Carboxyl- und Hydroxygruppen beinhalten.

21. Verbindung nach den Ansprüchen 19 und 20, dadurch gekennzeichnet, dass zwei oder mehrere Aminosäuren als Targetingvektoren in dem Markierungsvorläufer vorhanden sind und dass diese Aminosäuren-Targetingvektoren identisch oder voneinander verschieden sind.
22. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der oder die Targetingvektor(en) aus der Gruppe anorganischer Komponenten wie beispielsweise Bisphosphonate, Zucker, DNA-Komponenten, Hypoxie-Tracern, Zellmembran-Komponenten, Glutamin oder ähnlichen biologisch aktiven Strukturen besteht bzw. bestehen.
23. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der oder die Targetingvektor(en) aus der Gruppe der Liganden extra- oder interzellulärer Enzyme oder Rezeptoren besteht bzw. bestehen.
24. Verbindung nach einem der Ansprüche 2 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass der Chelator mit zwei-, drei- oder vierwertigen metallischen Radionukliden markiert ist.
25. Verbindung nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass das Radionuklid metallisches dreiwertiges ^{68}Ga aus einem $^{68}\text{Ge}/\text{Ga}$ -Generatoreluat ist.

26. Verbindung nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass der Chelator mit mindestens einem der Gallium-Radioisotope ^{65}Ga , ^{66}Ga , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{70}Ga oder ^{72}Ga markiert ist.

27. Verbindung nach einem der Ansprüche 19 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass die verschiedenen Targetingvektoren das gleiche oder verschiedene biologische Target(s) adressieren.

28. Verwendung der Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 27 zum Abbilden von Tumorgewebe mittels der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) oder der Single-Photon-Emission-Computed-Tomography (SPECT), durch selektive Anreicherung des Metallkomplexes der Verbindung in dem zu untersuchenden Tumorgewebe in vivo.

29. Verwendung der Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 27 zum Bestrahlen von Zielgewebe durch systemisches oder direktes Einbringen der Verbindung in das Zielgewebe.

30. Verwendung der Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 27 zum Abbilden von Herz-, Blutgefäß-, Hirn-, Nieren-, Lungen-, Leber-, Pankreas-, Prostata- und Drüsengewebe sowie Knochen mittels PET.

31. Verwendung der Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 27 zum Abbilden von Veränderungen in einem Zielgewebe mittels PET.

32. Verwendung der Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 27 zum Abbilden von pharmakokinetischen Vorgängen in einem Zielgewebe mittels PET.

33. Verwendung der Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 27 für bildgebende Verfahren oder zur Herstellung eines therapeutischen Mittels.

34. Verwendung der Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 27 unter Einsatz von markierten Strukturen wie Polymeren, Kolloiden, Nanopartikeln.

Zusammenfassung

Verbindung aus einem Metallion und einem Markierungsvorläufer mit zwei oder mehreren Targetingvektoren und Verwendung der Verbindung

Beschrieben ist eine Verbindung aus einem Metallion bzw. Metall, beispielsweise Radiopharmakon aus einem metallischen Radionuklid und einem Markierungsvorläufer, der aus einem bifunktionellen, makrozyklischen Chelator, einem Spacer, einem Linker und mindestens zwei Targetingvektoren aufgebaut ist. Der Chelator umfasst dabei vorzugsweise einen 9-, 10-, 11-, 12-, 14- oder 16-gliedrigen Polyazamakrozyklus, vorzugsweise weitere komplexbildende Donoren. Der Spacer ist vorzugsweise aus linearen, verzweigten oder heterosubstituierten, gesättigten, ungesättigten oder aromatischen Kohlenwasserstoffen oder aus Zuckern aufgebaut. Targetingvektoren sind bevorzugt proteinogene oder künstliche α -Amino-Carbonsäuren. Die metallischen Radionuklide sind vorzugsweise 2-, 3- oder 4-wertig, wobei die Gallium-Radioisotope ^{65}Ga , ^{66}Ga , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{70}Ga und ^{72}Ga bevorzugt sind. Das Radiopharmakon eignet sich zur nuklearmedizinischen Diagnostik von Tumoren durch Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und durch Single-Photon-Emission-Computed-Tomographie (SPECT). Bei der Endo-Radiotherapie (ERT) wird das Radiopharmakon direkt oder systemisch in das Zielgewebe eingebracht.

2.3 „[⁶⁸Ga]Ga-DO2A-(Obu-L-tyr)₂: Synthesis, ⁶⁸Ga-radiolabeling and in vitro studies of a novel ⁶⁸Ga-DO2A-tyrosine derivative as potential tumor tracer for PET”

[⁶⁸Ga]Ga-DO2A-(Obu-L-tyr)₂: Synthesis, ⁶⁸Ga-radiolabeling and in vitro studies of a novel ⁶⁸Ga-DO2A-tyrosine derivative as potential tumor tracer for PET

Carsten Burchardt^{a,#}, Patrick J. Riss^{a,#}, Frederic Zoller^a, Simone Maschauer^b, Olaf Prante^b, Torsten Kuwert^b, Frank Roesch^a

^aJohannes Gutenberg-University Mainz, Institute of Nuclear Chemistry, Fritz-Strassmann-Weg 2, 55128 Mainz, Germany

^bFriedrich-Alexander University, Laboratory of Molecular Imaging, Clinic of Nuclear Medicine, Schwabachanlage 6, 91054 Erlangen, Germany

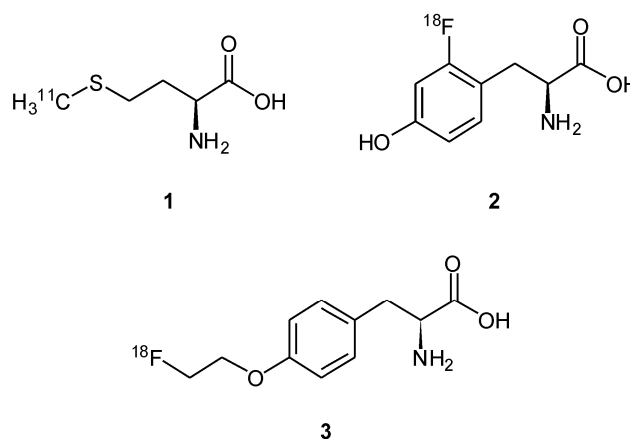
These authors have contributed equally to this work

Abstract

The synthesis, ⁶⁸Ga-labeling and in vitro study of the novel tyrosine chelate derivative [[⁶⁸Ga]Ga^{III}-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,7-diacetic acid-4,10-di-(*O*-butyl)-L-tyrosine]⁺ ([⁶⁸Ga]Ga-DO2A-(Obu-L-tyr)₂) as a potential tracer for imaging tumor metabolism by positron emission tomography (PET) is presented. This approach combines the biological amino acid transporter targeting properties of L-tyrosine with the outstanding availability of ⁶⁸Ga^{III} via the ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga generator. In vitro studies utilizing the F98-glioblastoma cell line revealed specific uptake of [⁶⁸Ga]Ga-DO2A-(Obu-L-tyr)₂ that was comparable to that of the reference *O*-(2-[¹⁸F]fluoroethyl)-L-tyrosine (FET). These promising results indicate a high potential of [⁶⁸Ga]Ga-DO2A-(Obu-L-tyr)₂ for molecular imaging of tumor-driven amino acid uptake by PET.

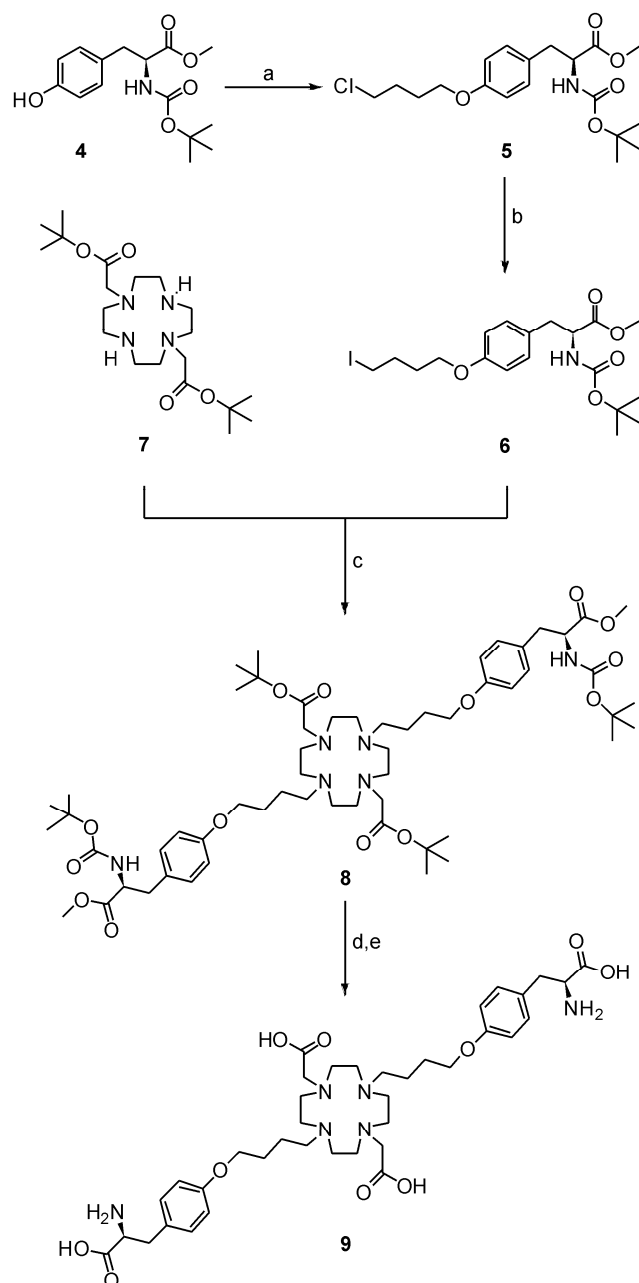
Introduction

The influx of amino acids into proliferating cells is mediated by specific transmembrane transporters, e.g. the sodium-dependending systems A and ASC or the sodium-independent system L.¹ To meet the need of rapidly proliferating tumors for, in particular, the non-endogeneous amino acids, amino acid transport systems are overexpressed in naturally occurring neoplasms as well as in certain tumor cell lines.² This biochemical process can be visualized in vivo with positron emission tomography (PET), a quantitative modality of molecular imaging.³ Various positron-emitter labeled amino acids have already been studied to probe the uptake and incorporation of amino acids into functional proteins as well as the amino acid transporter expression.^{4,5} One attempt to visualize intracellular protein synthesis rate utilized L-[¹¹C-methyl]-methionine (**1**, MET), isotopically labeled with carbon-11.⁶ Taking the limited availability of carbon-11 in a clinical context into account, 2-[¹⁸F]fluoro-L-tyrosine (**2**) was synthesized. The prolonged half-life of ¹⁸F results in the capability to distribute the tracer to satellite PET sites. Due to the electrophilic production route, this tracer did not find systematic applications.⁷



Scheme 1: Structural formulas of the radiolabeled amino acids L-[¹¹C-methyl]-methionine (**1**, MET), 2-[¹⁸F]fluoro-L-tyrosine (**2**) and *O*-(2-[¹⁸F]fluoroethyl)-L-tyrosine (**3**, FET)

Further improvements involved *O*-(2-[¹⁸F]fluoroethyl)-L-tyrosine (**3**, FET), a tracer that is not incorporated into proteins and thus solely reflects amino acid transport, being readily available via nucleophilic fluorination.⁸ The structural formulas of MET, 2-[¹⁸F]fluoro-L-tyrosine, and FET are shown in scheme 1.



Scheme 2. Synthesis route to the labeling precursor **9**. Reagents and conditions: a) 1-bromo-4-chlorobutane, K_2CO_3 , acetone, reflux, 91 % yield, b) NaI, acetone, 94 %, c) *N,N*-diisopropylethylamine, MeCN, 60 °C, 42 % yield d) 1 M NaOH/dioxane e) TFA, 60 % yield (over two steps)

It was found that incorporation of the radiolabeled amino acids into proteins is not a prerequisite for visualization of tumors *in vivo* by PET. Instead, successful targeting of amino acid transporters appeared to be sufficient for imaging proliferating tumor cells mainly due to enhanced amino acid transport.⁹ The acceptance of the above mentioned artificial amino acid FET by amino acid carriers indicates a principal structural tolerance among the variety of

amino acid transport systems. In an extension of this concept, we hypothesize that amino acid transporters may tolerate a conjugation of even more complex structural components. This may in particular create the option to introduce chelators to the amino acids, e. g. for radiolabeling with metallic radionuclides such as ^{68}Ga , a promising positron emitter derived from the commercially available $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -radionuclide generator.¹⁰

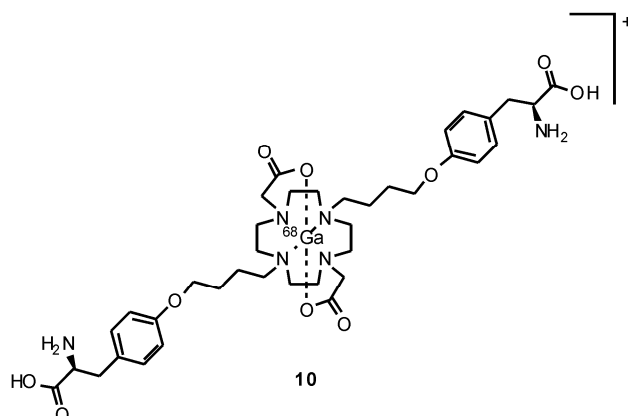
^{68}Ga exhibits a high positron abundance of 89% and a half-life (^{68}Ga , $t_{1/2} = 1,13$ h) well suited for PET. The relation between mothers (^{68}Ge , $t_{1/2} = 270,8$ d) and daughters half-life provides the possibility to elute $^{68}\text{Ga}^{\text{III}}$ as $^{68}\text{Ga}^{\text{III}}\text{Cl}_3$ from the generator several times a day for about one year. Due to this fact generator nuclides provide increased availability and significant cost reduction compared to the cyclotron-produced nuclides. However, the challenge in preparing (radio)metal-containing amino acids with retained biological activity is to develop an appropriate synthetic strategy. As in the case of metals covalent binding to amino acid structures directly is not an option, the additional introduction of bifunctional chelate ligands may represent an alternative approach.¹¹ L-Tyrosine appears to be a promising lead for the introduction of a chelating moiety, due to the free aromatic hydroxyl group, tolerating chemical modification as shown for FET.

In this study, we report the feasibility of generating a $^{68}\text{Ga}^{\text{III}}$ -labeled tyrosine derivative that reveals specific uptake in glioblastoma cells in vitro. Various different approaches to couple targeting molecules to a macrocyclic ligand have been reported so far.¹² We herein describe for the first time, to our knowledge, the utility of the two ring-nitrogen atoms of 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,7-diacetic acid (DO2A) to attach two tyrosine moieties via an alkyl spacer to the chelate. With this setup we intend to increase the intramolecular amino acid concentration of the compounds, while maintaining the overall molecular weight in a reasonable range.

The synthesis route to the precursor **9** is shown in scheme 2. The *tert*-butyl-protected DO2A (**7**) was synthesized in three steps starting from cyclen with an overall yield of 68%.¹³ We incorporated two L-tyrosine moieties to form a bivalent Ga-tyrosine-conjugate. To compensate for potential affinity-decreasing side effects of a bulky and charged Ga^{III} -chelate, we inserted a butyl spacer unit between the hydroxyl group of L-tyrosine and a ring-nitrogen of the macrocyclic chelator.

The methylester, *tert*-butylester and BOC protective groups of **8** were subsequently cleaved employing standard reaction conditions. Purification of the resulting labeling precursor **9** was performed by HPLC, and the TFA-salts were removed using an ion-exchange resin.¹⁴

⁶⁸Ga-labeling of the precursor was carried out in aqueous solution at 90 °C with 50 ml ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga-generator eluate, containing purified no carrier added ⁶⁸Ga^{III}Cl₃.¹⁵ The labeled product (Scheme 3) was obtained in 94±2% yield after 5 minutes.



Scheme 3: Structural formula of [⁶⁸Ga]Ga-DO2A-(Obu-L-tyr)₂.¹⁶

The time dependency of labeling yields for [⁶⁸Ga]Ga^{III}-**9** is given in Figure 1. The radiochemical purity after solid phase extraction was greater than 98 % as analyzed by radio-TLC and radio-HPLC.

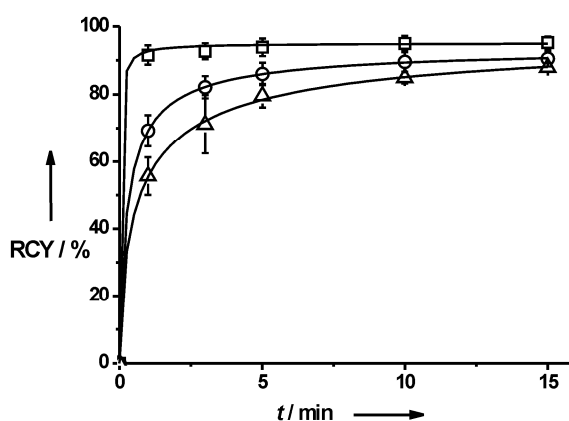


Figure 1: Radiochemical yields (RCY) of labeling of DO2A-(Obu-L-tyr)₂ (**9**) with ⁶⁸Ga at three different temperatures (90 °C (squares), 70 °C (circles), 50 °C (triangles)) in aqueous solution. Labeling yields are given as mean values (%) ± standard deviation.

The radiolabeled product was formulated in phosphate-buffered saline (PBS) buffer (pH = 7,4), and sterile-filtered prior to application. Stability of the $^{68}\text{Ga}^{\text{III}}$ -labeled complex **10** was proven in a diethylenetriamine-penta-acetic acid (DTPA)- and a transferrin challenge experiment at 37 °C for two hours, indicating adequate stability with about 99% of $^{68}\text{Ga}^{\text{III}}$ -labeled DO2A-(Obu-L-tyr)₂ remaining intact within this period of time (Figure 2).

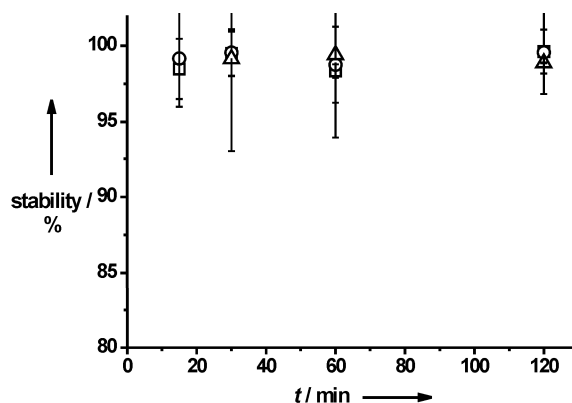


Figure 2. Challenge experiment of [^{68}Ga]Ga-DO2A-(Obu-L-tyr)₂ with 10 ml of two concentrations of DTPA (1 mmol, 750-fold excess; squares; 1 mmol, 0.75 eq., circles) and 5 ml transferrin solution (1 mmol, 375-fold excess, triangles) at 37 °C over 120 minutes (n=3). Stability values were expressed as mean values of intact tracer (%) \pm standard deviation.

In vitro studies for the determination of specific uptake of the novel tracer **10** were performed utilizing the F98 rat glioblastoma cell line. This in vitro model has been successfully used previously in various studies aimed at characterizing amino acid transport of tracers.¹⁷ The time-course of uptake was followed over 90 minutes (Fig. 3), using the experimental methods described previously.¹⁸

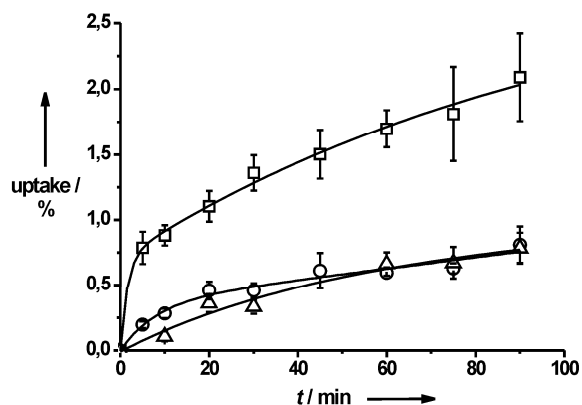


Figure 3. a) Total uptake of **10** to F98 glioblastoma cells at 4 °C (squares, n=6) b) Non-specific binding determined as cellular uptake of $^{68}\text{Ga}^{\text{III}}$ -labeled DO2A (circles, n=6), c) Non-specific binding of **10**, determined as uptake of **10** in the presence of the amino acids Trp, Ser, BCH (each 5 mM; triangles, n=3). Uptake values were expressed as mean values (%) \pm standard deviation.

$^{68}\text{Ga}^{\text{III}}$ -labeled DO2A was used to determine non-specific binding of **10** and uptake of [^{18}F]FET was measured as a reference for comparison. The $^{68}\text{Ga}^{\text{III}}$ -labeled derivative **10** showed a continuously increasing cellular uptake over 90 minutes. The total uptake of **10** was reduced to the level of non-specific binding, in the presence of a mixture of L-tryptophan (Trp), L-serine (Ser) and 2-aminobicyclo-(2,2,1)-heptane-2-carboxylic acid (BCH).

These results indicate specific uptake of **10** by F98 cells, presumably due to the interaction with an amino acid transporter.

In order to allow a reasonable comparison between uptake values of the novel compound **10** and [^{18}F]FET as a reference, the tracer uptake was normalized to the protein concentration of each sample determined by the method of Bradford.¹⁷ As shown in Figure 4, [^{18}F]FET and **10** showed specific uptake to F98 rat glioblastoma cells within a similar range.

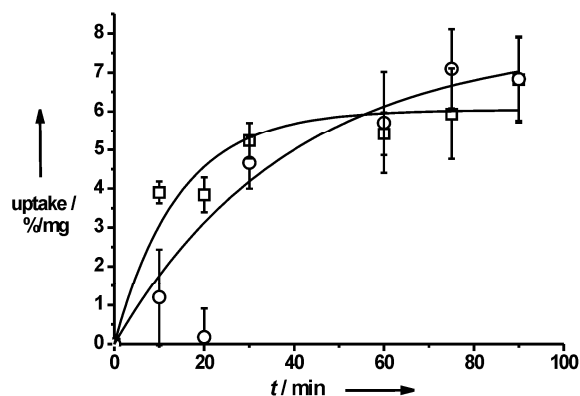


Figure 4. Comparison of the specific binding of [¹⁸F]FET (circles, n=3) and [⁶⁸Ga]Ga-DO2A-(Obu-L-tyr)₂ (squares n=6) to F98 glioblastoma cells at 4 °C. Tracer uptake values were expressed as mean values related to the protein mass (%/mg) ± standard deviation

In conclusion, the presented data illustrate a novel chemical approach to synthesize a metal-containing amino acid derivative with potential for molecular imaging. This study stimulates further work capitalizing on the potential of the positron emitter ⁶⁸Ga or other metals for developing specific probes of amino acid metabolism in tumors. Work is in progress to use **10** for in vivo imaging of F98 glioblastoma-bearing rats by small-animal PET.

Acknowledgments

The authors want to thank the “Fonds der chemischen Industrie” for the generous donation of chemicals and the COST D38 action for networking all over Europe.

References and Notes

1. a) Christensen, H. N. *Physiol. Rev.* **1990**, *70*, 43; b) Souba, W. W.; Pacitti, A. J. *J. Parenter. Enteral Nutr.* **1992**, *16*, 569.
2. Miyagawa, T.; Oku, T.; Uehara, H.; Desai, R.; Beattie, B.; Tjuvajev, J.; Blasberg, R. J. *Cerebr. Blood Flow. Metab.* **1998**, *18*, 500.
3. a) Phelps, M. E. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2000**, *97*, 9226; b) Miller, P. W.; Long, N. J.; Vilar, R.; Gee, A. D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8998.

4. a) Laverman, P.; Boerman, O. C.; Corstens, F. H. M.; Oyen, W. J. G. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Img.* **2002**, *29*, 681; b) Waalburg, W.; Coenen, H. H.; Crouzel, C.; Elsinga, P. H.; Langström, B.; Lemaire, C.; Meyer, G. J. *Nucl. Med. Biol.* **1992**, *19*, 227.
5. Jager, P. L.; Vaalburg, W.; Pruijm, J.; de Vries, E. G. E.; Langen, K. J.; Piers, D. A. *J. Nucl. Med.* **2001**, *42*, 432.
6. a) Langström, B.; Antoni, G.; Gullberg, P.; Halldin, C.; Malmberg, P.; Nagren, K.; Rimland, A.; Svärd, H. *J. Nucl. Med.* **1987**, *28*, 1037; b) Ishiwata, K.; Vaalburg, W.; Elsinga, P. H.; Paans, A. M. J.; Woldring, M. G. *J. Nucl. Med.* **1988**, *29*, 1419.
7. Coenen, H. H.; Kling, P.; Stöcklin, G.; *J. Nucl. Med.* **1989**, *30*, 1367.
8. a) Wester, H. J.; Herz, M.; Weber, W.; Heiss, P.; Senekowitsch-Schmidtke, R.; Schwaiger, M.; Stöcklin, G. *J. Nucl. Med.* **1999**, *40*, 205; b) Hamacher, K.; Coenen, H. H. *Appl. Rad. Isot.* **2002**, *57*, 853.
9. a) McConathy, J.; Martanello, L.; Malveaux, E. J.; Camp, V. M.; Simpson, N. E.; Simpson, C. P.; Bowers, G. D.; Zhang, Z.; Olson, J. J.; Goodman, M. M. *Nucl. Med. Biol.* **2003**, *30*, 477; b) Shoup, T. M.; Olson, J. J.; Hoffman, J. M.; Votav, J.; Eshima, D.; Eshima, L.; Camp, V. M.; Stabin, M.; Votav, D.; Goodman, M. M. *J. Nucl. Med.* **1999**, *40*, 331.
10. a) Roesch, F.; Knapp F. F. In *Handbook of nuclear chemistry*; Vertes, A., Nagy, S., Klencsar, Z., Roesch, F., Eds.; Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 2003, pp 81 – 118; b) Fani, M.; Andre, J. P.; Maecke, H. R. *Contrast Media Mol. I.* **2008**, *3*, 67.
11. Liu, Y.; Pak, J. K.; Schmutz, P.; Bauwens, M.; Mertens, J.; Knight, H.; Alberto, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15996.
12. a) De Leon-Rodriguez, L. M.; Kovacs, Z. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 391; b) Riss, P. J.; Kroll, C.; Nagel, V.; Roesch, F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 5364.
13. Kovacs, Z.; Sherry, A. D. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, *2*, 185.
14. Compound **9** was obtained as a white solid in an overall yield of 13% over eight steps starting from cyclene (scheme 2). **9** was purified by semi-preparative HPLC (Phenomenex® Synergy Max RP 15×250 mm, H₂O/MeOH 90:10, 0,01% TFA). The HPLC-purity (UV₂₅₄) was greater than 99%. Analytical Data of **9** (TFA-salt):
¹H NMR (600 MHz, D₂O): d in ppm 7.08 (4H, d, *J* = 8.5 Hz), 6.82 (4H, d, *J* = 8.5 Hz), 4.04 (dd, *J* = 5.7, *J* = 7.4, 2H), 3.93 (t, *J* = 5.7 Hz, 4H), 3.30 (s, 4H), 3.26-3.21 (m, 8H), 3.15 (m, 4H), 3.09 (dd, *J* = 5.6 Hz, *J* = 14.6 Hz, 2H), 3.03-2.97 (m, 4H), 2.99 (dd, *J* = 7.4, *J* = 14.6, 2H) 2.93-2.85 (m, 4H), 1.73 (p, *J* = 7.5 Hz, 4H), 1.68 (p, *J* = 6.4 Hz, 4H)

MS: (ESI) m/z (%): 380.23 (11.55) [M+2H]²⁺, 380.73 (2.82), 759.46 (100) [M+H]⁺, 760.7 (21.68), 761.48 (1.74)

15. Zhernosekov, K. P.; Filosofov, D.; Baum, R. P.; Aschoff, P.; Bihl, H; Razbash, A. A.; Jahn, M.; Jennewein, M.; Roesch, F. *J. Nucl. Med.* **2007**, *48*, 1741.
16. Reaction details and labeling conditions: To 5 ml preheated aqueous solution of labeling precursor **9** (13 nmol) were added 50 ml purified ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga-generator eluate at 90 °C. The labeling yields were controlled by radio-TLC and radio-HPLC.
17. a) Langen, K. J.; Mühlensiepen, H.; Schmieder, S.; Hamacher, K.; Broer, S.; Börner, A. R.; Schneeweis, F. H. A.; Coenen, H. H. *Nucl. Med. Biol.* **2002**, *29*, 685; b) Langen, K. J.; Jarosch, M.; Mühlensiepen, H.; Hamacher, K.; Broer, S.; Jansen, P., Zilles, K.; Coenen, H. H. *Nucl. Med. Biol.* **2003**, *30*, 501; c) Pauleit, D.; Stoffels, G.; Schaden, W.; Hamacher, K.; Bauer, D.; Tellmann, L.; Herzog, H.; Bröer, S.; Coenen, H. H.; Langen, K. J. *J. Nucl. Med.* **2005**, *46*, 411.
18. Prante, O.; Bläser, D.; Maschauer, S.; Kuwert, T. *Nucl. Med. Biol.* **2007**, *34*, 305.

2.4 „Divalent DO2A-conjugated SUR1-affine derivatives for the non-invasive quantification of the pancreatic β -cell-mass in vivo with ^{68}Ga -related positron-emission-tomography (PET)”

Divalent DO2A-conjugated SUR1-affine derivatives for the non-invasive quantification of the pancreatic β -cell-mass *in vivo* with ^{68}Ga -related positron-emission-tomography (PET)

C. Burchardt¹, M. J. Zimny¹, P. J. Riss^{1,2}, F. Roesch¹

¹Institut of nuclear chemistry, Johannes-Gutenberg University Mainz, Germany

²The Wolfson Brain Imaging Center, University of Cambridge, England

Abstract

Diabetes Mellitus is a mayor disease pattern of the 21st century. Enormous costs are spent every year for the care of this disease. Nevertheless there is no suitable tool for the non-invasive early diagnosis of diabetes mellitus type 1. Positron-emission-tomography (PET), a quantitative modality of molecular imaging, might be a possible option to solve this problem. This technique enables the visualization of biochemical processes *in vivo*. Several ^{11}C - and ^{18}F -labeled potential PET-tracers for the quantification of the pancreatic β -cell mass by targeting the SUR1-receptor, which is highly expressed on the β -cells, have been tested in the past, but all attempts failed. This was mainly due to high protein binding followed by uptake in the liver. The introduction of a bifunctional chelator, like 1,7-diacetic acid-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (DO2A), could be a promising concept to overcome this problem. On one hand it can be labeled with ^{68}Ga , a rapidly emerging generator derived PET-nuclide, on the other hand the introduction of a bifunctional chelator reduces the lipophilicity and simultaneously the uptake in the liver considerably. Furthermore it opens the opportunity to attach two targeting vectors to one bifunctional chelator. This divalent approach has already proven to have a positive influence on the affinities to a specific target. In the presented work six novel DO2A-conjugated SUR1-affine compounds were successfully synthesized and an initial ^{68}Ga -labeling study was performed.

Introduction

Diabetes mellitus is a continuously increasing public health problem. In 2000 about 171 million people were diseased with diabetes mellitus and the number of patients is ought to rise to 366 million people in 2030 [1]. Diabetes results from a decline of pancreatic β -cell mass or an inadequate response of cells to insulin. This is leading to insufficient insulin secretion and hyperglycemia. Diabetes mellitus can be subdivided in two main types. Type 1 diabetes is a chronic autoimmune disease characterized by the selective destruction of insulin-producing β -cells of the islets of Langerhans in the pancreas. Type 2 diabetes in contrast is a relative lack of insulin due to insulin resistance or increased insulin demand. One major problem is that there is no suitable test for the early diagnosis of diabetes mellitus type 1 at the moment. This is even worse, because clinical symptoms like hypoglycemia are just occurring, if 90% of the β -cell mass is already destroyed. For this reason a reliable, non-invasive method for the early diagnosis of diabetes mellitus type 1 would be of high interest for both, research and clinical routine. Additionally this method might help to get a better understanding of the progress of diabetes and to control the treatment e.g. of β -cell mass transplantation. A possible tool to visualize and quantify the β -cell-mass might be the positron-emission tomography (PET), a method with raising importance in the clinical diagnostic and prognostic fields. [2].

The problem in finding a tool to visualize and quantify the β -cell mass is correlated to the (patho-)physiology. There are about 1 Mio. of islets of Langerhans distributed throughout the pancreas and consisting of alpha-, beta (60-85%) and delta-cells. The total weight of all β -cells is only about 0.005 % of a human body [3]. Thus a very high affinity of a potential PET-tracer to the β -cell is essential. Different targets to visualize the β -cells have been introduced in the literature [4]. Another possible target is the K_{ATP} -channel. This channel helps to control the cell membrane potential. Glucose binds to this channel, inhibits it and such depolarizes the membrane. Consequently this opens the voltage-gated Ca^{2+} channels which then allow Ca^{2+} to get into the cell and stimulate the exocytosis of the insulin-containing granules [5]. The K_{ATP} Channel consists of two different subunits: the coreforming subunit Kir 6.2 and the SUR-subunit, which possesses the high-affinity binding side for the sulfonylureas. The isoforms of these subunits are found in different tissue. The K-channel which can be found in β -cells consists of the subunits Kir 6.2 and SUR1 [6]. Some biomolecules, which are used as hypoglycemic drugs, like nateglinide, repaglinide and

glibenclamide have high affinities to the SUR1 and might be used as lead structures for a potential PET-tracer [7]. The structural formulas of these compounds and their affinities are shown in figure 1.

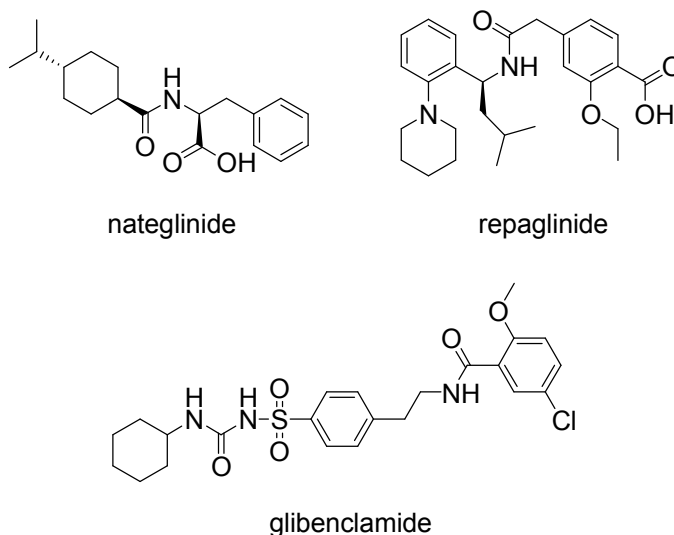


Figure 1: Structural formulas of the antidiabetic drugs nateglinide, repaglinide and glibenclamide.

There have been tries to utilize this molecules labeled with ^{11}C or ^{18}F as a PET tracer [8]. Some examples of these compounds are presented in figure 2. But all the attempts failed, mainly due to the high uptake of the compounds in the liver [9]. To overcome this problems Schneider et al. synthesized a glibenclamide-glucose conjugate and maintaining the high binding affinity while increasing hydrophilicity in order to suppress the unspecific uptake [10]. However, it was not possible to visualize the pancreatic β -cell mass.

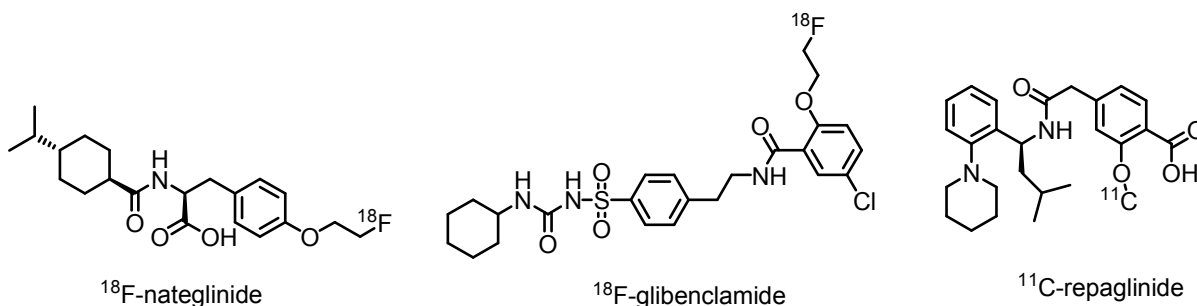


Figure 2: Structural formulas of ^{11}C - and ^{18}F -labeled SUR1 affine derivatives.

A very interesting attempt was introduced by Yang and co-workers, when they attached two nateglinide bearing moieties to DTPA and labeled it with ^{99m}Tc [11]. This divalent approach showed very promising results in small animal studies. But ^{99m}Tc might not be the ideal radionuclide to be used, due to the fact it is not possible to quantify with SPECT.

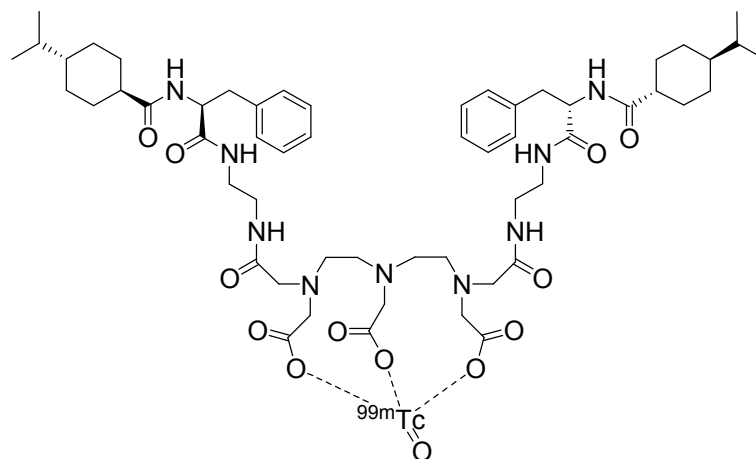


Figure 3: Structural formula of ^{99m}Tc -DTPA-(nateglinide)₂.

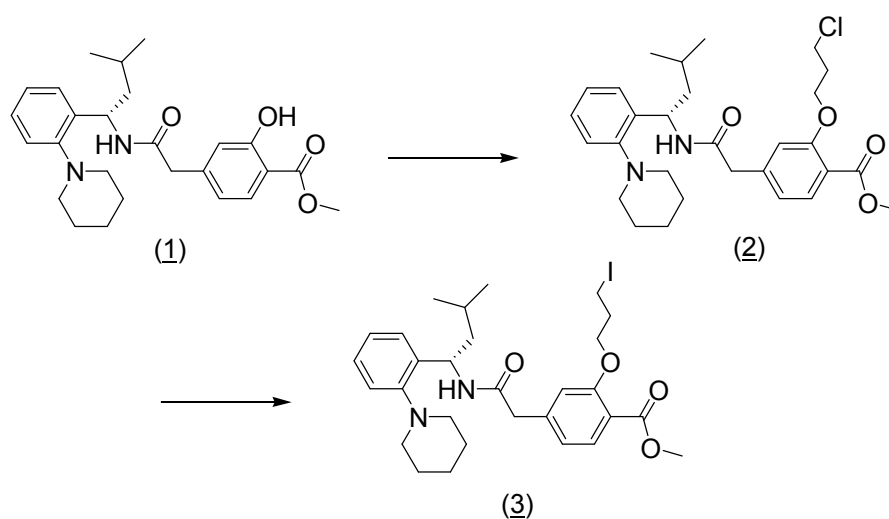
Nevertheless, this should be the way to go, translating the divalent approach to a bifunctional chelator suitable for ^{68}Ga , a rapidly emerging radionuclide for PET [12]. ^{68}Ga combines good radionuclide properties with perfect availability via the $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -radionuclidegenerator system. 1,7-diacetic acid-1.4.7.10-tetraazacyclodecane (DO2A) has shown to be a well-working bifunctional chelator for the divalent approach with ^{68}Ga [13]. DO2A forms monocationic complexes with ^{68}Ga , thus the positive charge of the final molecule also should decrease the lipophilicity. So the di- and mono-derivatives of nateglinide, repaglinide and glibenclamide with DO2A have been synthesized as potential β -cell-imaging agents.

Results and discussion

The bifunctional chelator DO2A was synthesized in high yields following the route of Kovacs and Sherry [14]. To get a better comparison of the compounds, to all molecules the same spacer group was attached. We chose a propyl-spacer, because it is cost-effective, can be synthesized with low synthetic effort and bears different opportunities to be coupled to the

biomolecule. So in an analogue route to reference [13] a iodopropylgroup was attached to all SUR1 affine compounds to couple it with DO2A.

The basic structure of repaglinide (1) was synthesized in 9 steps according to a route previously presented in the literature [15]. In a former study was shown that a replacement of the ethoxy-group from the natural repaglinide is best tolerated structural modification. So the propyl-chain was attached to the phenolic hydroxyl function utilizing 1-bromo-3-chloropropane. The chloro-derivative (2) was converted to the iodo-compound (3) by a Finkelstein exchange.

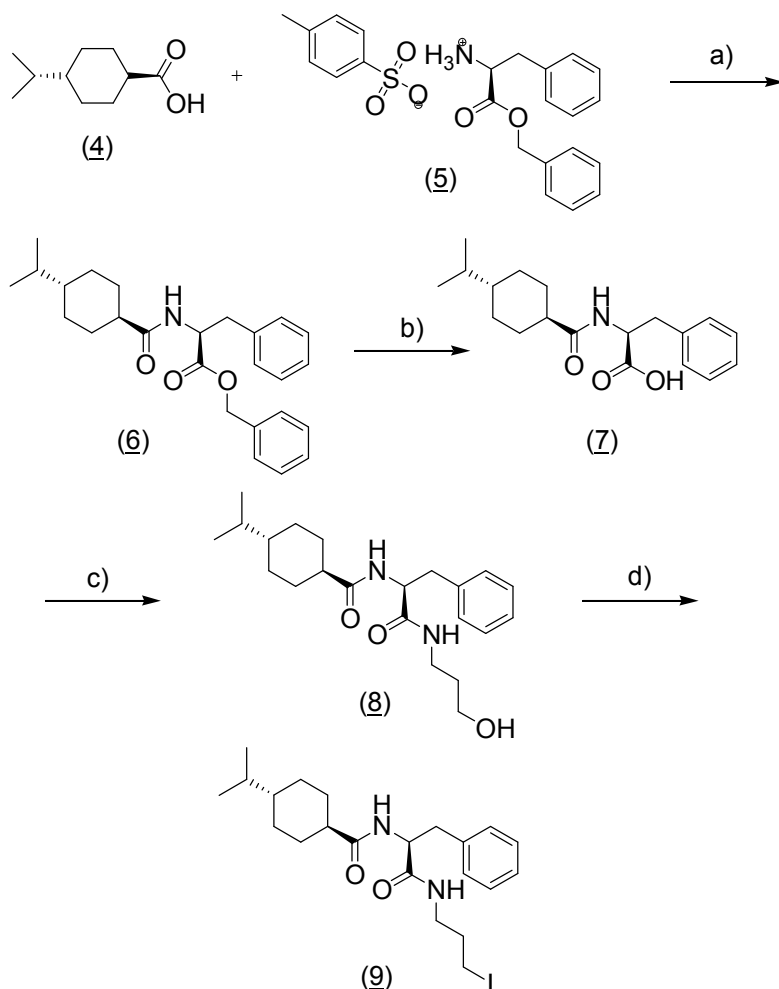


Scheme 1: Synthesis of an iodopropyl-conjugated repaglinide-derivative. Reaction details: a) 1-bromo-3-chloropropane, K₂CO₃, acetone, 60 °C, 14 h, 83% yield; b) NaI, dry acetone, 60 °C, 16h, 87% yield.

The basic structure of nateglinide is synthesized by reacting trans-4-isopropylcyclohexanecarboxylic acid (4) with the tosylate salt of D-phenylalaninebenzylester (5). The carboxylic acid was achieved as described elsewhere and the tosylate salt was purchased from Bachem [16].

Two different strategies were followed to attach the iodopropyl-moiety to nateglinide. The first utilized the carboxylic acid function of the natural structure of nateglinide. The carboxylic acid was deprotected by catalytic hydrogenation. Then the free carboxylic acid function was used to form an amide bond with 3-amino-propanol via ethylchloroformate

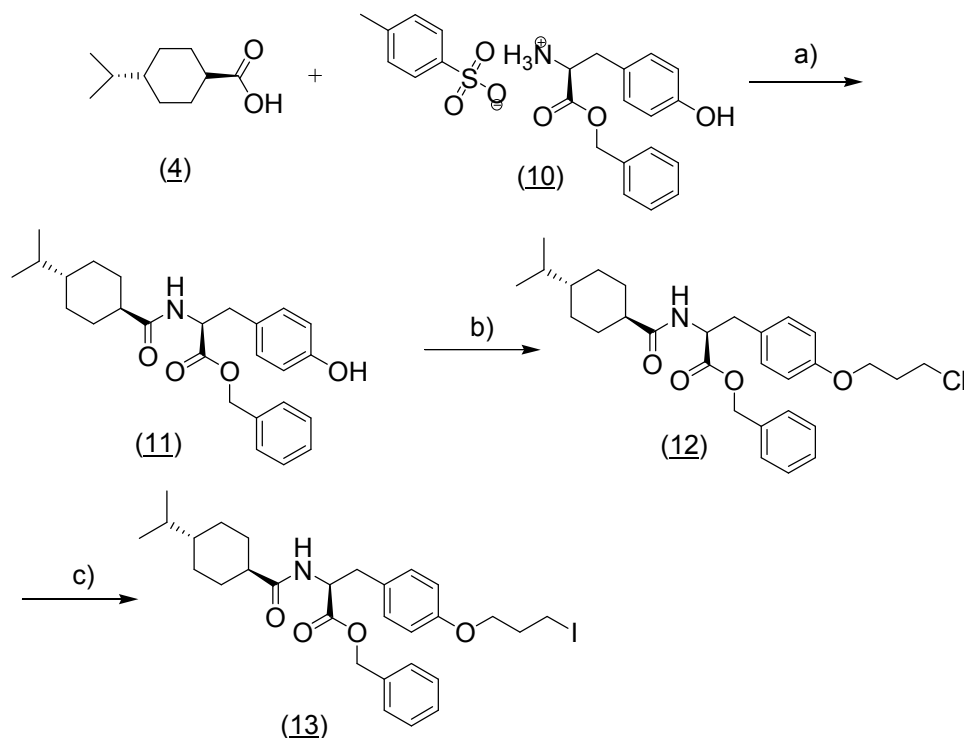
activation. In the next step the hydroxy-compound (**8**) was transformed into the iodo-derivative (**9**) under Appel halogenation conditions.



Scheme 2: Synthesis of the iodopropyl-nateglinide derivative via the carboxylic acid function. Reaction details: a) ethylchloroformate, triethylamine, dichloromethane, RT, 3 h, 63% yield; b) Pd/C, H₂, methanol, 3 h, 86% yield; c) 3-aminopropanol, ethylchloroformate, triethylamine, dichloromethane, RT, 3 h, 64% yield; d) I₂, triphenylphosphine, imidazole, dichloromethane, RT, 10 h, 52% yield.

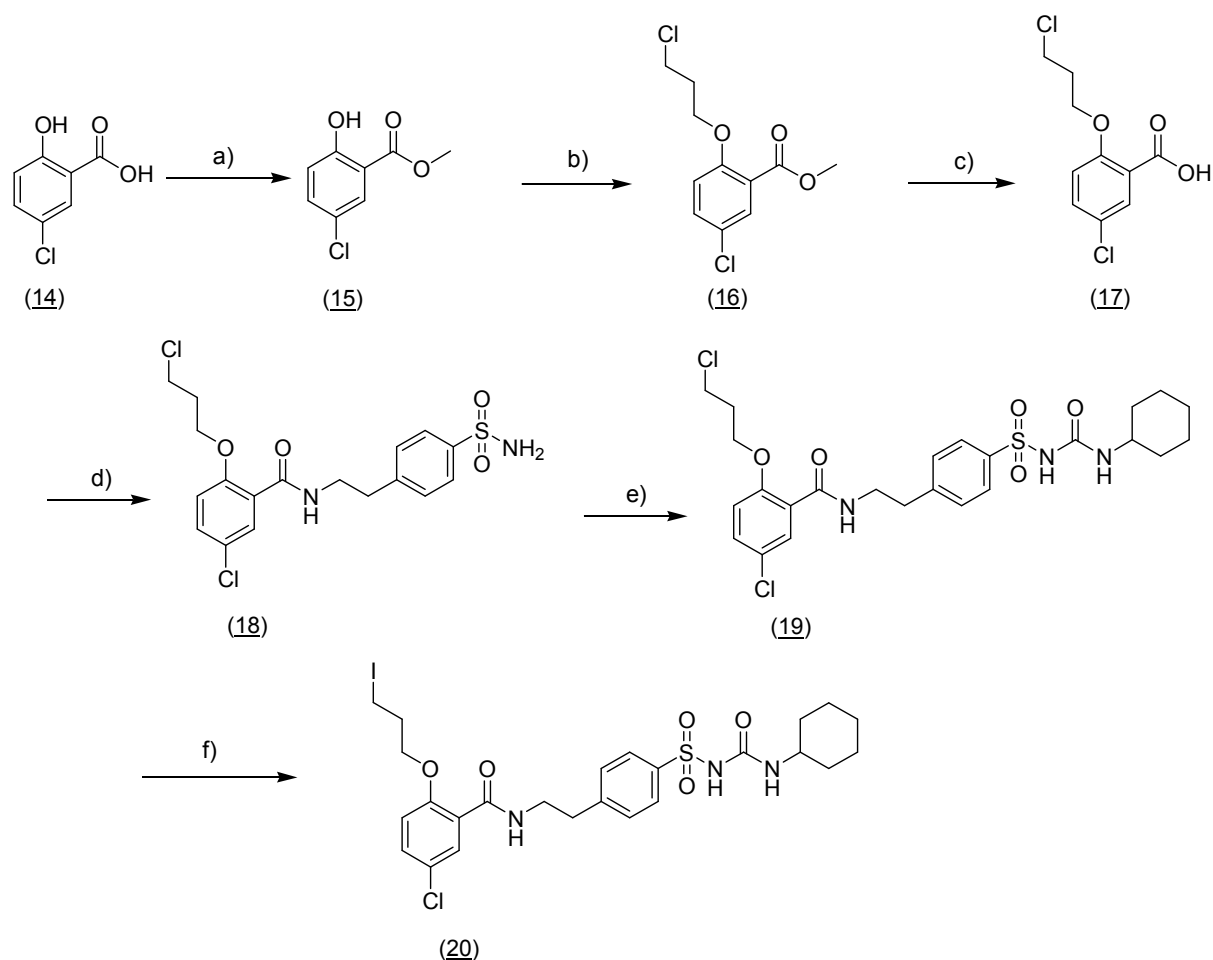
The second approach utilized the D-tyrosinebenzylester tosylate salt (**10**) instead of the phenylalanine derivative (**5**) to form the basic structure of nateglinide. So an additional phenolic hydroxy function was introduced to the structure. This function was used to attach

the chloro-functionalized propyl moiety. In the final step chlorine was exchanged by iodine to form the desired product (13).



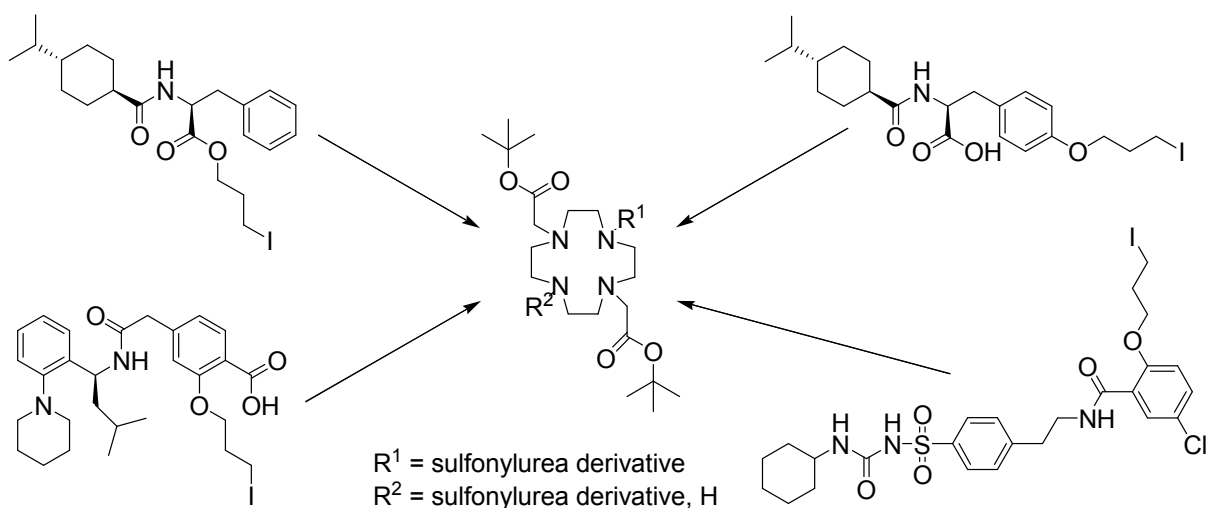
Scheme 3: Synthesis of iodopropyl-nateglinide-derivative via additional introduction of a phenolic hydroxyl group to the lead structure. Reaction details: a) ethylchloroformate, triethylamine, dichloromethane, RT, 3 h, 61% yield; b) 1-bromo-3-chloropropane, K_2CO_3 , acetone, 60 °C, 14 h, 82% yield; c) NaI, dry acetone, 60 °C, 16h, 91% yield.

The synthesis of the iodopropyl-functionalized glibenclamid derivative was carried out in 6 steps following the literature starting from 5-chloro-salicylic acid. To protect the carboxylic acid function the methyl ester (15) was formed. Then the phenolic hydroxy group was reacted with 1-bromo-3-chloropropane and the methyl ester was cleaved with a mixture of 1 M NaOH and dioxane. The sulfonamide was attached via formation of an amide bond. In the next step the sulfonyl urea was formed under Cu(I) catalysis. Finally the chloro-compound (19) was converted to the iodo-derivative (20) with a Finkelstein exchange.



Scheme 4: Synthetic route to the iodopropyl-functionalized glibenclamide derivative. Reaction details: a) MeOH, H₂SO₄, reflux, 14 h, 88% yield; b) -bromo-3-chloropropane, K₂CO₃, acetone, 60 °C, 14 h, 90% yield; c) 1 M NaOH/dioxane (1:1), RT, 4 h, 65% yield; d) ethylchloroformate, triethylamine, dimethylformamide, RT, 3 h, 90% yield; e) Cyclohexylisocyanate, Cu(I)Cl, dimethylformamide RT, 12 h, 57% yield; f) NaI, dry acetone, 60 °C, 16h, 80% yield.

All synthesized iodo-derivatives were reacted with DO2A. While both nateglinide derivatives and the repaglinide derivative lead to the desired products, the reaction with the glibenclamide derivative failed. Different reaction conditions were used, but no product was formed. We propose this is due to the acidic sulfonurea hydrogen, which disturbs the reaction of the iodopropyl-chain with the secondary amine of the DO2A heavily and leads to a variety of formed byproducts.



Scheme 5: Attachment of the different iodopropyl-functionalized derivative to tert.-butyl-protected DO2A. Reaction details: diisopropylethylamine, acetonitrile, 65 °C, 16 h.

The nateglinide-DO2A derivative containing an additional hydroxyl group and the repaglinide-DO2A derivative were deprotected in two consecutive steps. In case of the repaglinide derivative the methylester was cleaved with 1 M NaOH/dioxane. The nateglinide derivative was deprotected using standard catalytic hydrogenation conditions. In the next step the tert.-butylesters of DO2A existing in all three compounds were cleaved with trifluoroacetic acid and the mono- and divalent products were separated with semipreparative HPLC. Altogether six novel DO2A-conjugated SUR1-affine derivatives were synthesized successfully. The chemical structures of the novel compounds are presented in figure 4.

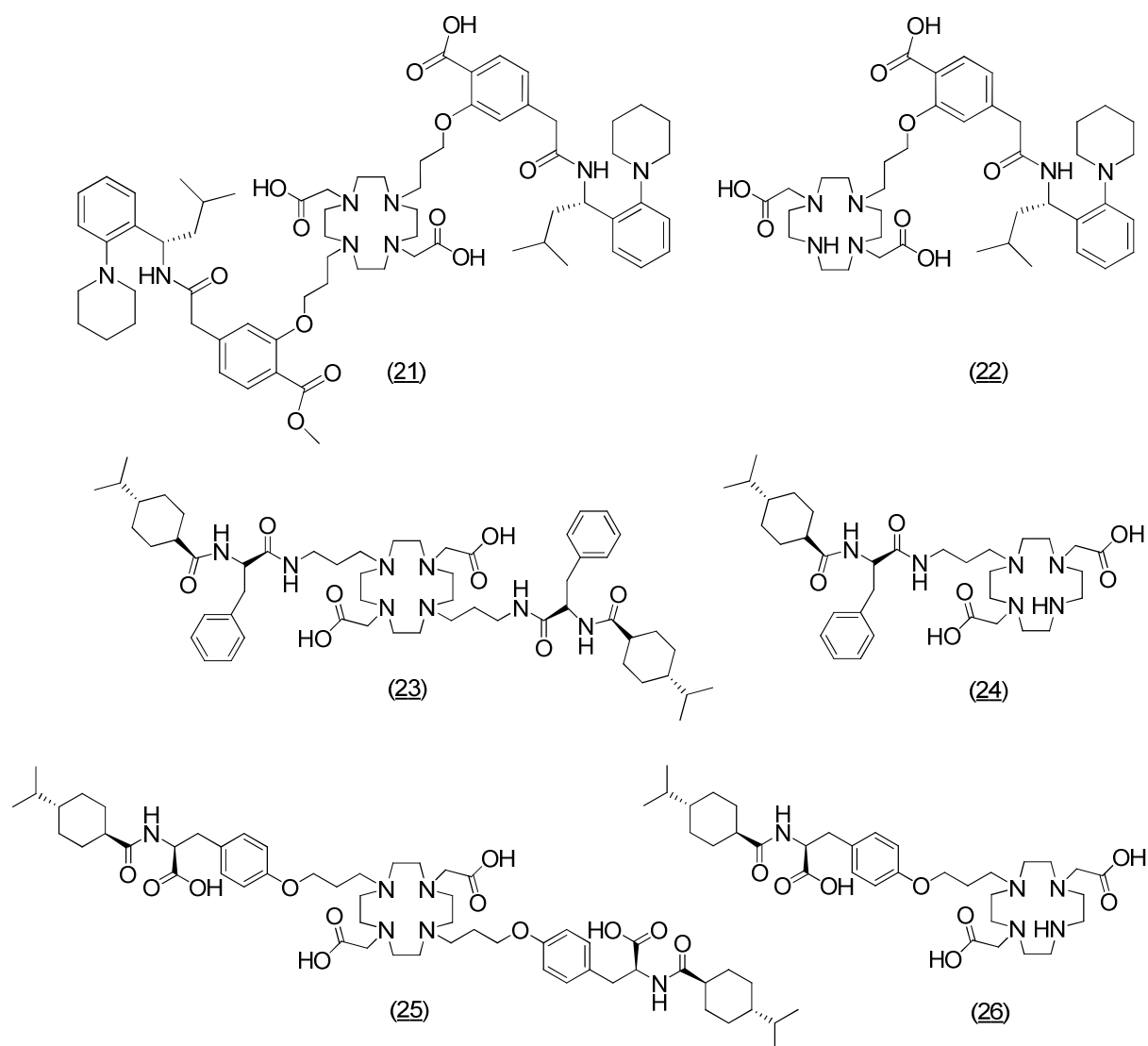


Figure 4: Chemical structures of the novel synthesized mono- and divalent DO2A-nateglinide and DO2A-repaglinide derivatives

As proof-of-principle an initially ^{68}Ga -labeling was performed with mono- and di-repaglinide derivative [17]. The labeling was performed with $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generator derived and cation exchanger post-processed ^{68}Ga [18]. A post processing is necessary due to the large volume and the high acidity of the primary generator eluate. Furthermore the ^{68}Ga is purified from other metal-ions, which react competitive to ^{68}Ga during the labeling process and lead to lower yields.

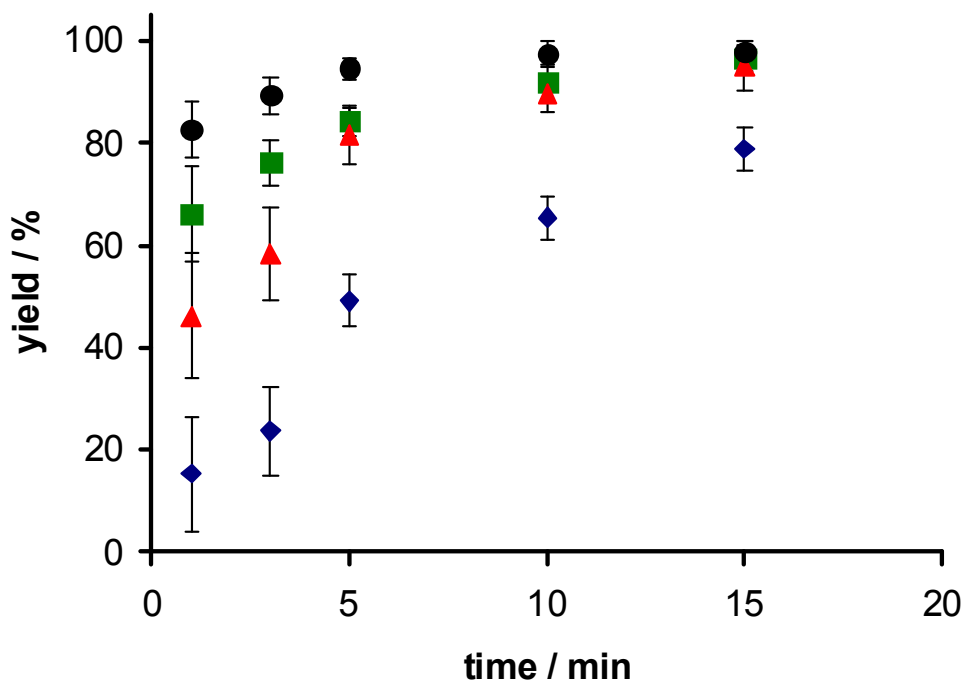


Figure 5: ^{68}Ga -radiolabeling of mono- (squares and circles) and divalent DO2A-repaglinide (diamonds and triangles). Labeling conditions: 5 mL Millipore water, 15 μg labeling precursor, 50 μL cation-exchanger post processed generator eluate at 70 $^{\circ}\text{C}$ (blue and green) and 90 $^{\circ}\text{C}$ (red and black). Errors are given as \pm 1 standard deviation.

The labeling was carried out in 5 mL Millipore water, with 15 μg of the labeling precursor at 70 $^{\circ}\text{C}$ and 90 $^{\circ}\text{C}$. The time dependency of the labeling yields over 15 minutes is shown in Figure 5. It is clearly demonstrated that the mono-derivative is much easier to label. This effect is caused by the sterical hinderness of the bulky repaglinide structures, but it can be compensated by higher temperatures and prolonged heating. This proves that the new synthesized derivatives are well suited for the labeling with ^{68}Ga .

Summary and Conclusions

Six novel, promising derivatives were successfully synthesized in high yields. All compounds were attached via a propyl-spacer to the bifunctional chelator DO2A, forming mono- and

divalent derivatives. Four compounds based on nateglinide and two based on repaglinide were received. A preliminary ^{68}Ga -labeling study was performed, proving, that the novel compounds match the requirements for ^{68}Ga -labeling. Even the sterically hindered divalent compound was labeled with 89% yield at 90 °C after 15 minutes.

An analogue attempt to synthesize DO2A-glibenclamide derivatives failed due to the high acidity of the sulfonylurea proton. For this compound another synthetic route is required. One opportunity might be to introduce an amino group to the glibenclamide structure and attach it to a di-isothiocyanate-functionalized DO2A-derivative.

Nevertheless, six synthesized compounds are very interesting candidates for a further biological evaluation.

Experimental

General methods

All used chemicals were commercially available at Acros Organics, Bachem, Fluka, Sigma Aldrich, STREM or VWR and used without further purification. All used solvents were freshly distilled prior to use.

^1H -NMR spectra measurement was performed on a Bruker AC 200 FT-NMR and a Bruker Avance 2 NMR spectrometer. Chemical Shifts are given in parts per millions downfield from TMS ($\delta = 0$ ppm) referred to the solvent residual signal.

For the purification of the compounds a semi-preparative Dionex P680 HPLC with an UVD170U UV-detector (254 and 360 nm) and a Phenomenex[®] Synergy Max RP 15x250mm HPLC-column ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 75:25, 0.01% TFA) was used.

TLC was performed on self-cut Merck Silica 60 F_{254} plates. Column chromatography was carried out on Acros silica gel 60, 0.063 – 0.200 mesh.

For the radiolabeling a commercially available $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generator (Cyclotron AG, Obninsk, Russia) has been used. Radio-TLCs were performed on Merck Silica F₂₅₄ TLC-Plates and analysed with a Canberra Instant Imager.

Synthesis of the iodopropyl-functionalized compounds

Methyl-4-(((S)-3-methyl-1-(2-(piperidin-1-yl)phenyl)butylcarbamoyl)methyl)-2-(3-chloropropoxy)benzoate (2)

800 mg (1.82 mmol) methyl 4-(((S)-3-methyl-1-(2-(piperidin-1-yl)phenyl)butylcarbamoyl)methyl)-2-hydroxybenzoate (1) and 0.5 g (3.2 mmol) 1-bromo-3-chloropropane and 0.28 g (2 mmol) K₂CO₃ were mixed together in 40 mL dry acetone and refluxed for 14 hours. The solvent was removed in vacuo and the residue was taken up in 30 mL 1 M NaOH. The product (0.78 g, 1.51 mmol, 83%) was extracted with 3 x 30 mL chloroform.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 7.75 (d, 1H), 7.17 (m, 2H), 7.05 (m, 2H), 6.83 (m, 2H), 6.74 (m, 1H), 5.34 (q, 1H), 4.05 (m, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.78 (t, 2H), 3.51 (s, 2H), 2.90 (m, 2H), 2.60 (m, 2H), 2.21 (p, 2H), 1.321-1.69 (m, 9H), 0.90 (s, 3H), 0.88 (s, 3H)

Methyl-4-(((S)-3-methyl-1-(2-(piperidin-1-yl)phenyl)butylcarbamoyl)methyl)-2-(3-iodopropoxy)benzoate (3)

600 mg (1.2 mmol) methyl 4-(((S)-3-methyl-1-(2-(piperidin-1-yl)phenyl)butylcarbamoyl)methyl)-2-(3-chloropropoxy)benzoate (2) and 0.75 g (5 mmol) NaI were dissolved in dry acetone and refluxed for 16 hours. The precipitate was filtered off and the solvent was evaporated in vacuo. The residue was taken up in 30 mL 1 M NaOH and product was extracted with 3 x 30 mL chloroform. 0.616 g (1 mmol, 87%) of the pale yellow product were received.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = 7.75 (d, 1H), 7.18 (m, 2H), 7.04 (m, 2H), 6.84 (m, 2H), 6.74 (m, 1H), 5.34 (q, 1H), 4.06 (m, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.41 (t, 2H), 3.52 (s, 2H), 2.90 (m, 2H), 2.61 (m, 2H), 2.20 (p, 2H), 1.31-1.65 (m, 9H), 0.90 (s, 3H), 0.88 (s, 3H)

(S)-benzyl 2-((*trans*)-4-isopropylcyclohexanecarboxamido)-3-phenylpropanoate (6)

4 g (23.5 mmol) *trans*-4-isopropylcyclohexanecarboxylic acid (4) and 4.16 mL triethylamine were stirred for 15 minutes in 80 mL dichloromethane at 0 °C. 2.8 g ethylchloroformate dissolved in 30 mL dichloromethane were added dropwise to the cooled mixture. Then 10.67 g (24.5 mmol) 2-benzoyloxy-1-benzyl-2-oxo-ethylammoniumtoluene-4-sulfonate (5) and 7.68 mL triethylamine in 50 mL dichloromethane was given to the reaction mixture. The solvent was evaporated in vacuo after stirring for 3 hours and the product was purified with column chromatography (ethylacetate/*N*-hexane 1:3). 6.03 g (14.8 mmol, 63%) of the white solid product were obtained.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = 7.34 (m, 5 H), 7.19 (m, 3 H), 6.95 (d, 2 H), 5.88 (d, 1 H), 5.13 (q, 2 H), 4.90 (m, 1H), 3.10 (m, 2H), 1.98 (m, 1H), 1.78 (m, 4H) 1.37 (m, 3H) 0.99 (m, 3H) 0.84 (s, 3H) 0.82 (s, 3H)

(S)-2-((*trans*)-4-isopropylcyclohexanecarboxamido)-3-phenylpropanoic acid (7)

4 g (9.8 mmol) *(S)*-benzyl 2-((*trans*)-4-isopropylcyclohexanecarboxamido)-3-phenylpropanoate (6) dissolved in 40 mL methanol and 80 mg palladium on charcoal (10%) were mixed in a flask. Hydrogen was passed through the mixture for 3 hours. The charcoal was filtered off with Celite and the solvent was removed in vacuo. The residue was taken up in 40 mL 1 M NaOH. The water phase was extracted with 2 x 25 mL chloroform and then acidified with HCl. The product was extracted with 3 x 30 mL chloroform. 2.68 g (8.4 mmol, 86%) of the white solid product were received.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = 7.14 (m, 5H), 6.06 (d, 1H), 4.85 (q, 1H), 3.16 (m, 2H), 2.00 (m, 1H), 1.79 (m, 4H), 1.36 (m, 3H), 0.98 (m, 3H), 0.83 (s, 3H), 0.80 (s, 3H)

(trans)-N-((S)-1-(3-hydroxypropylcarbamoyl)-2-phenylethyl)-4-isopropylcyclohexane-carboxamide (8)

(S)-2-((trans)-4-isopropylcyclohexanecarboxamido)-3-phenylpropanoic acid (7) (3 g, 9.5 mmol) were dissolved with mL ethylamine in 65 mL dichloromethane. The mixture was cooled to 0 °C and 1.08 g (10 mmol) ethylchloroformate were added. 0.75 g (10 mmol) 3-aminopropanol were given to the mixed anhydride and stirred for three hours. The solvent was removed in vacuo and the product was purified by column chromatography (ethylacetate/N-hexane 3:1). 2.28 g (0.61 mmol, 64%) of the desired product were received.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = 7.18 (m, 5 H), 6.83 (t, 1 H), 6.44 (d, 1 H), 4.64 (q, 1 H), 3.45 (t, 2 H), 3.27 (m, 2H), 2.99 (d, 2H), 1.99 (m, 1H), 1.74 (m, 4H) 1.55 (m, 2H), 1.34 (m, 3H) 0.95 (m, 3H) 0.83 (s, 3H) 0.80 (s, 3H)

(trans)-N-((S)-1-(3-iodopropylcarbamoyl)-2-phenylethyl)-4-isopropylcyclohexane-carboxamide (9)

1.5 g (4 mmol) (trans)-N-((S)-1-(3-hydroxypropylcarbamoyl)-2-phenylethyl)-4-isopropylcyclohexane-carboxamide (8), 1.31 g (5 mmol) triphenylphosphine, 0.34 g (5 mmol) imidazole and 1.52 g (6 mmol) I_2 were mixed together in 50 mL dichloromethane and stirred for 12 hours. The solvent was evaporated and the product was purified by column chromatography (ethylacetate/N-hexane 2:1) and 1.01 g (2.1 mmol, 52%) of the pale yellow product were achieved.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = 7.15 (m, 5 H), 6.55 (t, 1 H), 6.33 (d, 1 H), 4.66 (q, 2 H), 3.08 (m, 2H), 2.99 (m, 2H), 2.91 (m, 2H), 1.99 (m, 1H), 1.86 (p, 2H) 1.76 (m, 4H) 1.33 (m, 3H) 0.98 (m, 3H) 0.83 (s, 3H), 0.81 (s, 3H)

3-(4-hydroxy-phenyl)-2-[(trans-isopropyl-cyclohexanecarbonyl)-amino]-propionic acid benzylester (11)

3 g (17.6 mmol) trans-4-isopropylcyclohexanecarboxylic acid (4) and 3.12 mL triethylamine were dissolved in 80 mL dichloromethane at 0 °C. To this mixture 2.1 g ethylchloroformate dissolved in 30 mL dichloromethane were added dropwise. After 15 minutes a mixture of 8 g (18 mmol) 2-benzoyloxy-1-(4-hydroxy-benzyl)-2-oxo-ethylammoniumtoluene-4-sulfonate (10) and 5.76 mL triethylamine in 50 mL dichloromethane was given to the reaction mixture. After stirring for two hours the solvent was evaporated in vacuo and the product was purified with column chromatography (ethylacetate/N-hexane 1:2). 4.54 g (10.7 mmol, 61%) of the white solid product were obtained.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = 7.38 (m, 5 H), 6.80 (d, 2 H), 6.65 (d, 2 H), 5.97 (d, 1 H), 5.13 (q, 2 H), 4.87 (m, 1H), 3.01 (m, 2H), 1.98 (m, 1H), 1.74 (m, 4H) 1.36 (m, 3H) 0.99 (m, 3H) 0.84 (s, 3H) 0.81 (s, 3H)

3-((3-chloro)-4-propoxy-phenyl)-2-[(trans-isopropyl-cyclohexanecarbonyl)-amino]-propionic acid benzylester (12)

4 g (9.4 mmol) 3-(4-hydroxy-phenyl)-2-[(trans-isopropyl-cyclohexanecarbonyl)-amino]-propionic acid benzylester (11), 3.15 g (20 mmol) 1-bromo-3-chloropropane and 1.66 g (12 mmol) K_2CO_3 were refluxed in 50 mL dry acetone for 14 hours. The solvent was removed in vacuo and the residue was taken up in 40 mL 2 M NaOH and extracted with 3 x 30 mL chloroform. After removing the solvent 3.8 g (7.6 mmol, 80%) of the product were received.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = 7.34 (m, 5 H), 6.84 (d, 2 H), 6.70 (d, 2 H), 5.85 (d, 1 H), 5.13 (q, 2 H), 4.86 (m, 1H), 4.04 (t, 2H), 3.72 (t, 2H), 3.03 (m, 2H), 2.20 (p, 2H), 1.98 (m, 1H), 1.77 (m, 4H) 1.37 (m, 3H) 0.99 (m, 3H) 0.83 (s, 3H) 0.80 (s, 3H)

3-((3-iodo)-4-propoxy-phenyl)-2-[(trans-isopropyl-cyclohexanecarbonyl)-amino]-propionic acid benzylester (13)

3 g (6 mmol) 3-((3-chloro)-4-propoxy-phenyl)-2-[(trans-isopropyl-cyclohexanecarbonyl)-amino]-propionic acid benzylester (12) and a 4-fold excess of NaI were dissolved in dry acetone and refluxed for 16 hours. The precipitate was filtered off and the solvent was evaporated in vacuo. The residue was dissolved again in 40 mL 1 M NaOH and the product was extracted with 3x 30 mL chloroform. After removing the solvent 3.26 g (0.55 mmol, 91%) of the desired product were obtained as pale yellow solid.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = 7.36 (m, 5 H), 6.85 (d, 2 H), 6.71 (d, 2 H), 5.84 (d, 1 H), 5.11 (q, 2 H), 4.85 (m, 1H), 4.06 (t, 2H), 3.19 (t, 2H), 3.03 (m, 2H), 2.15 (p, 2H), 1.98 (m, 1H), 1.78 (m, 4H) 1.35 (m, 3H) 0.99 (m, 3H) 0.84 (s, 3H) 0.80 (s, 3H)

5-chloro-2-hydroxybenzoic acid methylester (15)

A solution of 5-chloro-2-hydroxybenzoic acid (50.56 g, 0.29 mol, 1 eq.) in methanol (60 mL) and 3.12 mL conc. sulphuric acid (0.057 mol, 0.2 eq.) was refluxed for 72 h. The methanol was evaporated in vacuo and the obtained solid was purified via vacuum distillation. 46.92 g (0.251 mol, 88%) colorless crystals were obtained. (85 °C, 6.8×10^{-2} mbar).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = 10.66 (s, 1 H), 7.78 (d, 1H), 7.38 (dd, 1H), 6.91 (d, 1H), 3.94 (s, 3H)

5-chloro-2-(3-chloropropoxy)-benzoic acid methylester (16)

A mixture of 20.12 g (107.2 mmol, 1 eq.) 5-chloro-2-hydroxybenzoic acid-methylester (15), 27 mL 1-bromo-3-chloropropane (271.0 mmol, 2.5 eq.) and 18.85 g potassium carbonate (132 mmol, 1.2 eq.) in 30 ml acetone was refluxed for 12 h. The solvent was evaporated in vacuo and the residue was taken up in 200 mL dichloromethane. The organic layer was washed 3 times with 2 N NaOH (3×50 ml). The organic layer was dried over sodium sulfate, filtered and evaporated to give 27.46 g colorless crystals. (104.8 mmol, 97%)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 7.76 (d, 1H); 7.38 (dd, 1H); 6.90 (d, 1H); 4.15 (t, 2H); 3.86 (s, 3H); 3.80 (t, 2H); 2.25 (p, 2H)

5-chloro-2-(3-chloropropoxy)benzoic acid (17)

5-chloro-2-(3-chloro-propoxy)-benzoic acid-methylester (16) (4.16 g, 16 mmol) was dissolved in a mixture of 35 mL 2 N NaOH and 35 mL dioxan and refluxed for 12 h. The solvent was evaporated in vacuo. 1 N HCl was added until pH 3-4. The product precipitated as colorless crystals. They were filtered off, solved in ethylacetate (100 mL) and washed with water (3×30 ml). The organic layer was dried over sodium sulfate, filtered off again and evaporated to give 2.65 g of a colorless solid (11 mmol, 65%)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 8.02 (d, 1H); 7.46 (dd, 1H); 6.94 (d, 1H); 4.28 (t, 2H); 3.97 (d, 2H); 2.16 (p, 2H)

4-β-[2-(3'-chloropropoxy)-5-chlorobenzcarboxamido]ethyl}-benzenesulfonamide (18)

5-chloro-2-(3-chloro-propoxy)-benzoic acid(17) (5.00 g, 20 mmol, 1 eq.) was solved in 25 mL dimethyl formamide und 2,8 mL triethylamine (20 mmol, 1 eq.) was added. 1.91 ml

(20 mmol, 1 eq.) ethylchloro formiate was added dropwise to this stirred cooled solution (0 °C). After being stirred for 20 minutes a suspension of 4.13 g (20 mmol, 1.03 eq.) 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonic acid amide and 2.8 mL (20 mmol, 1 eq.) triethylamine in 30 mL dimethyl formamide was added. This mixture was stirred at 0 °C for 1h. Thereafter the mixture was stirred for 48 h at room temperature.

1 N HCl was added until pH 1. The resulting precipitate was filtered off. (7.69 g, 18 mmol, 90%, colorless powder).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆), δ [ppm] = 8.23 (t, 1H); 7.75 (d, 2H); 7.69 (d, 1H); 7.47 (dd, 1H); 7.43 (d, 2H); 7.31 (s, 2H); 7.16 (d, 1H); 4.15 (t, 2H); 3.72 (t, 2H); 3.53 (q, 2H); 2.90 (t, 2H), 2.07 (p, 2H)

N-{4-β-[2-(3'-chloropropoxy)-5-chlorobenzcarboxamido]ethyl}-benzenesulfoyl}-N'-cyclohexylurea (19)

A solution of 5-chloro-2-(3'chloropropoxy)-N-[2-(4-sulfamoylphenyl)ethyl]-benzamide (18) (1.66 g, 3.8 mmol, 1.25 eq.), 0.5 mL Cyclohexylisocyanat (4.14 mmol, 1.35 eq.) und 40 mg Cu(I)Cl (0.36 mmol, 0.12 eq.) in dimethyl formamide was stirred for 12 h. The solvent was evaporated in vacuo and 2 N HCl was added (0°C). The mixture was stirred for 30 minutes at 0°C and the resulting precipitates were filtered off. The solid was heated up in 5 mL of acetonitrile and again filtered off to obtain 1.20 g of a colorless solid (2.16 mmol, 57% yield).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆), δ [ppm] = 10.31 (s, 1H); 8.21 (t, 1H); 7.82 (d, 2H); 7.68 (d, 1H); 7.58 (dd, 1H); 7.47 (d, 2H); 7.11 (d, 1H) 4.13 (t, 2H); 3.68 (t, 2H); 3.54 (q, 2H); 2.91 (t, 2H); 2.05 (p, 2H); 1.14 (m, 11H)

N-{4-β-[2-(3'-iodopropoxy)-5-chlorobenzcarboxamido]ethyl}-benzenesulfoyl}-N'-cyclohexylurea (20)

N-{4- β -[2-(3'-chloropropoxy)-5-chlorobenzcarboxamido]ethyl}-benzenesulfoyl}-N'-cyclohexylurea (0.70 g, 1.3 mmol, 1 eq.) (19) and 0.42 g NaI (2,8 mmol, 2,17 eq.) were solved in 60 mL acetone and refluxed for 12 h. The solvent was removed in vacuo and the residue was taken up in 150 mL of chloroform. The organic layer was washed with water, dried over sodium sulfate, filtered of and the solvent removed in vacuo to give 0.68 g of a colorless solid (1.04 mmol, 80%).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6), δ [ppm] = 10.31 (s, 1H); 8.22 (t, 1H); 7.84 (d, 2H); 7.56 (d, 1H); 7.48 (m, 3H); 7.16 (d, 2H); 6.34 (d, 1H); 4.07 (t, 2H); 3.55 (q, 2H); 3.29 (t, 2H); 2.93 (t, 2H); 2.10 (p, 2H); 1.14 (m, 11H)

Attachment of the iodopropyl-compounds to DO2A

General procedure:

500 mg DO2A, 3 eq. of the iodopropyl-functionalized compound and 3 eq. diisopropylethylamine were dissolved in 20 mL dry acetonitrile and stirred at 65 °C for 24 hours. The solvent was removed in vacuo and the residue was taken up in 30 mL 1 M NaOH. The product was extracted with 3 x 20 mL chloroform and after evaporation of the solvent purified by column chromatography. First the non-reacted iodopropyl-compound was eluted with ethylacetate/N-hexane (1:1), then the formed mono- and divalent DO2A-derivatives were eluted with MeOH/ CHCl_3 (1:6). The solvent was removed and the protective groups were cleaved following the standard procedures. The mono- and divalent product were separated utilizing semipreparative HPLC.

4,10-di-(4-(((S)-3-methyl-1-(2-(piperidin-1-yl)phenyl)butylcarbamoyl)methyl)-2-(propoxy)-benzoate)-1,7-diacetic acid-1,4,7,10-tetraazacyclododecane(21)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 7.77 (d, 2H), 7.65 (m, 4H), 7.54 (m, 4H), 7.48 (m, 2H), 7.00 (s, 2H), 6.91 (d, 2H), 4.13 (m, 4H), 3.49 – 3.65 (m, 12H), 3.11 – 3.34 (m, 12H), 2.98 (m, 4H), 2.34 (m, 4H), 1.67 – 2.13 (m, 22H), 1.03 (s, 6H), 0.97 (s, 6H)

4-(4-(((S)-3-methyl-1-(2-(piperidin-1-yl)phenyl)butylcarbamoyl)methyl)-2-(propoxy)-benzoate)-1,7-diacetic acid-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (22)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 7.79 (d, 1H), 7.68 (m, 2H), 7.56 (m, 2H), 7.48 (m, 1H), 7.01 (s, 1H), 6.92 (d, 1H), 4.12 (m, 2H), 3.48 – 3.67 (m, 12H), 3.12 – 3.30 (m, 10H), 2.98 (m, 2H), 2.34 (m, 2H), 1.65 – 2.14 (m, 11H), 1.04 (s, 3H), 0.98 (s, 3H)

4,10-di-((trans)-N-((S)-1-(propylcarbamoyl)-2-phenylethyl)-4-isopropylcyclohexane-carboxamide)-1,7-diacetic acid-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (23)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 7.17 (m, 10 H), 6.53 (t, 2 H), 6.35 (d, 2 H), 4.66 (m, 4 H), 3.32 - 3.07 (m, 16H), 2.99 - 2.81 (m, 16H), 1.99 (m, 2H), 1.91- 1.71 (m, 12H) 1.31 (m, 6H) 0.99 (m, 6H) 0.84 (s, 6H), 0.81 (s, 6H)

4-(trans)-N-((S)-1-(propylcarbamoyl)-2-phenylethyl)-4-isopropylcyclohexane-carboxamide-1,7-diacetic acid-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (24)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 7.16 (m, 5 H), 6.55 (t, 1 H), 6.33 (d, 1 H), 4.66 (q, 2 H), 3.17 – 3.05 (m, 14H), 2.99 - 2.84 (m, 12H), 1.99 (m, 1H), 1.85 (m, 2H) 1.72 (m, 4H) 1.33 (m, 3H) 0.99 (m, 3H) 0.83 (s, 3H), 0.80 (s, 3H)

4,10-di-(3-(4-propoxy-phenyl)-2-[(trans-isopropyl-cyclohexanecarbonyl)-amino]-propionic acid)-1,7-diacetic acid-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (25)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 6.87 (d, 4H), 6.73 (d, 4H), 5.83 (d, 2H), 4.85 (m, 2H), 4.03 (t, 4H), 3.25 – 3.06 (m, 16H), 3.03 -2.88 (m, 21H), 2.11 - 1.96 (m, 6H), 1.78 (m, 8H) 1.33 (m, 6H) 0.99 (m, 6H) 0.84 (s, 6H) 0.80 (s, 6H)

4-(3-(4-propoxy-phenyl)-2-[(trans-isopropyl-cyclohexanecarbonyl)-amino]-propionic acid)-1,7-diacetic acid-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (26)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 6.86 (d, 2 H), 6.71 (d, 2 H), 5.85 (d, 1 H), 4.86 (m, 1H), 4.06 (t, 2H), 3.22 - 3.04 (m, 10H), 3.02 – 2.86 (m, 14H), 2.12 (m, 2H), 1.98 (m, 1H), 1.79 (m, 4H) 1.33 (m, 3H) 0.99 (m, 3H) 0.84 (s, 3H) 0.81 (s, 3H)

Radiolabeling

10 µg (17 nmol) of the labelling precursor (4,10-di-(4-(((S)-3-methyl-1-(2-(piperidin-1-yl)phenyl)butylcarbamoyl)methyl)-2-(propoxy)-benzoate)-1,7-diacetic acid-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (21) or 4-(4-(((S)-3-methyl-1-(2-(piperidin-1-yl)phenyl)butylcarbamoyl)methyl)-2-(propoxy)-benzoate)-1,7-diacetic acid-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (22), respectively) were added to 5 mL Millipore water. In the mixture was preheated for 2 minutes to the desired labelling temperature. Then 50 µL of the generator-derived and cation-exchanger post processed ⁶⁸Ga were given to the reaction vial ending up in a pH-value of 3.2. After defined timepoints (1, 3, 5, 10 minutes) 1 µL was spotted on a TLC-plate. To develop the TLCs a mixture of 5% NaCl-solution and ethanol (3:1) was used. The yield was given as product activity / total activity.

Acknowledgement

The authors want to thank the European Union for support through COST action D38.

References

- [1] World Health Organisation, *Diabetes Programme, Facts and Figures*, **2010**.
- [2] M. E. Phelps, *Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes*, Proc. Nat. Acad. Sci. 97, **2000**, 9226.
- [3] F. Souza, M. Freeby, K. Hultman, N. Simpson, A. Herron, P. Witkowsky, E. Liu, A. Maffei, P. E. Harris, *Current progress in non-invasive imaging of beta cell mass of the endocrine pancreas*, Curr. Med. Chem. 13, **2006**, 2761.
- [4] a) P. B. Clark, H. D. Gage, C. Brown-Proctor, N. Buchheimer, J. Calles-Escandon, R. H. Mach, K. A. Morton, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. I.* 31, **2003**, 258; b) M. J. Ribeiro, P. De Lonlay, T. Delzescaux, N. Boddaert, F. Jaubert, S. Bourgeois, F. Dolle, C. Nihoul-Fekete, A. Syrota, F. Brunelle, *J. Nucl. Med.* 46, **2005**, 560; c) T. M. Vander Borgh, M. R. Kilbourn, R. A. Koeppe, J. N. DaSilva, J. E. Carey, D. E. Kuhl, K. A. Frey, *J. Nucl. Med.* 36, **1995**, 2252.
- [5] F. M. Gribble, S. J. Tucker, S. Seino, S. M. Ashcroft, *Tissue specificity of sulfonylureas, studies on cloned cardiac and β -Cell K_{ATP} channels*, Diabetes 47, **1998**, 1412.
- [6] M. Mark, *Sulfonylharnstoffe und Glinide: Vom Chemotherapeutikum zum Antidiabetikum*, Pharmazie in unserer Zeit 31, **2002**, 252.
- [7] J. B. Hansen, *Towards selective Kir6.2/SUR1 potassium channel openers, medicinal chemistry and therapeutic perspectives*, Curr. Med. Chem. 13, **2004**, 271.
- [8] a) A. Schmitz, C. Y. Shiue, Q. Feng, G. G. Shiue, S. Deng, M. T. Pourdehnad, R. Schirmacher, M. Vatamaniuk, N. Doliba, F. Matschinsky, B. Wolf, F. Roesch, A. Naji, A. A. Alavi, *Synthesis and evaluation of fluorine-18 labeled glyburide analogs as β -cell imaging agents*, Nucl. Med. Biol. 31, **2004**, 483; b) B. Wängler, S. Schneider, O. Thews, E. Schirmacher, S. Comagic, P. Feilen, C. Schwanstecher, M. Schwanstecher, C.-Y. Shiue, A. Alavi, S. Höhnemann, M. Piel, F. Rösch, R. Schirmacher, *Synthesis and evaluation of (S)-2-(2-[18 F]fluoroethoxy)-4-([3-methyl-1-(2-piperidin-1-yl-phenyl)-butyl-carbamoyl]-methyl-benzoic acid ([18 F]repaglinide): a promising radioligand for quantification of pancreatic β -cell mass*

with positron emission tomography (PET), Nucl. Med. Biol. 31, **2004**, 639; B. Wängler, C. Beck, C. Y. Shiue, S. Schneider, C. Schwanstecher, M. Schwanstecher, P. J. Feilen, A. Alavi, F. Rösch, R. Schirmacher, *Synthesis and in vitro evaluation of (S)-2-([¹¹C]methoxy)-4-[3-methyl-1-(2-piperidine-1-yl-phenyl)-butyl-carbamoyl]-benzoic acid ([¹¹C]repaglinide): a potential β -cell imaging agent*, Bioorg. Med. Chem. Lett. 14, **2004**, 5205.

[9] S. Schneider, P. J. Feilen, M. Schreckenberger, M. Schwanstecher, C. Schwanstecher, H. G. Buchholz, O. Thews, K. Oberholzer, A. Korobeynikov, A. Bauman, S. Comagic, M. Piel, E. Schirmacher, J. Y. Shiue, A. A. Alavi, P. Bartenstein, F. Roesch, M. M. Weber, H. H. Klein, R. Schirmacher, *In vitro and in vivo evaluation of novel glibenclamide derivatives as imaging agents for the non-invasive assessment of the pancreatic islet cell mass in animals and humans*, Exp. Clin. Endocrin. Diabetes 113, **2005**, 388.

[10] S. Schneider, S. Ueberberg, A. Korobeynikov, W. Schechinger, C. Schwanstecher, M. Schwanstecher, H. H. Klein, E. Schirmacher, *Synthesis and evaluation of a glibenclamide glucose-conjugate: A potential new lead compound for substituted glibenclamide derivatives as islet imaging agents*, Regulatory Peptides 139, **2007**, 122.

[11] A. Azhdarinia, C. Oh, S. Kohanim, M. Chanda, D.-F. Yu, M. Ito, J. L. Bryant, E. E. Kim, D. J. Yang, *Targeted imaging pancreas β -cell activity with ^{99m}Tc-labeled nateglinide*, J. Labelled Comp. Radiopharm. 48 Supplement 1, **2005**, S269.

[12] F. Roesch, P. J. Riss, *The renaissance of the ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga radionuclide generator initiates new developments in ⁶⁸Ga radiopharmaceutical chemistry*, Curr. Top. Med. Chem. **2010**, accepted.

[13] C. Burchardt, P. J. Riss, F. Zoller, S. Maschauer, O. Prante, T. Kuwert, F. Rösch, *[⁶⁸Ga]Ga-DO2A-(OBu-L-tyr)₂: Synthesis, ⁶⁸Ga-radiolabeling and in vitro studies of a novel ⁶⁸Ga-DO2A-tyrosine conjugate as potential tumor tracer for PET*, Bioorg. Med Chem. Lett. 19, **2009**, 3498.

[14] Z. Kovacs, A. D. Sherry, *A general synthesis of 1,7-disubstituted 1,4,7,10-tetraazacyclododecanes*, J. Chem. Soc., Chem. Commun. 2, **1995**, 185.

[15] W. Grell, R. Hurnaus, G. Griss, R. Sauter, E. Rupprecht, M. Mark, P. Luger, H. Nar, H. Wittneben, P. Müller, *Repaglinide and Related Hypoglycemic Benzoic Acid Derivatives*, J. Med. Chem. 41, **1998**, 5219.

- [16] H. Shinkai, M. Nishikawa, Y. Sato, K. Toi, I. Kumashiro, Y. Seto, M. Fukuma, K. Dan, S. Toyoshima, *N-(Cyclohexylcarbonyl)-D-phenylalanines and related compounds. A new class of oral hypoglycemic agents*, J. Med. Chem. 32, **1989**, 1436.
- [17] C. Burchardt, P. J. Riss, F. Roesch, *Systematic ^{68}Ga -labelling of DO2A-(butyl-L-tyrosine) $_2$ with cation-exchanger post-processed ^{68}Ga : Practical aspects*, Contrast Media Mol. I. 5, **2010**, submitted.
- [18] a) K.P. Zhernosekov, D.V. Filosofov, R.P. Baum, P. Aschoff, H. Bihl, A.A. Razbash, M. Jahn, M. Jennewein, F. Rösch, *Processing of generator-produced ^{68}Ga for medical application*, J. Nucl. Med. 48, **2007**, 1741; b) M. Asti, G. De Pietri, A. Fraternali, E. Grassi, R. Sghedoni, F. Fioroni, F. Roesch, A. Versari, D. Salvo, *Validation of $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generator processing by chemical purification for routine clinical application of ^{68}Ga - DOTATOC*, Nucl. Med. Biol. 35, **2008**, 721.

2.5 „⁶⁸Ga-labelling of DO2A-(butyl-L-tyrosine)₂ with cation-exchanger post-processed ⁶⁸Ga: Practical aspects”

Systematic ^{68}Ga -labelling of DO2A-(butyl-L-tyrosine) $_2$ with cation-exchanger post-processed ^{68}Ga : Practical aspects

Carsten Burchardt,^a Patrick J. Riss^{a,b} and Frank Roesch^{a,*}

^aInstitut fuer Kernchemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Fritz-Strassmann-Weg 2, D-55128 Mainz

^bThe Wolfson Brain Imaging Centre, University of Cambridge, Robinson Way, Cambridge, CB2 0QQ, United Kingdom

Abstract:

^{68}Ga -mediated positron emission tomography (PET) is a rapidly increasing field in molecular imaging, both in research and clinical routine. The availability of ^{68}Ga via the $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ radionuclide generator facilitates development and production of radiopharmaceuticals independent of a cyclotron. The presented work shows a complete ^{68}Ga labeling study exemplified on [^{68}Ga]DO2A-(butyl-L-tyrosine) $_2$, a promising tumor tracer for PET. It could be used as a guide to perform basic steps in ^{68}Ga -labelling. Practical aspects are described and the different parameters to care for are demonstrated. The influence of temperature, time, amount of labeling precursor and pH-value on the radiochemical yields are demonstrated. Conventional heating is compared to a microwave-supported labeling as an alternative method. Finally, purification of ^{68}Ga -labeled compounds via solid-phase extraction and quality control is shown.

Introduction:

Positron emission tomography (PET) with the positron emitter ^{68}Ga is a rapidly emerging field in molecular imaging (1). Due to its excellent availability via the $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -radionuclide generator system, the use of ^{68}Ga is more cost-effective compared to cyclotron produced

positron emitters like ^{11}C or ^{18}F . However, it is not possible to attach Ga(III) via covalent binding to bioactive molecules. To label a biomolecule with ^{68}Ga the radiometal has to be complexed in terms of co-ordinating chemistry. In comparison to the cyclotron produced “organic” radionuclides ^{11}C and ^{18}F , a completely different labelling chemistry has to be employed. Some “simple” chelators like citrate or ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) labelled with ^{68}Ga were used as radiopharmaceuticals directly (2). In some special cases, for example ^{68}Ga -labeled transferrin or porphyrins, the biomolecule bears an intramolecular opportunity to form a stable complex with ^{68}Ga (3). However, in most cases a bifunctional chelator (BFC) has to be attached to a biomolecule prior to labeling with ^{68}Ga . On one hand the BFC has to form ^{68}Ga -complexes with sufficient stability *in vivo*. On the other hand it has to offer a chemical functionality to attach the desired biomolecule finally functioning as targeting vector. Most of the suitable BFCs for ^{68}Ga today are based on macrocyclic ligands like DOTA (4) or NOTA (5) combining high thermodynamic stability with kinetic inertness. The potential of ^{68}Ga -labeled radiopharmaceuticals was demonstrated best on the example of ^{68}Ga -labeled DOTA-conjugated somatostatin analogues (6). These prototypes of G-protein coupled tumor receptor targeting radiopharmaceuticals are frequently used in the clinical routine for imaging neuroendocrine tumours by means of PET/CT. Other peptides, like bombesin (7,8) or RGD (8,9), but also small molecules, like amino acids (10) are currently under investigation for their applicability as PET-radiopharmaceuticals. This increasing demand and the high frequency of routine application of ^{68}Ga -labeled tracers in turn asks for simple but efficient radiochemical labeling pathways.

The radiochemical yields of a ^{68}Ga -labeling process are influenced by various different parameters, like temperature, reaction time, stoichiometry or pH-value. Hence the labelling procedure has to be optimised for each tracer. In this context, the rather “classical” approaches towards synthesising Me(III) imaging agents as used for example with macroscopic Gd(III) for contrast imaging agents (MRI) definitely fail if adopted directly to the “no-carrier-added” (n.c.a.) radionuclide $^{68}\text{Ga(III)}$.

Herein we investigate the role of the different parameters. The particularly relevant aspects to address are: a) The factors influencing labeling yields, b) the effective combination of labeling chemistry and subsequent time-effective purification, and c) a reliable quality

control. Finally, d) for new compounds, the stability of the formed ^{68}Ga -complexes has to be confirmed.

All procedures concerning these criteria are presented exemplified on $[^{68}\text{Ga}]\text{DO2A}-(\text{butyl-L-tyrosine})_2$ (Fig. 1), a promising new tracer for amino acid transport related tumour imaging (10). Practical aspects and pitfalls of the ^{68}Ga -labeling are discussed and the relevant techniques and methods are displayed.

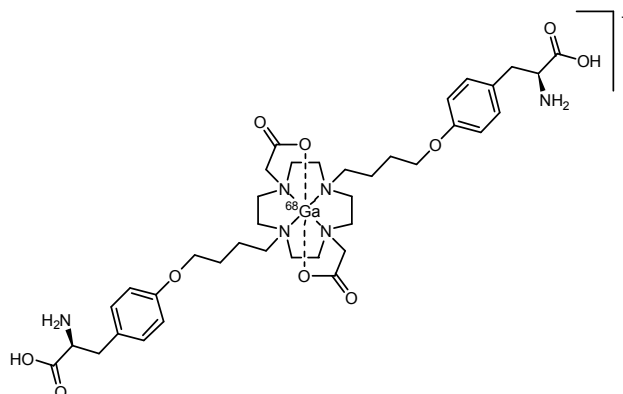


Figure 1: Structural formula of $^{68}\text{Ga}\text{-DO2A}-(\text{butyl-L-tyrosine})_2$

^{68}Ga -labeling vs. synthesis of Gd based contrast agents

On the first view the ^{68}Ga labeled PET-radiopharmaceuticals and Gd-based MRI contrast agents seem to be quite similar. Both are based on metals with the oxidation state +III and both need a chelator to form a stable complex. For both classes the same chelators are suitable and, with DOTA as best known example, are currently used. But on closer inspection huge differences between both procedures can be identified. The synthesis of a Gd-based contrast agent usually takes long reaction periods of up to 24 hours and uses equimolar amounts of Gd and chelators at gram-scale amounts at high pH values (11). Under these conditions it is not possible to perform ^{68}Ga -labelling because of several reasons. The reaction times have to be very short in consequence of the half-life of ^{68}Ga with 67.7 minutes. The amount of ^{68}Ga involved is very low. 100 MBq for example just represent 0.68 ng (10 pmol) of $^{68}\text{Ga}(\text{III})$. In addition, typical metallic impurities such as e.g. Fe(III) may present a great excess compared to $^{68}\text{Ga}(\text{III})$. Due to this facts sophisticated purification of $^{68}\text{Ga}(\text{III})$ solutions are mandatory. Nevertheless, typical amounts of labelling precursor per batch synthesis still are in the nanomolar range. Under neutral and basic conditions gallium rapidly forms $\text{Ga}(\text{OH})_3$ and $\text{Ga}(\text{OH})_4^-$, species that are not suitable for the labelling process.

Thus in opposition to the synthesis of Gd(III) contrast agents, the pH value has to be kept low. The synthesised and purified MRI contrast agents can be stored for some time, while the ^{68}Ga radiopharmaceuticals have to be immediately used. Instant purification and quality control procedures are mandatory. Because the specific activities are decreasing with the radioactive decay over the time, the specific activity (which is the absolute activity of the ^{68}Ga -tracer related to the mass of the Ga compound, e.g. MBq / μmol) gets too low, the correspondingly higher amount of the injected radiopharmaceutical may cause undesired pharmacologic effects. While contrast agents are injected in millimolar amounts, radiopharmaceuticals are injected in nanomolar doses. Due to this very low injected amounts, radiopharmaceuticals in general do not cause pharmacological effects. Table 1 summarises some aspects of Gd(III) and Ga(III) coordination chemistry.

Table 1: Selected specifics of Gd(III) and Ga(III) coordination chemistry relevant to the synthesis of imaging probes

parameters	Gd(III)	Ga(III)
co-ordination number	8	6
half-life	stable	67.7 min
synthesis period	~ 1 day	10 min
concentration	millimolar	nanomolar
stoichiometry Me(III):Ligand	1:1	1:1000-10000
pH limit due to Me(III) hydrolysis	pH < 7	pH < 4.5

The different toxicities of the metal ions cause different needs for the purification of the final product from the free metal ions. While Gd^{3+} is known to be highly toxic for the living organism ($\text{LD}_{50} = 0.4 \text{ mmol/kg}$), generator-derived radio-gallium ^{68}Ga is considered to be non-toxic. Furthermore, the injected amounts of ^{68}Ga (low picomolar range) are so small that no pharmacological effects are occurring. The reason why to purify the

radiopharmaceutical from free Ga is thus addressing a chemical and pharmacological problem: Non-complexed "free" Ga(III) preferentially binds to the iron binding sites of transferrin and leads to a high background in the subject under investigation, thereby disturbing the PET-measurement.

Results and Discussion

Post-processing of $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ radionuclide generators

In this study 350 MBq to 180 MBq $^{68}\text{Ga}/^{68}\text{Ge}$ generators, both based on titanium dioxide and produced by Cyclotron Co., Obninsk, Russian Federation, were used. This type of generator is eluted with 7 - 10 mL of 0.1 M hydrochloric acid. The volume of this generator eluate is too large and it is too acidic to perform a direct labeling. It also contains a significant amount of metal impurities, like $^{68}\text{Ge(IV)}$ breakthrough, Fe(III), Ti(IV) as released from the inorganic generator matrix and $^{68}\text{Zn(II)}$ as decay product of ^{68}Ga . For example, the number of stable ^{68}Zn atoms is about 100 times higher when coeluted with radioactive ^{68}Ga atoms after 1 day of generation. Furthermore, even hydrochloric acid of high purity is contaminated with considerable amounts of metal ions. Therefore, a post-processing of the generator eluate has to be performed to concentrate and purify the eluate. There are different post-processing methods described in the literature, the fractionated elution method, a method using an anion-exchange resin and a method using a cation-exchange resin (12-14). All these procedures lead to volume reduction and – at least gradually - separation of ^{68}Ge from ^{68}Ga . However, we preferred to use a cation-exchange method (14). With this method the volume is rather instantaneously reduced from 7 – 10 mL to 400 μL . Non-radioactive metal impurities as well as ^{68}Ge are removed, too. This post-processing was carried out prior to every labeling process and takes less than 2 minutes. We have focussed on this method, because the differences in the labeling after each post processing method may be so grave, that completely different labelling conditions and procedures have to be used.

pH-value

The pH-value plays a key-role in ^{68}Ga -labeling, since changes in the pH-value are influencing the labeling behaviour dramatically. The pH-value has to be high enough to deprotonate the donor functions of the BFC. Contradictingly, due to the aqueous chemistry of gallium, the pH-value has to be kept low to avoid the formation of Ga oxide and hydroxide species (15). For the most prominent ^{68}Ga -specific BFC used today, the suitable range for ^{68}Ga -labeling was found to be $\sim 2 - 4$. Based on these findings a setup with 5 mL of Millipore water, 13 nmol precursor and 50 μL of the post-processed generator eluate was introduced (14). Besides the pH-value, this setup has the advantage that 8 labelling experiments can be performed under the same conditions with one elution of the generator. This allows a fast screening of the labeling dependent parameters.

TFA-salt vs. desalted precursor

With the generator-derived n.c.a. ^{68}Ga an initial labeling with the TFA-salt of the precursor DO2A-(butyl-L-tyrosine)₂ was performed. The conditions were as described above using 5 mL of Millipore water and 13 nmol labeling precursor. 50 μL of the post-processed ^{68}Ga generator eluate were added to the preheated mixture. The reaction was accomplished within 15 minutes at 90°C and the resulting pH-value was 3.2. Then the TFA-salts were removed using a cation-exchange resin prior to the labelling process. The labeling yields with the desalted precursor were compared to the TFA-salt. (Fig. 2). It is clearly demonstrated that the desalted labeling precursor leads to higher radiochemical labeling yields (RCY) and faster labeling kinetics. The TFA-salt had to be heated for 30 minutes to reach comparable labeling yields as with the desalted labeling precursor. Consequently, in all following labeling processes the desalted precursor was used.

Amounts of labelling precursor

In a next step the dependency of the labeling yields on the amount of precursor was systematically investigated. Under the conditions mentioned above, the amount of labeling precursor was varied from 1 μg (1.3 nmol, $c = 0.2 \mu\text{mol/L}$) to 25 μg (32.5 nmol, $c = 6.5 \mu\text{mol/L}$). The labeling yields remained stable in the range of 5 μg (6.5 nmol) to 25 μg (32.5

nmol). Under these conditions, the use of less than 5 μg precursor resulted in very inconsistent yields (Fig. 3). For further studies 10 μg labeling precursor were used.

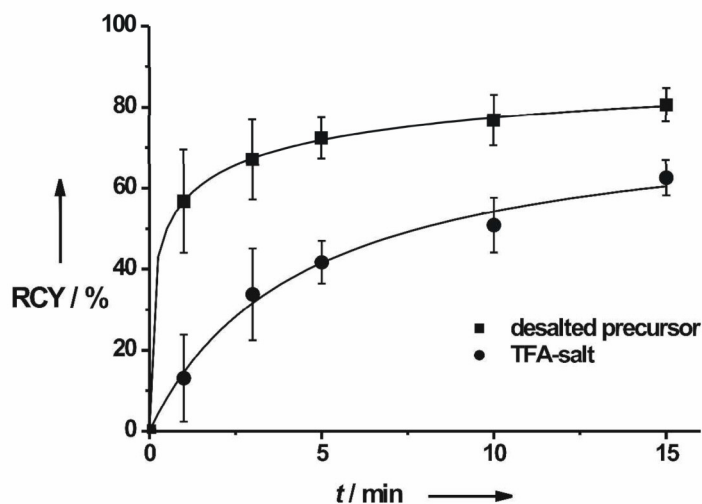


Figure 2: Comparison of the RCY of ^{68}Ga -DO2A-(butyl-L-tyrosine)₂ (triangles) and its TFA-salt (squares). Labeling conditions: 5 mL Millipore water, 90°C, 13 nmol precursor, 50 μL processed ^{68}Ga generator eluate.

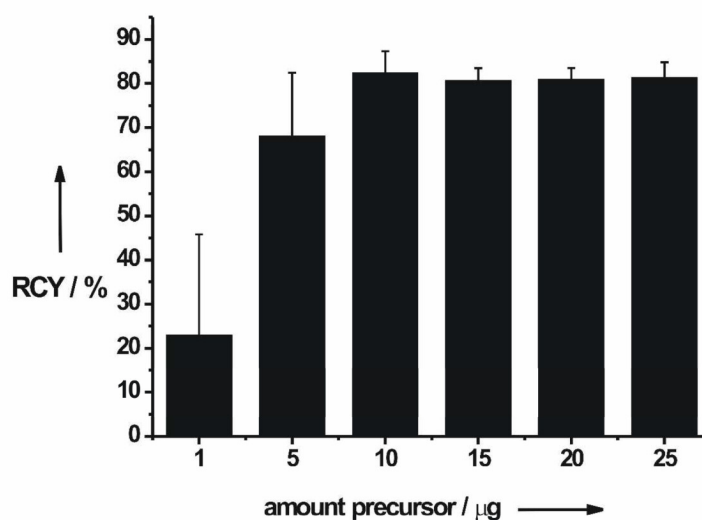


Figure 3: Comparison of the RCY of ^{68}Ga -DO2A-(butyl-L-tyrosine)₂ using 1 – 25 mg (1.3 – 32.5 nmol) desalted labeling precursor at 90 °C in 5 mL Millipore water and 50 μL processed ^{68}Ga generator eluate after 15 minutes.

Effects of reaction temperature

The labeling yields were determined for three different temperatures (50°C, 70°C and 90°C) over 15 minutes. The results are shown in figure 4. As expected, the highest yields and the fastest labeling kinetics are reached at 90°C.

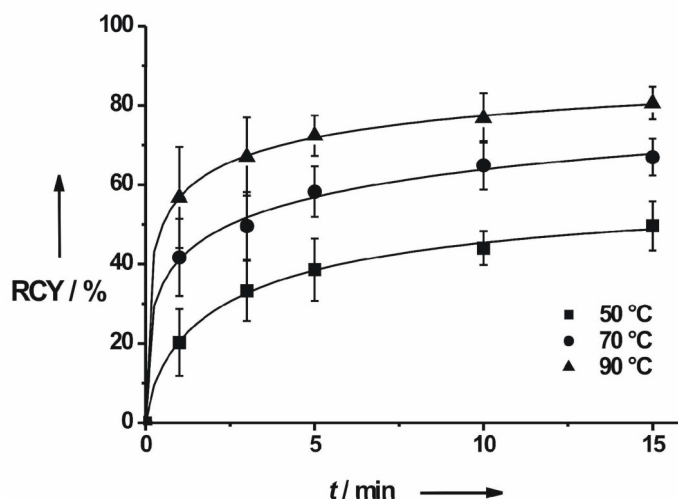


Figure 4: RCY of ^{68}Ga -DO2A-(butyl-L-tyrosine) $_2$ using 13 nmol desalted labelling precursor in 5 mL millipore water and 50 μL processed ^{68}Ga generator eluate at 50°C (squares,), 70°C (circles) and 90°C (triangles).

Microwave supported vs. conventional heating

The use of the whole generator eluate (400 μL) leads to a considerably decreased pH-value of 2.3. The labeling yield in 5 mL Millipore water in this case was lowered to about 40%. To keep the pH-value in an acceptable range, NaOH solution or HEPES-buffer could be utilized. However, the aim was to guaranty high labeling yields by using sterile filtered water exclusively, i.e. to avoid possible origins of metal impurities from buffer components. As alternative way to increase the labeling yields at more acidic pH higher temperatures are needed. Thus, in parallel, a microwave supported labeling reaction was carried out (16). The time dependency of the labeling yields were measured at 150°C and 175°C and a pressure of 12.2 bar and 16.5 bar, respectively, using the CEM Discover[®] laboratory microwave system. This microwave supported method provided labeling yields of more than 98 % after 3 minutes only (Fig. 5). Further heating resulted in the decomposition of the compound and

lowered the yields. Another advantage of the microwave supported labelling reaction is that it can be carried out in sterile filtered water with the use of the full 400 μL generator eluate and the amount of labelling precursor could be reduced compared to the conventional heating. Different amounts of labelling precursor from 1 μg (1.3 nmol) to 20 μg (26 nmol) were tested at 175 $^{\circ}\text{C}$ and 3 minutes. The results are shown in figure 6.

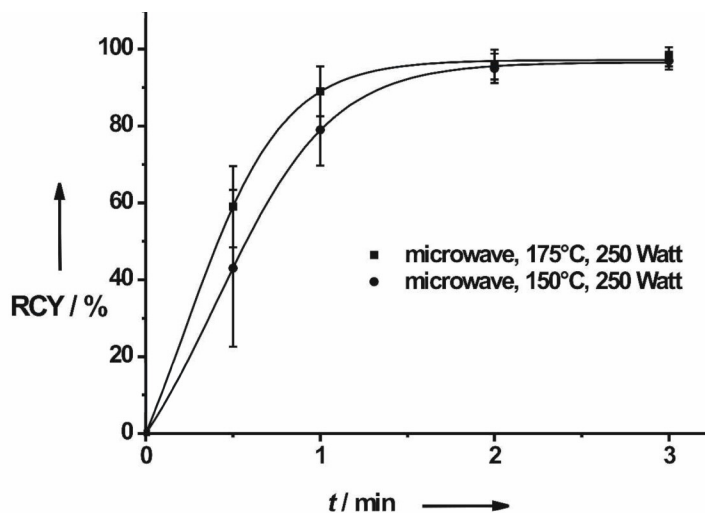


Figure 5: Microwave-supported synthesis of ^{68}Ga -DO2A-(butyl-L-tyrosine) $_2$ of 13 nmol desalted labelling precursor in 5 mL Millipore water with the total volume of 400 μL processed ^{68}Ga generator eluate at 175 $^{\circ}\text{C}$ (16.5 bar) (triangles) and 150 $^{\circ}\text{C}$ (12.2 bar) (squares).

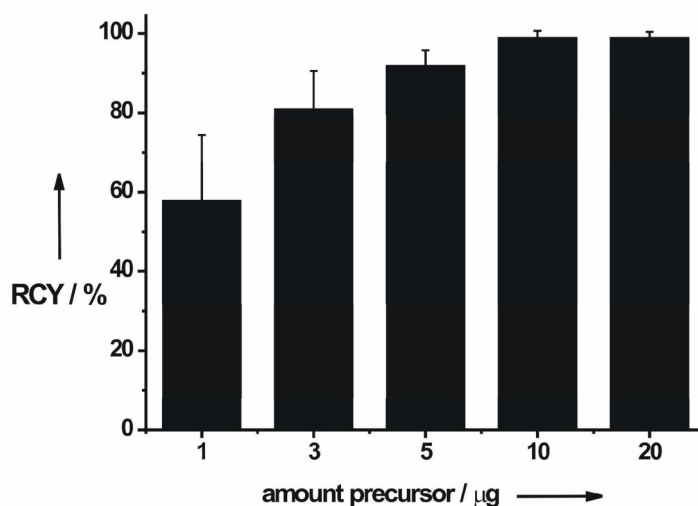


Figure 6: Microwave-supported synthesis of ^{68}Ga -DO2A-(butyl-L-tyrosine) $_2$ using 1 – 20 μg (1.3 – 32.5 nmol) desalted labelling precursor in 5 mL millipore water and the total volume of 400 μL processed ^{68}Ga generator at 175 $^{\circ}\text{C}$ after 3 minutes.

Product purification

For the purification of the ^{68}Ga -DO2A-(butyl-L-tyrosine)₂ two methods are most suited. The first one represents a semi-preparative HPLC purification, the second one is solid phase extraction (SPE). Compared to the HPLC purification, the SPE is very time-effective, so different SPE cartridges were checked for their applicability. A Waters C18 light, a Waters Silica light and a Merck lichrolute SCX cartridge were utilized. The adsorption of the whole radioactivity, the percentage of activity remaining on the cartridge and the purity of the labeled compound after the SPE purification are summarized in table 2. For these experiments batches with labeling yields of about 70%, containing up to 30% non-reacted $^{68}\text{Ga}(\text{III})$, were used. The results show that the SCX cartridge is very well suited for this molecule, because 99% of the overall ^{68}Ga -DO2A-(butyl-L-tyrosine)₂ are adsorbed on the cartridge and the radiopharmaceutical can easily be removed with PBS-buffer pH 7.4, while the non-reacted $^{68}\text{Ga}(\text{III})$ is remaining on the cartridge.

Table 2: Comparison of three SPE methods for purification of ^{68}Ga -DO2A-(butyl-L-tyrosine)₂

cartridge	adsorption	eluent	purity
Waters SepPak® light silica	82 ± 5 % (at 4°C)	0.9% NaCl solution	90 ± 3 %
Waters SepPak® light C-18	63 ± 7 %	Ethanol	84 ± 5 %
Merck Lichrolut® SCX	97 ± 2 %	PBS buffer pH 7.4	99 ± 1 %

In vitro stability of the labelled product

The stability of the formed ^{68}Ga -complex has to be checked finally. This was performed in two competition experiments utilizing DTPA, a chelator, which enables ^{68}Ga -labelling at room temperature, and human *apo*-transferrin to simulate the situation *in vivo*. The labeled product was incubated with a 750-fold excess of DTPA and an about 400-fold excess of *apo*-transferrin at 37°C for two hours. The ^{68}Ga -complex was completely stable over this period of time (Fig. 7).

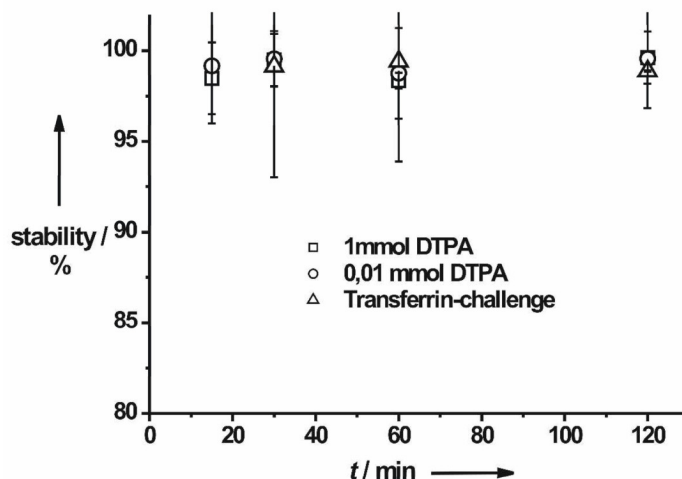


Figure 7: Challenge experiment of $^{68}\text{Ga-DO2A-(butyl-L-tyrosine)}_2$ with 10 mL of DTPA in two concentrations (1 mmol, 750-fold excess; circles; 1 μmol , 0.75 equiv, squares) and 5 mL *apo*-transferrin solution (1 mmol, 375-fold excess, triangles) at 37°C.

Final quality control

For the quality control two methods are available, namely analytical radio-HPLC and radio-TLC. The purified compound $^{68}\text{Ga-DO2A-(butyl-L-tyrosine)}_2$ was analysed with both methods. For radio-TLC, silica-gel plates with two different mobile phases was used. As one mobile phase citrate buffer pH 4 was utilized. This solvent is forming a $^{68}\text{Ga-citrate}$ complex with a R_f of 0.9 while $^{68}\text{Ga-DO2A-(butyl-L-tyrosine)}_2$ remains on the starting line. As a second mobile phase 5%-NaCl-solution with 25% ethanol was used. Under these conditions the “free” ^{68}Ga remains at the starting line and $^{68}\text{Ga-DO2A-(butyl-L-tyrosine)}_2$ is identified at R_f of 0.4. It is always recommended to perform different TLC-methods to avoid the overlay of two or more spots. The labeling yields of all reactions were cross-checked under these two analytical conditions and compared to the results of the analytical HPLC. Both quality control methods led to comparable results.

Conclusions

In this study the labeling yields of $^{68}\text{Ga-DO2A-(butyl-L-tyrosine)}_2$ were optimised. With the cation-exchanger post-processing derived ^{68}Ga it is possible, due to the very low amount of

metal impurities to perform all labeling procedures reliably in pure water with low precursor concentrations. Desalted labeling precursors are superior to TFA-salts. Besides the conventional heating, microwave supported synthesis results in remarkably high, almost quantitative yields and is very time-effective. SPE-purification with SCX cartridges can be a time-effective alternative to HPLC purification. The optimised labeling procedure including generator elution, post-processing, microwave supported labeling and SPE purification takes 13 minutes only. The labeled ^{68}Ga -DO2A-(butyl-L-tyrosine)₂ was formulated in PBS-buffer pH 7.4 and was readily employed in further applications like small animal PET-studies after sterile filtration. With this experimental setup, specific activities up to 100 GBq/ μmol were obtained. A further improvement should be possible using a $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generator initially delivering higher activities.

These parameters clearly illustrate the options of radiochemical chemistry to parallel Gd(III) coordination chemistry under conditions of minimal concentrations of both trivalent metal and ligand.

The investigated methods and procedures were all exemplified on the labeling precursor DO2A-(butyl-L-tyrosine)₂, however, they can be easily transferred to any other new derivative. Each novel labeling precursor, nevertheless, will show a special behaviour, so a systematic labeling study will be necessary. This work is just a guideline, giving some hints and examples how to start, when synthesising a new ^{68}Ga -compound as a new potential ^{68}Ga -PET-tracer.

Experimental:

All the used chemicals are commercially available at Fluka, Acros Organics, Merck and Sigma Aldrich and possess the highest available quality and purity. Deionised water was filtered through a Millex[®] Millipore filter membrane (0.54 μm) prior to use. For the radio-TLC, Merck Silica F₂₅₄ TLC-Plates and a Canberra Instant Imager was used. Analytical HPLC was

performed with a Phenomenex[®] Synergy 4 μ Max RP 80A 250x4.6 mm 4 micron column and the microwave reactions were carried out in a CEM Discover[®] Lab microwave.

General

Generally all contaminations with other metals should be avoided. So in all experiments plastic spatulas were used replacing metal ones. As labeling media, freshly prepared sterile filtered water was utilized. ⁶⁸Ga has a considerably higher β^+ -energy than for example ¹⁸F. Adequate shielding is necessary, especially to avoid high finger doses.

Desalting

The TFA-salt of the labelling precursor DO2A-(butyl-L-tyrosine)₂ (100 – 250 mg) was dissolved in 5 mL Millipore water and adsorbed on a XAD1600 cation-exchange resin (~ 5 g in a small column), then rinsed neutral with about 40 mL of water and eluted with an increasing gradient of methanol in water. The desalted product was collected in 10 mL fractions. After lyophilisation the desalted precursor was received.

Standard labelling conditions

The precursor (1 mg) was dissolved in 1 mL Millipore water to form a stock solution which was stored at -20°C. The reaction mixture with 5 mL Millipore water and the desired amount of labeling precursor from the stock solution was, in case of conventional heating, preheated for 2 minutes to the desired labeling temperature. The needed volume of the post-processed ⁶⁸Ga generator eluate was added to form an acidic reaction medium. For microwave-supported synthesis, all parts were mixed up in a 10 mL microwave reaction vial, the vial was closed and the reaction started. After the desired labeling period the reaction vial was removed from the oil bath or the microwave heating was aborted.

Radio-TLC

After specific timepoints (e.g. 1, 3, 5, 10, 15 minutes) 2 μL -fractions were taken from the reaction vial and spotted on a Merck Silica TLC-plate. Two different mobile phases were used. As one mobile phase citrate buffer pH 4 was utilized. This solvent is forming a ^{68}Ga -citrate complex with the not reacted ^{68}Ga which has a RF of 0.9 while the product complex remains on the starting line. As a second mobile phase 5 % NaCl-solution with 25 % ethanol was used. Under these conditions the free ^{68}Ga remains at the starting line and the complex was running to a RF of 0.4.

HPLC

For HPLC, a Phenomenex® Synergy 4 μ Max RP 80A 250x4.6 mm 4 micron column and a mixture of Millipore water / methanol (90:10, 0.1 % TFA) as solvent was used. For each run 20 μL of the labelling mixtures were injected.

Purification

All cartridges (Waters Silica, Waters C18 small, Merck Lichrolute SCX) were preconditioned following the instructions of the manufacturer. The precursor was labeled with yields of 65 – 75 %. The mixture of ^{68}Ga -DO2A-(butyl-L-tyrosine)₂ and “free” ^{68}Ga was transferred over the preconditioned cartridges. The cartridges were rinsed with 10 mL Millipore water, then the product was eluted. In the case of the C18 cartridge, ethanol p.a. was used with the drawback, that the ethanol had later on to be removed before the formulation of ^{68}Ga -DO2A-(butyl-L-tyrosine)₂ in sterile 0.9 % NaCl-solution. The reaction mixture had to be cooled to 0°C before getting absorbed on the silica cartridge. After the use of 5 mL Millipore water the product was received utilizing 3 mL of preheated 0.9 % NaCl-solution. On the SCX-cartridge the whole activity of ^{68}Ga -DO2A-(butyl-L-tyrosine)₂ was adsorbed. The cartridge was rinsed with 5 mL water and the pure ^{68}Ga -DO2A-(butyl-L-tyrosine)₂ was collected in 3 mL PBS-buffer pH 7.4, ready to inject after sterile filtration.

Stability

The stability of the formed ^{68}Ga -DO2A-(butyl-L-tyrosine)₂ was checked utilizing DTPA and *apo*-transferrin. The purified product was formulated in 3 mL PBS-buffer pH 7.4. This solution was split up in six parts. To three vials was added 10 mL 1 mmol DTPA-solution, to the other three vials was added 5 mL 1 mmol *apo*-transferrin-solution. The solutions were stored at 37 °C. At specific time-points (15, 30, 60, 120 minutes), a radio-TLC was performed using the NaCl/EtOH solvent with a Rf of 0.4 for ^{68}Ga -DO2A-(butyl-L-tyrosine)₂

Acknowledgments:

This work was supported by the EU through the COST action D38.

References:

1. a) Roesch F, Riss PJ. The renaissance of the $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ radionuclide generator initiates new developments in ^{68}Ga radiopharmaceutical chemistry. *Curr. Top. Med. Chem.* 2010, accepted; b) Fani M, Andre JP, Mäcke H. ^{68}Ga -PET: A powerful generator-based alternative to cyclotron-based radiopharmaceuticals. *Contrast Media Mol. I.* 2008; 3: 67-77. DOI: 10.1002/cmml.232.
2. a) Edwards CL, Hayes RL. Tumor scanning with ^{67}Ga citrate. *J. Nucl. Med.* 1969; 10: 103–105. DOI:; b) Sundberg MW, Meares CF, Goodwin DA, Diamanti CI. Selective binding of metal ions to macromolecules using bifunctional analogs of EDTA. *J. Med. Chem.* 1974; 17: 1304-1308. DOI: 10.1021/jm00258a015; c) Brechbiel MW, Gansow OA, Atcher RW, Schlom J, Esteban J, Simpson D, Colcher D. Synthesis of 1-(p-isothiocyanatobenzyl) derivatives of DTPA and EDTA. Antibody labeling and tumor-imaging studies. *Inorg. Chem.* 1986; 25: 2772-1781. DOI: 10.1021/ic00236a024.
3. a) Zoller F, Riss PJ, Montforts FP, Roesch F. Efficient post-processing of generator eluates facilitates ^{68}Ga -labeling under anhydrous conditions; *Radiochim. Acta* 2010; 98: 157-160. DOI:10.1524/ract.2010.1698; b) Ohtake Y, Maruko A, Kuwahara Y,

- Fukumoto M, Ohkubo Y. Stabilities of ^{67}Ga - and ^{111}In -labeled transferrin *in vitro*. *Protein Pept. Lett.* 2009; 16: 138-142. DOI:
4. De Leon-Rodriguez LM, Kovacs Z. The synthesis and chelation chemistry of DOTA-peptide conjugates. *Bioconjugate Chem.* 2008; 19: 391-402. DOI: 10.1021/bc700328s
 5. a) Riss PJ, Kroll C, Nagel V, Roesch F. NODAPA-OH and NODAPA-(NCS)_n: Synthesis, ^{68}Ga -radiolabelling and *in vitro* characterisation of novel versatile chelators for molecular imaging. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008; 18: 5364-5367. DOI: 10.1016/j.bmcl.2008.09.054; b) Velikyan I, Mäcke HR, Langström B. Convenient preparation of ^{68}Ga -based PET-radiopharmaceuticals at room temperature. *Bioconjugate Chem.* 2008; 19: 569-573. DOI: 10.1021/bc700341x
 6. a) Al-Nahhas A, Win Z, Szyszko T, Singh A, Nanni C, Fanti S, Rubello D. Gallium-68 PET: A new frontier in receptor cancer imaging. *Anticancer Res.* 2007; 27: 4087-4094. DOI: b) Asti M, De Pietri G, Fraternali A, Grassi E, Sghedoni R, Fioroni F, Roesch F, Versari A, Salvo D. Validation of $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generator processing by chemical purification for routine clinical application of ^{68}Ga - DOTATOC. *Nucl. Med. Biol.* 2008; 35: 721-724. DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2008.04.006; c) Velikyan I; Sundin A, Eriksson B, Lundqvist H, Soerensen J, Bergstroem M, Langstroem B. *In vivo* binding of [^{68}Ga]-DOTATOC to somatostatin receptors in neuroendocrine tumours - impact of peptide mass. *Nucl. Med. and Biol.* 2010; 37: 265-275. DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2009.11.008; d) Eisenwiener KP, Prata MIM, Buschmann I, Zhang HW, Santos AC, Wenger S, Reubi JC, Maecke HR. NODAGATOC, a New Chelator-Coupled Somatostatin Analogue Labeled with [$^{67/68}\text{Ga}$] and [^{111}In] for SPECT, PET, and Targeted Therapeutic Applications of Somatostatin Receptor (hsst2) Expressing Tumors. *Bioconjugate Chem.* 2002; 13: 530-541. DOI: 10.1021/bc010074f
 7. Mäcke H, Hofmann M, Haberkorn U. ^{68}Ga -labeled peptides in tumor imaging. *J. Nucl. Med.* 2005; 46: 172S-178S. DOI:
 8. Liu Z, Niu G, Wang F, Chen X. ^{68}Ga -labeled NOTA-RGD-BBN for dual integrin and GRPT-targeted tumor imaging. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. I.* 2009; 36: 1483-1494. DOI: 10.1007/s00259-009-1123-z
 9. Haubner R, Decristoforo C. Radiolabelled RGD peptides and peptidomimetics for tumour targeting. *Front. Biosci.* 2009; 14: 872-886. DOI:

10. Burchardt C, Riss PJ, Zoller F, Maschauer S, Prante O, Kuwert T, Rösch F. [^{68}Ga]Ga-DO2A-(Obu-L-Tyr) $_2$: Synthesis, ^{68}Ga -labeling, and in vitro studies of a novel ^{68}Ga -DO2A-tyrosine conjugate as potential tumour tracer for PET. *Bioorg. Med Chem. Lett.* 2009; 19: 3498-3501. DOI: doi:10.1016/j.bmcl.2009.05.001
11. Aime S, Geninatti C, Gianolio E, Giovenzana GB, Tei L, Torreno E. High sensitivity lanthanide(III) based probes for MR-medical imaging. *Coord Chem Rev.* 2006; 250: 1562-1579. DOI: 10.1016/j.ccr.2006.03.015
12. Breeman WAP, de Jong M, de Blois E, Bernard BF, Konijnenberg M, Krenning EP. Radiolabelling DOTA-peptides with ^{68}Ga . *Eur. J. Nucl. Med. Mol. I.* 2005; 32: 478-485. DOI: 10.1007/s00259-004-1702-y
13. Meyer GJ, Mäcke H, Schuhmacher J, Knapp WH, Hofmann M. ^{68}Ga -labelled DOTA-derivatised peptide ligands. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. I.* 2004; 31: 1097-1104. DOI: 10.1007/s00259-004-1486-0
14. Zhernosekov KP, Filosofov D, Baum RP, Aschoff P, Bihl H, Razbash AA, Jahn M, Jennewein M, Roesch F. Processing of generator-produced ^{68}Ga for medical application. *J. Nucl. Med.* 2007; 48: 1741-1748. DOI: 10.2967/jnumed.107.040378
15. Green AM, Welch MJ. Gallium radiopharmaceutical chemistry. *Int. J. Radiat. Appl. Instrum. Part B.* 1989; 16: 435-448.
16. Velikyan I, Beyer GJ, Langström B. Microwave supported preparation of ^{68}Ga -bioconjugates with high specific activity. *Bioconjugate Chem.* 2004; 15: 554-560. DOI: 10.1021/bc030078f

2.6 Radiochemical evidence for the competitive formation of Ga^{III} HEPES complexes in ⁶⁸Ga labeling reactions”

Radiochemical evidence for the competitive formation of Ga^{III} HEPES complexes in ⁶⁸Ga labeling reactions

P. J. Riss,^{a,b} A. A. Coarasa,^{b,c} C. Burchardt,^b C. Kroll^b and F. Roesch^b

^aThe Wolfson Brain Imaging Centre, University of Cambridge, Box 65 Addenbrooke's Hospital, CB2 0QQ, Cambridge, UK. Fax: +44 (0)1223 331826; Tel: +44(0) 1223 748188; E-mail: pr340@wbic.cam.ac.uk

^bInstitute of Nuclear Chemistry, Johannes Gutenberg-University, Fritz Strassmann Weg 2, 55128 Mainz,, Germany.
Fax: +49 6131 3924692; Tel: +49 6131 3925302; E-mail: frank.roesch@uni-mainz.de

^c Instituto Superior de Tecnologías y Ciencias Aplicadas, Habana, Cuba

Abstract

The present report is concerned with the formation of a radioactive complex formed from 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid (HEPES) and ⁶⁸Ga^{III} in HEPES buffered aqueous solutions. The complex has been identified as a [⁶⁸Ga]Ga(HEPES) complex via chromatographic comparison with the non radioactive analogue. Complex formation was identified to compete with [⁶⁸Ga]Ga(NOTA) complexation at low NOTA concentration.

Introduction

Generator derived ⁶⁸Ga^{III} chloride is increasingly used in molecular imaging studies with PET. Complex formation with the pH sensitive Ga³⁺ cation requires mildly acidic conditions to

achieve high yield in a short reaction time.¹ To maintain the labeling media within an appropriate range of pH 2.8 to 3.8, 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid (HEPES) is frequently used as a buffer.² HEPES is preferred in those cases, where the content of metals in buffers like sodium acetate is interfering with the complex formation of the radiometal.³ Due to the low amount of the non carrier added (n.c.a.) radionuclide per labeling reaction compared to the buffer substance, a very low interaction between the constituents of the buffer solution and Ga^{III} cations is desirable.

There have been contradictory reports on such interactions between Ga^{III} and HEPES in aqueous solution. An early report explicitly mentions that no significant interactions between Ga^{III} and HEPES were found in aqueous solution using ⁷¹Ga and ¹H NMR. Conversely, more recent NMR data suggests relevant complex formation like interactions between Ga^{III} and HEPES.⁴

Herein, radiochemical evidence on the formation of such a complex and its thin layer chromatographic (TLC) separation from ⁶⁸Ga complexes with 1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid (NOTA) and citrate is reported.

Results and discussion

The effect of precursor concentration on the radiochemical yield on the formation of NOTA complexes of ⁶⁸Ga was examined in water or HEPES-buffer at various concentrations. Standard labeling conditions using 400 µL of generator eluate preprocessed by cation exchange chromatography from a clinical 50 mCi (1.85 MBq) “Obninsk”-type generator (Cyclotron Co. Ltd., Obninsk, Russia) were used.⁵ The reaction temperature was varied from 45 to 75 °C and the pH was 2.0 (pure water), 2.22 (0.01 M HEPES) and 3.8 (0.1 M HEPES buffer) at 25 °C. Initial labeling experiments were conducted at a 13 nM concentration of NOTA in 0.1 mM HEPES. The NOTA concentration was then reduced in order to investigate the potential of minimizing the precursor concentration for successful ⁶⁸Ga labeling.

As soon as the NOTA concentration was reduced to 3.3 nM, the overall yield of [⁶⁸Ga]Ga(NOTA) was diminished and an additional ⁶⁸Ga species became observable. This effect was further pronounced in the lower temperature range around 45 °C and *a fortiori* at a concentration of 0.66 nM (Figure 1).

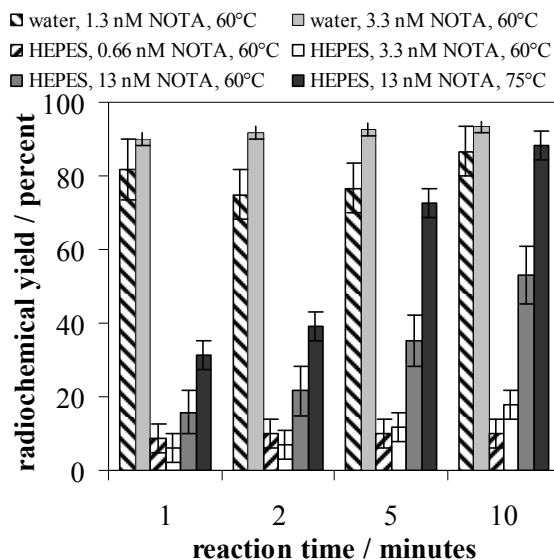


Figure 1: Radiochemical yields for the $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}(\text{NOTA})$ complex at various chelator concentrations as a function of reaction time at 60 °C in water and 100 mM HEPES buffer and at 75 °C in HEPES buffer. (a) 1.3 nM NOTA in water, (b) 3.3 nM NOTA in water, (c) 0.66 nM NOTA in 100 mM HEPES at pH 3.8, (d) 3.3 nM NOTA in 100 mM HEPES, (e) 3.3 nM NOTA in 100 mM HEPES, (f) 3.3 nM NOTA in 100 mM HEPES, 75 °C. Errors are 1 S.D.

In the analytical studies, a solution and citrate buffer at pH 4 was used as mobile phase. In addition, a citrate free medium was applied (5% sodium chloride/ethanol solution). Using citrate buffer at pH 4 for TLC, the observed yield of this radioactive product was lower as well, but instead the characteristic $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}(\text{citrate})$ trace was formed. No corresponding byproduct was observed using deionised water filtered through a 0.54 μm filter membrane (Millipore®).

These findings suggest, that a weak complex between HEPES and $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ is formed when a huge excess of HEPES is present in the labeling solution. When the HEPES buffer concentration was reduced to 10 mM, the yield of the byproduct was lower.

To scrutinize the possible formation of a ^{68}Ga complex with HEPES, aliquots of the processed generator eluate were heated to 60 °C in purified water at pH 2, 10 mM and 100 mM HEPES buffer (pH 2.2 and 3.8, respectively), without the addition of NOTA chelator. No ^{68}Ga

complex was formed in water under these conditions, whereas both HEPES solutions showed a radioactive product at the same R_f value of 0.17 on the radio-TLC (Figure 2).

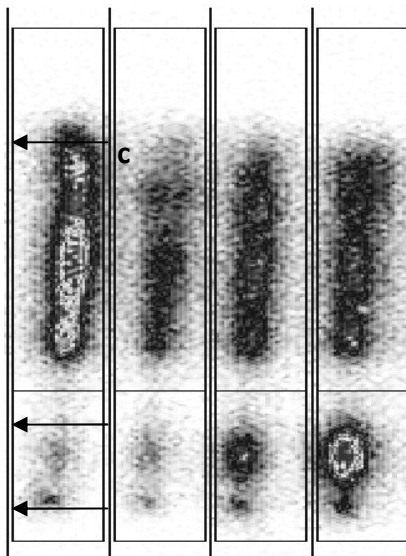


Figure 2: Radio TLC plate (silica gel 60, citrate buffer pH 4) showing the formation of $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}(\text{HEPES})$ (b) and $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}(\text{citrate})$ (c) after 1, 2, 5 and 10 minutes. (a) start.

Using citrate buffer for TLC, free or weakly complexed $^{68}\text{Ga}^{\text{III}}$ forms a mixture of $^{68}\text{Ga}(\text{citrate})_n$ species which result in a characteristic radioactivity distribution from $R_f = 0.3$ to $R_f = 0.8$. In contrast, one single product is observed using NaCl/EtOH solution as mobile phase. In this case, non complexed ^{68}Ga species remain at the start, whereas the weakly complexed $^{68}\text{Ga}(\text{HEPES})$ runs to $R_f = 0.1$. Comparable yields were found for both separation methods.

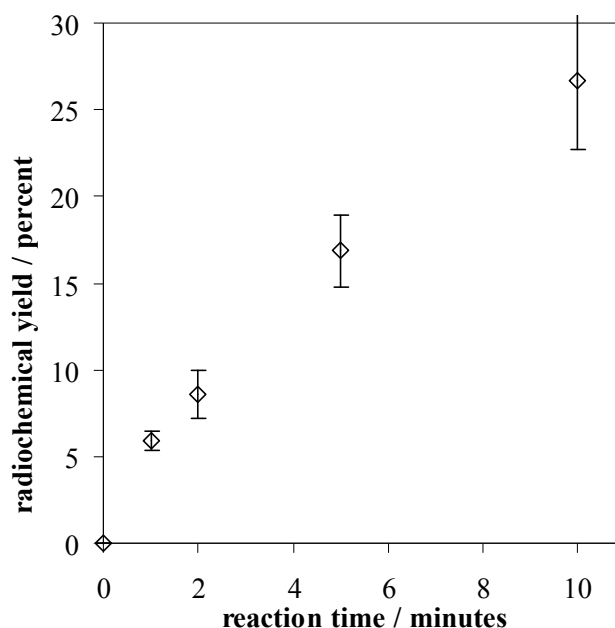


Figure 3: Radiochemical yield of [^{68}Ga]Ga(HEPES) in NOTA-free solutions of HEPES (100 mM, pH 3.8) as a function of reaction time. Errors are 1 S.D.

To verify the identity of the unidentified product, the formation of crystalline complex was investigated. Though various conditions were examined, only amorphous products were obtained. However, analysis of a concentrated stoichiometric mixture of GaCl_3 and HEPES in water by mass spectrometry revealed the presence of a species corresponding to the molar mass of $^{69,71}\text{Ga}(\text{HEPES})$. Besides this product, the $\text{Ga}(\text{HEPES})_2$ complex and several degradation products were found. The obtained product mixture showed a retention factor in the same range as the putative complex formed during the labeling studies on TLC.

In summary, the data presented herein strongly supports the claim, that a semi stable $^{68}\text{Ga}(\text{HEPES})$ complex can be formed during ^{68}Ga radiolabeling at low NOTA concentrations and medium temperatures. This is rather surprising, as the thermodynamic stability constant for $\text{Ga}^{\text{III}}\text{-NOTA}$ complex formation is rather high^{1,6}. These findings suggest that using HEPES buffer may limit the achievable labeling yield when low amounts of the intended ligands such as NOTA or NOTA-conjugated molecular targeting vectors such as e.g. NOTA-octreotides are used. Thereby, HEPES may also exhibit a negative effect on the specific activity of the ^{68}Ga formulation.

Experimental

Radiolabeling procedure: A stock solution of NOTA was prepared with 1 mg of the pure product in 1 mL of Millipore water (1mg / mL). This solution was used to prepare the labeling vessels for all the experiments. The experiments were carried out adding the 400 μ L elution from the generator to 5 mL of HEPES buffer (pH = 3.7, Merck KGaA, Germany or Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany), 0.5 ml of HEPES buffer in 4.5 ml of water or pure water and preheating the sample for 10 minutes. Subsequently, a defined volume of NOTA stock solution was added. The volumes used were 1, 5 and 20 μ L (1, 5 and 20 μ g, respectively) at a temperature of 60 and 75°C. Samples (1 μ l) were taken after 1, 2, 5, and 10 minutes, placed on a silica gel coated TLC plate (5 x 10 cm, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and run in two different solvents: 5% aqueous NaCl/EtOH (7:3) and citrate buffer (pH = 4, Merck KGaA, Darmstadt Germany). Detection was performed using a Canberra InstantImager for radioactivity, UV lamp, iodine on silica gel and potassium permanganate solution.

Formation of non radioactive Ga(HEPES): HEPES (0.11 mmol, 241 mg) and GaCl₃ (0.1 mmol, 17.6 mg) were dissolved in D₂O (1 ml) under sonication. The solvent was removed by evaporation *in vacuo* and the residue was taken up in D₂O (1 ml). The obtained solution was used for mass spectrometry measurements. MS(ESI) m/z found: 305.06 (M⁺, 9.33%), 307.05 (M⁺, 2.23)

Acknowledgments

The authors are grateful to the 'Fonds der Chemischen Industrie' for the donation of various chemicals and solvents. The european network of the COST D38 action is gratefully acknowledged. A.A.C. thanks the IAEA for a fellowship under the Agency's Technical Cooperation Programme.

References and Notes

- (1) F. Roesch and P. J. Riss, *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, in press,
- (2) (a) I. Velikyan, H. Maecke, B. Langstrom, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 569-573; (b) M. Eder, B. Waengler, S. Knackmuss, F. LeGall, M. Little, U. Haberkorn, W. Mier, M. Eisenhut, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imag.* **2008**, *35*, 1878-1886.
- (3) (a) W.A.P. Breeman, M. de Jong, E. de Blois, B.F. Bernard, M. Konijnenberg, E.P. Krenning. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imag.* **2005**, *32*, 478-485; (b) G. J. Meyer, H. Mäcke, J. Schuhmacher, W. H. Knapp, M. Hofmann, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imag.* **2004**, *31*, 1097-1104; (c) A. M. Green, M. J. Welch, *Int. J. Radiat. Appl. Instrum. Part B.* **1989**, *16*, 435-448.
- (4) (a) C. H. F. Chang, T. P. Pitner, R. E. Lenkinski, J. D. Glickson, *Bioinorg. Chem.* **1978**, *8*, 11-19; (b) M. I. M. Prata, A. F. Martins, S. P. J. Rodrigues, C. F. G. C. Geraldes, **2009**, COST **D38** Symposium, Warsaw
- (5) (a) K. P. Zhernosekov, D. V. Filosofov, R. P. Baum, P. Aschoff, H. Bihl, A. A. Razbash, M. Jahn, M. Jennewein, F. Rösch, *J. Nucl. Med.* **2007**, *48*, 1741-1748; (b) M. Asti, G. De Pietria, A. Fraternalia, E. Grassib, R. Sghedonib, F. Fioronib, F. Roesch, A. Versaria, D. Salvoa, *Nucl. Med. Biol.* **2008**, *35*, 721-724.
- (6) A. E. Martell, R. J. Motekaitis, E. T. Clarke, R. Delgado, Y. S. Rong. *Supramol. Chem.* **1996**, *6*, 353-363

2.7 „Isolierung Radiometall-markierter Pharmaka auf Grundlage makrozyklischer Liganden“

Isolierung Radiometall-markierter Pharmaka auf Grundlage makrozyklischer Liganden

Die Erfindung betrifft die Abtrennung, sowohl des Markierungsvorläufers, einer inaktiven Verbindung, die in der Lage ist ein Radionuklid stabil zu binden und so ein Radiopharmakon zu formen, als auch des Radiometalls, von einer Verbindung des Typs "Radiometall-DOTA-konjugiertes-Radiopharmakon", um so in sehr kurzer Zeit sehr hohe spezifische Aktivitäten zu erreichen.

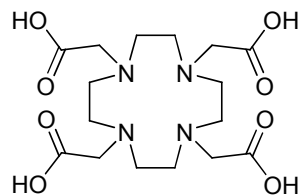
In der medizinischen Bildgebung werden Targeting-Vektor-konjugierte DOTA-Metallkomplexe zur Funktions- und Lokalisationsdiagnostik, sowie in der Therapie angewandt.

Peptid-konjugierte DOTA-Metallkomplexe werden in der (Tumor-)Diagnostik mit den beiden bildgebenden Verfahren Positron-Emission-Tomography (PET) und Single-Photon-Emission-Computed-Tomography (SPECT) eingesetzt. Eine weitere Anwendung finden sie in der Endoradiotherapie. Hierbei macht man sich zunutze, dass DOTA sowohl für die Bildgebung relevante Radionuklide wie ^{68}Ga (PET) und ^{111}In (SPECT) als auch therapeutisch eingesetzte Nuklide wie ^{90}Y oder ^{177}Lu stabil komplexiert. Es ist also möglich, einen identischen Markierungsvorläufer für alle Anwendungen einzusetzen. Aufgrund dieser vielfältigen Möglichkeiten stellen Peptid-konjugierte DOTA-Metallkomplexe eine sehr interessante Verbindungsklasse in Forschung und klinischer Anwendung dar. Ein Problem bei dieser Verbindungsklasse ist oft die Abtrennung von markiertem Produkt und Markierungsvorläufer. Dies ist ein wichtiger Prozess, da häufig ein sehr großer Überschuss an Markierungsvorläufer eingesetzt wird und die nicht-markierten Markierungsvorläufer mit den markierten Derivaten um die Bindungsstellen *in vivo* konkurrieren und so die Diagnostik/Therapie erschweren.

Peptid-konjugierte DOTA-Metallkomplexe zur Tumordiagnostik/-therapie

Peptid-konjugierte DOTA-Metallkomplexe bestehen aus einem Peptid (Targeting Vektor), das selektiv an ein bestimmtes Target im Körper, oft ein auf Tumoren überexprimierter Rezeptor, bindet und dem bifunktionellen Chelator 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraacetat (DOTA) für die stabile Komplexierung eines metallischen Radionuklids. Die Anknüpfung des Peptids an das DOTA kann dabei entweder direkt über eine Amidbindung zwischen einem der Acetatreste des DOTA und dem N-Terminus des jeweiligen Peptids oder über einen sogenannten Spacer erfolgen. Ein Spacer ist hierbei eine kurze oft aliphatische oder heterosubstituierte Kette, die eingebracht wird, um den Abstand zwischen Peptid und Chelator zu erhöhen und so negative Einflüsse auf die Affinität zum jeweiligen Target zu minimieren.

Ein großer Vorteil des DOTA ist die Fähigkeit, verschiedene metallische Radionuklide stabil zu komplexieren. So ist DOTA z. B. für die PET-Nuklide ^{68}Ga , ^{86}Y und ^{44}Sc , die SPECT-Nuklide ^{67}Ga und ^{111}In , sowie die Therapie-Nuklide ^{90}Y und ^{177}Lu geeignet. Außerdem bietet DOTA eine einfache Kopplungsmöglichkeit über eine Amidbindung und ist kommerziell bei vielen Anbietern erhältlich.



DOTA

Abbildung 1: Strukturformel 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraacetat (DOTA)

Als Targeting Vektoren, die an DOTA konjugiert werden, werden meistens Peptide verwendet. Die bekanntesten Beispiele sind DOTA-konjugierte Somatostatin-Analoga. Somatostatin-Rezeptoren sind auf neuroendokrinen Tumoren stark überexprimiert und eignen sich daher hervorragend als biologisches Target. Da Somatostatin allerdings eine nur sehr kurze biologische Halbwertszeit von 2-4 Minuten besitzt wurde, aus dem ursprünglich 14 Aminosäuren umfassenden endogenen Somatostatin die pharmakophore Gruppe in das

Octapeptid (D-Phe-c[Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr(ol) (Octreotid) überführt und dieses mittels einer Disulfidbrücke und dem Einbau anderer (auch D-)Aminosäuren stabilisiert. Das vielleicht bekannteste Beispiel ist das ^{68}Ga -markierte DOTATOC (DPhe¹-Tyr³-Octreotid). DOTATOC wird heute mit fast allen oben genannten Radionukliden markiert und eingesetzt. Außerdem werden auch andere Somatostatin-Analoga wie DOTATATE (Tyr³-Octretat) oder DOTANOC (Naphtyl³-Octreotid) verwendet.

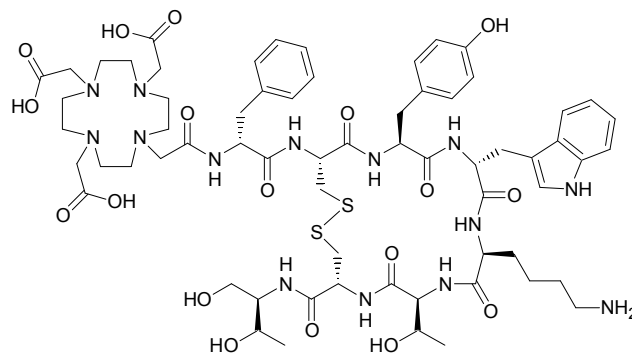


Abbildung 2: Strukturformel Markierungsvorläufer DOTATOC

Neben den Somatostatin-Analoga werden aber auch andere DOTA-konjugierte Peptide verwendet. Bekannte Beispiele sind Bombesin-Derivate, einem Peptid das eine große Ähnlichkeit zur pharmakophoren Gruppe des Gastrin-Releasing-Peptide (GRP) aufweist und eine hohe Affinität zum GRP-Rezeptor besitzt, der auf zahlreichen Tumorarten wie Brust- oder Prostatakrebs überexprimiert wird. Ein weiteres Beispiel ist die RGD-Sequenz (Arginin-Glycin-Asparaginsäure). Aus Gründen der höheren metabolischen Stabilität wird hier häufig das zyklische Derivat eingesetzt.

Für die radioaktiven Markierungen der DOTA-konjugierten Peptide wird ein sehr großer Überschuss (~1000fach) des Markierungsvorläufers im Vergleich zur Stoffmenge des Radionuklids verwendet. Unter Wärmezufuhr werden die stabilen Chelat-Metallkomplexe gebildet. Bei der anschließenden Aufreinigung müssen sowohl das nicht komplexierte Radiometall, als auch der nicht verwendete Markierungsvorläufer von Radiopharmakon abgetrennt werden, um eine möglichst hohe spezifische Aktivität zu erreichen. Diese ist

notwendig, da die nicht umgesetzten Markierungsvorläufer *in vivo* mit dem Radiopharmakon um die Bindungsstellen konkurrieren.

Die Aufreinigung wird bisher fast ausschließlich per HPLC durchgeführt. Allerdings sind die Retentionszeiten von Markierungsvorläufer und markiertem Produkt oftmals sehr ähnlich, was eine Abtrennung des Markierungsvorläufers extrem schwierig oder sogar unmöglich macht. Eine alternative Aufreinigungsmethode könnten die kommerziell erhältlichen Festphasenextraktionskartuschen sein. Diese hätten neben der Aufreinigung noch den Vorteil einer großen Zeit- und Kostenersparnis.

Aufgabe der Erfindung ist die Schaffung einer Festphasenextraktionskartuschen-basierenden Aufreinigung für DOTA-konjugierte Radiopharmaka.

Dabei soll das Radiopharmakon zum einen von nicht-umgesetztem Radiometall und zum anderen vom eingesetzten Überschuss an Markierungsvorläufer abgetrennt werden, um so eine möglichst hohe spezifische Aktivität zu gewährleisten.

Diese Aufgabe wird in der Weise gelöst, dass in einer kombinierten Kationenaustauscher-Anionenaustauscher-Methode mit den jeweils geeigneten Eluenten die unterschiedlichen Ladungen von Radiometall, Markierungsvorläufer und DOTA-Radiopharmakon ausgenutzt werden.

Das Radiometall ist hierbei ein für die SPECT, PET oder Endoradiotherapie geeignetes Nuklid.

Der Markierungsvorläufer besteht aus einem DOTA-Targeting Vektor-Konjugat, das wahlweise auch einen Spacer beinhalten kann.

Das DOTA ist im Markierungsvorläufer aufgrund der drei freien Carboxylgruppen dreifach negativ geladen. Das Radiometall ist ein Kation. Durch die Markierungsreaktion wird die Ladung des DOTA durch die Koordination des Radiometalls verändert. Im Fall des DOTATOC

als Markierungsvorläufer entsteht mit drei wertigen Radiometallen eine neutrale Verbindung. Dadurch erscheint eine ladungsbasierende Aufreinigung möglich ist.

Die Erfindung eignet sich für die Aufreinigung sowohl verschiedener DOTA-konjugierter Targetingvektoren, als auch verschiedener Radiometalle.

In Ausgestaltung der Erfindung wird DOTA als Chelator verwendet, die Methode kann aber auch auf andere bifunktionelle Chelatoren (BFC) angewendet werden. Als bifunktionell wird ein Chelator beschrieben, wenn er auf der einen Seite in der Lage ist das Radiometall stabil zu komplexieren und auf der anderen Seite die Möglichkeit bietet eine Spacer-Targeting Vektor Kombination anzukoppeln. BFC können sowohl makrozyklisch als auch offenkettig sein. Bekannte Beispiele sind DOTA, Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA), 1,4,7 Triessigsäure-1,4,7-Triazacyclonon (NOTA) sowie all ihre Derivate. Es sind aber prinzipiell alle Verbindungen geeignet, die die oben genannten Voraussetzungen eines BFC erfüllen.

Der Aufbau des Radiopharmakons kann soweit beliebig verändert werden, solange der für die Aufreinigung notwendige Unterschied in der Ladung gewährleistet ist.

Die Erfindung wird dazu eingesetzt, Radiopharmaka mit möglichst hoher spezifischer Aktivität zu erhalten.

Die Erfindung eignet sich zur Aufreinigung von Verbindungen für die molekulare Bildgebung mit PET/SPECT oder anderen Bildgebungsverfahren und kann in der nuklearmedizinischen Diagnostik und/oder Therapie eingesetzt werden.

Nachfolgend werden die Bestandteile der Radiopharmaka näher beschrieben, für die diese Erfindung geeignet ist.

Das Radiopharmakon besteht aus einem Markierungsvorläufer, der wiederum aus einem bifunktionellen Chelator und einem oder mehreren Targeting Vektoren besteht und einem

Radiometall. Weiterhin kann der Markierungsvorläufer zwischen Chelator und Targeting Vektor(en) einen Spacer enthalten.

a) Chelator

Als Chelator ist vor allem DOTA geeignet. Aber auch DOTA-Derivate und andere makrozyklische und offenkettige Chelatoren sind potentielle Kandidaten für die Aufreinigung mit der hier beschriebenen Methode. Im Fall der kovalenten Bindung des DOTA an TV wird der Chelator zu einem „bifunktionellen Chelator“.

b) Targeting Vektor

Als Targeting Vektoren sind primär Peptide geeignet. Eine Anwendung ist prinzipiell aber für nahezu alle biologischen Targets mit jeweils charakteristischen TV denkbar.

c) Radiometall

Es sind prinzipiell alle Radiometalle geeignet, die in der PET, SPECT oder Endoradiotherapie eingesetzt werden und eine positive Ladung besitzen.

d) Spacer

Der Spacer ist für das chemische Design des Markierungsvorläufers wichtig, spielt für die Aufreinigung aber keine Rolle.

Die Erfindung nutzt die unterschiedlichen Ladungen der verschiedenen Bestandteile des Radiopharmakons am bifunktionellen Chelator aus, um MV und markiertes Rdiopharmakon mittels Festphasenextraktionskartuschen voneinander zu separieren. Dazu werden sowohl

eine Kationenaustauscher-Kartusche als auch eine Anionenaustauscher-Kartusche verwendet.

Die saure Markierungslösung wird zunächst über eine Kationenaustauscher-Kartusche gegeben und alle Bestandteile darauf fixiert. Anschließend wird die Kartusche mit Wasser gewaschen und dann eluiert. Während das kationische Radiometall zurückgehalten wird, werden das Radiopharmakon, sowie der Markierungsvorläufer eluiert und anschließend über eine Anionenaustauscher-Kartusche gegeben. Das im Fall des DOTATOC bei diesem schwach basischen pH-Wert dreifach negativ geladene DOTA des Markierungsvorläufers wird hier adsorbiert, während das mit beispielsweise dreiwertigen Radiometallen wie ^{68}Ga , ^{90}Y oder ^{177}Lu markierte Produkt die Kartusche passiert. Das Produkt kann nun auf einer weiteren Kartusche, z. B. einer C18-Kartusche adsorbiert und in der gewünschten Form formuliert werden.

Die Vorteile der hier beschriebenen Methode sind, neben der sehr guten Aufreinigung, die sehr schonenden Bedingungen, die niedrigen Kosten und die kurze Zeitdauer, die für die Aufreinigung benötigt wird.

Die Erfindung wird im Folgenden anhand einer Zeichnung näher erläutert.

Dabei zeigen die blauen Rechtecke Spritzen, in denen die in der Skizze angegebenen Lösungen enthalten sind. Die Dreiecke beschreiben die verschiedenen Kartuschen und die Pfeile die Elutionen in der Reihenfolge der angegebenen Nummern. Die hellgrauen Quadrate beschreiben Abfallgefäße und im letzten Elutionsschritt das Produktgefäß.

Während des ersten Elutionsschritts wird die Markierungslösung, bestehend aus dem Markierungsvorläufer und dem Radiometall und gelöst in HCl-saurem Wasser, über eine Kationenaustauscherkartusche gegeben. Nicht-markiertes ^{68}Ga , Markierungsvorläufer und Produkt werden auf der Kartusche adsorbiert, der Rest gelangt in den Abfall. Anschließend werden mittels PBS-Puffer pH 7,4 von der Kartusche eluiert, nicht-markiertes ^{68}Ga verbleibt auf der Kartusche. Markierungsvorläufer und Produkt werden über eine Anionenaustauscherkartusche gegeben, der Markierungsvorläufer verbleibt auf der Kartusche, während das Produkt sie passiert. Das Produkt wird dann auf einer angekoppelten C18-Kartusche fixiert. Mittels Ethanol kann das reine Produkt nun in einem

sehr kleinen Volumen von der C18 Kartusche eluiert werden und steht für die weitere Anwendung zur Verfügung.

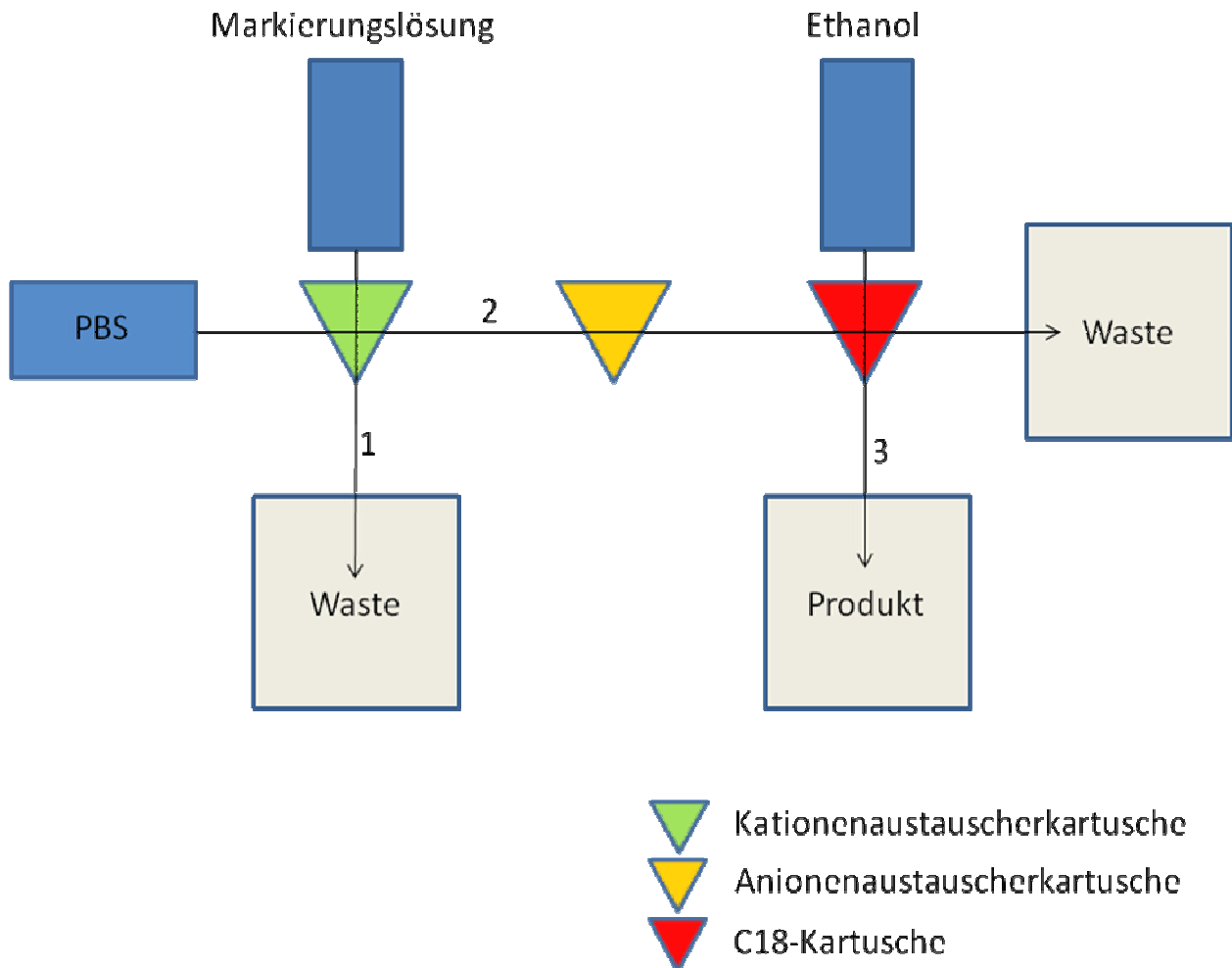


Abbildung 3: Schematischer Aufbau der Aufreinigungsmethode

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

beschreibt die Aufreinigung von [^{68}Ga]Ga-DOTATOC über eine Merck Lichrolut[®] SCX Kationenaustauscherkartusche und eine Alltech[®] –OH Anionenaustauscher-kartusche mit anschließender Adsorbtion auf einer Waters Sep-pak[®] C18plus Kartusche.

Das ^{68}Ga -Markierung wird nach einer literaturbekannten Vorschrift durchgeführt. Dazu werden 20 μg Markierungsvorläufer in 5 mL millipore Wasser mit $\sim 200\text{MBq } ^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -

Radionuklidgenerator produziertem ^{68}Ga bei 100 °C für 10 Minuten zusammengegeben. Dabei werden Markierungsausbeuten von 97(+/-2)% (bestimmt per Radio-DC) erzielt.

Die Adsorption von ^{68}Ga auf der SCX-Kartusche erfolgt mit 98+/-2% des ^{68}Ga . Anschließend wird mit Millipore Wasser gewaschen. Mit PBS-Puffer werden nur Spuren an ^{68}Ga eluiert. Selbst mit auf 90°C erwärmten 10-fach PBS-Puffer können nur 4% des adsorbierten ^{68}Ga von der Kartusche eluiert werden. Mittels dieser Methode kann also eine Aufreinigung um mindestens den Faktor 25 gewährleistet werden.

Um die Adsorption des Markierungsvorläufers auf der Anionenaustauscherkartusche zu testen wurden 200 µg DOTATOC in 1 mL PBS-Puffer gelöst und, nachdem ein HPLC Spektrum aufgenommen wurde, über die Anionenaustauscherkartusche gegeben. Hier wird der Markierungsvorläufer bis zur Nachweisgrenze mittels HPLC aus der Pufferlösung entfernt. Da 10 µg/mL in der HPLC nachweisbar sind, liegt auch hier eine Aufreinigung um mindestens den Faktor 20 vor.

Anschließend wurde das Verhalten des markierten Produkts auf den Kartuschen untersucht. Das Produkt wird quantitativ auf der Kationenaustauscherkartusche adsorbiert. Mittels 3 mL auf 75°C vortemperiertem PBS-Puffer werden 91% der Aktivität von dort eluiert. Nach Abkühlung in einem Eisbad wird das in PBS-Puffer gelöste Produkt über die Anionenaustauscher-Kartusche gegeben. Hierbei passieren 94% des markierten Produkts die Kartusche und werden quantitativ auf einer C18-Kartusche fixiert.

Nach diesen Vorversuchen wurde die komplette Methode mit 250 µg Markierungsvorläufer durchgeführt.

Mittels indirekter Beweisführung konnte auch hier die Aufreinigung nachgewiesen werden. Das markierte Produkt wurde mit Ethanol von der C18-Kartusche eluiert und das Lösemittel anschließend im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde in 5 mL Millipore Wasser aufgenommen und das Reaktionsgefäß anschließend verschlossen und für 48 Stunden im Eisfach gelagert. Außerdem wurde eine Reaktion mit 10 µg Markierungsvorläufer durchgeführt. Auch hier wurde das Lösemittel nach der Reaktion entfernt, das Produkt in 5 mL Millipore Wasser aufgenommen und ebenfalls für 48 Stunden eingefroren.

Nach Ablauf dieser Zeitspanne wurden mit beiden Lösungen erneut Markierungsreaktionen durchgeführt. Während es bei dem nicht aufgereinigten Produkt möglich war mit ^{68}Ga zu markieren, wurde bei dem aufgereinigten Produkt keine Ausbeute mehr erhalten.

So wird auch der Gehalt an nicht-umgesetzte Markierungsvorläufer durch die Aufreinigungsmethode um mehr als den Faktor 25 verringert.

Patentansprüche:

1. Methode zur Aufreinigung von Chelator-konjugierten Radiopharmaka, mittels der Kombination eines Kationen- sowie eines Anionenaustauschers.
2. Methode nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Kationenaustauscher ein Austauscherharz oder eine Festphasenextraktionskartusche ist.
3. Methode nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Anionen-Austauscher ein Austauscherharz oder eine Festphasenextraktionskartusche ist.
4. Methode nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Radiopharmakon aus einem Markierungsvorläufer, der aus einem Chelator und einem oder mehreren Targeting Vektoren aufgebaut ist und Spacer beinhalten kann, und einem Radionuklid besteht.
5. Methode nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass ein makrozyklischer oder offenkettiger Chelator verwendet wird, der in der Lage ist, das Radionuklid stabil zu komplexieren.
6. Methode nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Radionuklid für die Positronen-Emissions-Tomographie, die Single-Photon-Emission-Computed-Tomographie oder die Endoradiotherapie geeignet ist.

7. Methode nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Radionuklid ein 2- bis 5-wertiges Radiometall ist.

8. Methode nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Targeting Vektor ein Peptid, Zucker, Aminosäure, Fettsäure, Bisphosphonat, Antikörper, Rezeptorligand, Transporterligand, Polymer, Nanopartikel, DNA-Baustein, Folsäure oder ein anderes biologisch aktives Molekül ist.

9. Methode nach Anspruch 1 - 8, dadurch gekennzeichnet, dass das markierte Produkt sowohl vom Markierungsvorläufer als auch vom nicht-komplexierten Radionuklid abgetrennt wird.

2.8 „Investigation of the uptake mechanism of O-(2-¹⁸F)fluoroethyl)-L-tyrosine (FET)“

Investigation of the uptake mechanism of O-(2-[¹⁸F]fluoroethyl)-L-tyrosine (FET)

B. Sandhöfer¹, C. Burchardt¹, A. Habermeier², E. I. Closs², F. Rösch¹

¹ *Institute of nuclear chemistry, Johannes-Gutenberg University, 55128 Mainz, Germany*

² *Institute of pharmacology, Johannes-Gutenberg University 55101 Mainz, Germany*

Abstract

The diagnosis, staging and therapy control of malignant glioblastoma with positron-emission tomography (PET), a quantitative modality of molecular imaging, utilizing O-(2-[¹⁸F]fluoroethyl)-L-tyrosine (FET) has become general clinical practise. It is taking advantage of the better spatial resolution compared to Single-Photon-Emission-Computed-Tomography (SPECT) radiopharmaceuticals and the better availability compared to ¹¹C-labeled amino acids like [Methyl-¹¹C]methionine. Although FET is routinely used in a clinical context the uptake mechanism is still not fully determined. In the present study six amino acid transporters (LAT1, LAT2, γ⁺LAT1, γ⁺LAT2, b⁰⁺ und B⁰⁺) were specifically expressed on oocytes of *Xenopus laevis* and their specific participation on the uptake of FET was investigated. The binding to the amino acid transporters was checked in a challenge experiment with [³H]leucine. In the following study the active transport was analyzed in counter-transport experiments. It was found that most of the examined amino acid transporters contribute to the uptake of FET.

Introduction

Positron-emission tomography (PET), especially with 2-[¹⁸F]fluorodeoxyglucose (FDG), is a widely used tool for the imaging of cancer [1,2]. But it was found that radiolabeled amino acids are often better suited for the diagnosis of malignant glioblastoma [3]. Several amino acid tracers for PET and SPECT (Single-Photon-Emission-Computed-Tomography) have been introduced in the past. The most common SPECT-tracer is [¹²³I]iodo- α -methyl-L-tyrosine (IMT) [4]. This tracer is well investigated, but has the drawback of the lower spatial resolution of SPECT compared to PET. The first approaches for PET utilized methionine, isotopically labeled with ¹¹C to form L-[Methyl-¹¹C]methionine (MET) [5]. Due to the short half-life of ¹¹C the use of MET was reserved for locations with on-site cyclotrons. To overcome the availability problems ¹⁸F-labeled amino acids were prepared. With 109 minutes half-life it is possible to distribute ¹⁸F-labeled tracers from a cyclotron to other places. The first synthesized ¹⁸F-labeled amino acid was 2-[¹⁸F]fluoro-L-tyrosine [6]. But the compound had the drawback of a rather ineffective radiochemistry. This problem was solved with establishing O-(2-[¹⁸F]fluoroethyl)-L-tyrosine (FET) [7]. FET can be produced in high yields under nucleophilic fluorination conditions [8]. The tracer is no longer incorporated into proteins, but it was proven in a comparative study with MET that the tracer is well suited for amino acid transport related molecular imaging [9]. In human studies FET showed high uptake in cerebral gliomas and squamous cell carcinomas [10]. Furthermore the tracer showed a better selectivity against inflammatory tissue compared to FDG [11]. Altogether FET has become a standard application for the diagnosis of brain tumors.

Although FET is routinely used in the clinics the uptake mechanism is still not fully clarified. Systematic studies with F98-glioblastoma cells led to the assumption of a mixed uptake via LAT2 and B^{0,+} [10]. An indirect proof of the uptake via LAT2 was taken utilizing expressed amino acid transporters on oocytes of the African clawed frog (*Xenopus laevis*) [12]. In this study was shown that the uptake is not mediated by LAT1. This is in contrast to IMT which is taken up via LAT1 and natural tyrosine which is taken up via LAT1 and LAT2. Based on this result it was proposed that the uptake is mainly mediated by LAT2. The transport by other amino acid transporters was not studied. A better knowledge of the uptake mechanism is crucial to improve the understanding of the biological processes.

Results and discussion

In the presented work we used oocytes-model to specifically express six amino transporters. Besides LAT1 and LAT2 the amino acid transporters γ^+ LAT1, γ^+ LAT2, b^{0+} , B^{0+} were expressed on the oocytes and tested towards their FET uptake [13]. For all studies [^{19}F]FET was used. First a negative control utilizing oocytes only expressing hCAT was performed. The results (Fig. 1) showed that at a FET-concentration of 3 mmol non-specific binding of FET was dramatically increasing. So in all following studies the concentration 0, 0.1, 0.3 and 1 mmol were used.

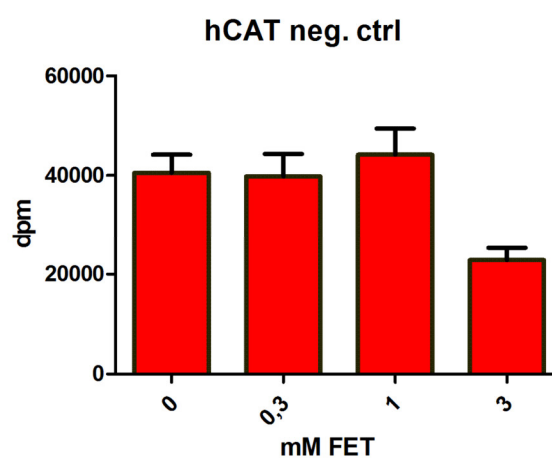


Figure 1: Determination of the reasonable range of FET-concentrations showing non-specific binding at a FET-concentration of 3 mmol

The binding of FET to the amino acid transporters was examined in competition experiments with [^3H]leucine. The amino acid transporter expressing oocytes were incubated with 50 μM [^3H]leucine and increasing concentration of [^{19}F]FET. The inhibition of the [^3H]leucine uptake due to blocking of the amino acid transporters by FET was measured. A concentration depending increase of the inhibition was clearly demonstrated with the amino acid transporters LAT1, LAT2, b^{0+} and γ^+ LAT2. In accordance to the assumption that the main uptake of FET is mediated by LAT2 this amino acid transported showed the highest inhibition. With a concentration of 0.3 mmol two thirds of the [^3H]leucine uptake could be blocked. γ^+ LAT1 showed no inhibition at all concentrations. Based on this knowledge it can be stated that γ^+ LAT1 is not participating on the uptake of FET. In case of B^{0+} the results

were not distinct, but at increased concentrations (2 mmol) an inhibition was found. The results of the complete studies are summarized in figure 2.

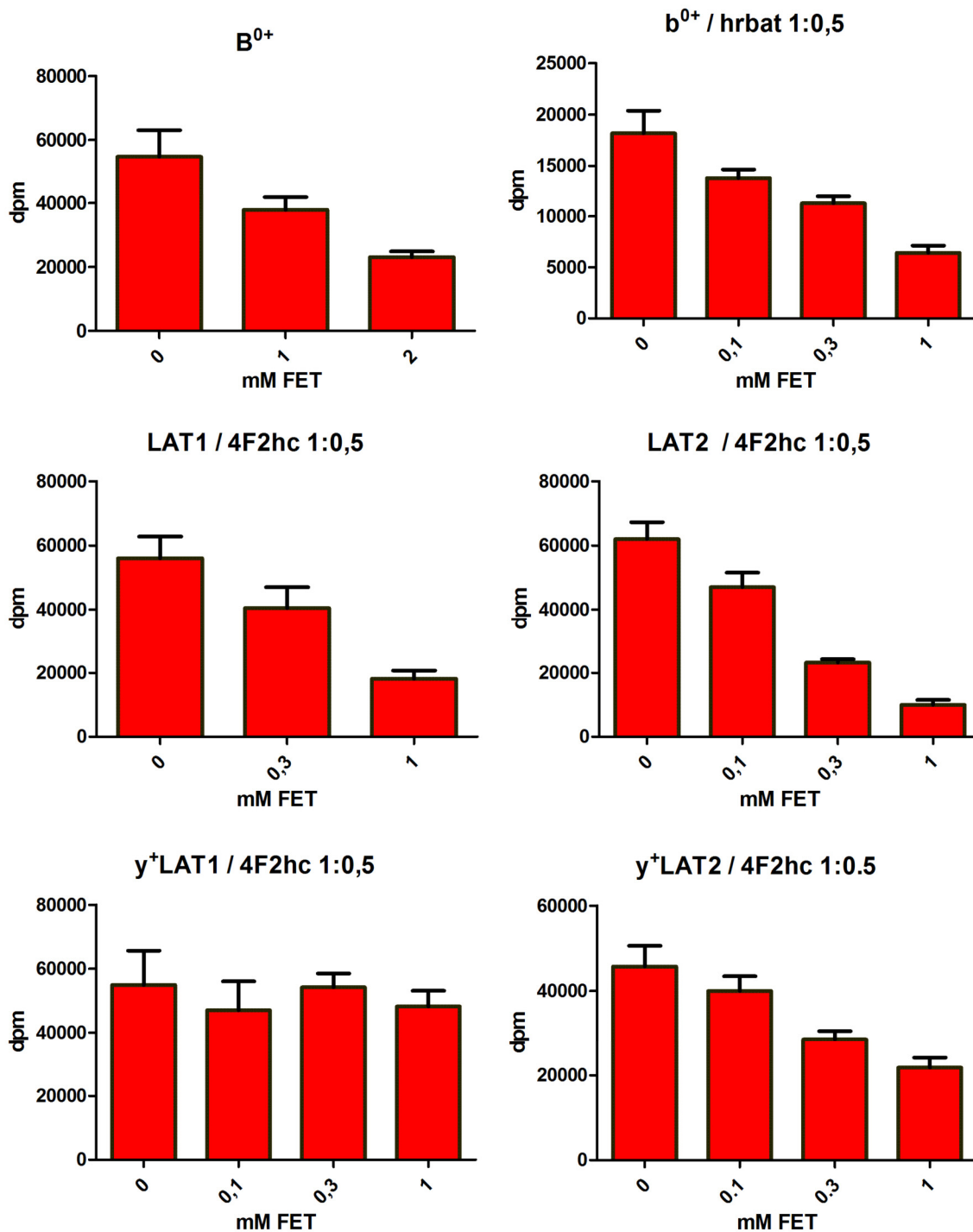


Figure 2: Inhibition of the uptake of 50 μ mol $[3H]$ leucine with increasing concentrations of FET towards the amino acid transporters LAT1, LAT2, γ^+LAT1 , γ^+LAT2 , b^{0+} , B^{0+} . Errors are 1 standard deviation.

To get a better comparison of the results of the competition experiments the values of the remaining [^3H]leucine uptake (in %) were calculated. Furthermore the uptake values were transferred to the amount of [^3H]leucine which was taken up. The values are given as nmol per oocyte and hour. It is shown that FET has the highest inhibition values for LAT2. For B^{0,+} two tables are presented. This is because the first results were not distinct, so higher concentrations of FET were tested.

Table 1-7: Remaining uptake of [^3H]leucine at increasing concentrations of FET and uptake of [^3H]leucine given as amount per hour.

LAT1 / 4F2hc 1:0,5				
Conc. FET / mM	Value / %	SEM / %	nm pro oocyte and hour / nm	SEM / nm
0	100.0	12.2	0.50	0.061
0.3	72.3	11.6	0.36	0.058
1	23.3	4.7	0.16	0.024

LAT2 / 4F2hc 1:0,5				
Conc. FET / mM	Value / %	SEM / %	nm pro oocyte and hour / nm	SEM / nm
0	100.0	8.5	0.56	0.047
0.1	75.8	7.3	0.42	0.041
0.3	37.4	1.6	0.21	0.009
1	16.1	2.5	0.09	0.014

y+LAT1 / 4F2hc 1:0,5				
Conc. FET / mM	Value / %	SEM / %	nm pro oocyte and hour / nm	SEM / nm
0	100.0	19.5	0.50	0.097
0.1	85.5	16.6	0.42	0.082
0.3	98.6	8.0	0.49	0.040
1	87.8	9.0	0.43	0.045

y+LAT2 / 4F2hc 1:0,5

Conc. FET / mM	Value / %	SEM / %	nm pro oocyte and hour / nm	SEM / nm
0	100.0	10.6	0.41	0.044
0.1	87.4	7.6	0.36	0.031
0.3	62.5	4.2	0.26	0.017
1	47.6	5.1	0.20	0.021

b⁰⁺ / hrbat 1:0,5

Conc. FET / mM	Value / %	SEM / %	nm pro oocyte and hour / nm	SEM / nm
0	100.0	12.1	0.16	0.020
0.1	76.1	4.6	0.12	0.007
0.3	62.1	4.3	0.10	0.007
1	35.4	3.9	0.06	0.006

B⁰⁺

Conc. FET / mM	Value / %	SEM / %	nm pro oocyte and hour / nm	SEM / nm
0	100.0	13.5	0.62	0.084
0.1	87.5	9.5	0.55	0.059
0.3	91.2	5.4	0.57	0.034
1	53.2	6.7	0.33	0.041

B⁰⁺

Conc. FET / mM	Value / %	SEM / %	nm pro oocyte and hour / nm	SEM / nm
0	100.0	15.3	0.50	0.075
1	69.2	7.2	0.34	0.036
2	42.1	3.3	0.21	0.016

The five amino acid transporters showing an inhibition in the competition experiments were further investigated towards their ability to transport FET into the oocytes. These experiments are based on the fact that most of the evaluated amino acid transporters are counter transporters. That that each time a amino acid is transported into the cell another amino acid is carried out. This principle is exploit by injecting 30 nmol [^3H]leucine directly into the oocytes prior to the experiment. Then the oocytes were incubated with 1 mmol FET and after 30 minutes the activity outside the oocytes were measured. As negative control $\text{B}^{0,+}$ was utilized. $\text{B}^{0,+}$ is a sodium dependent transporter. (Fig. 3).

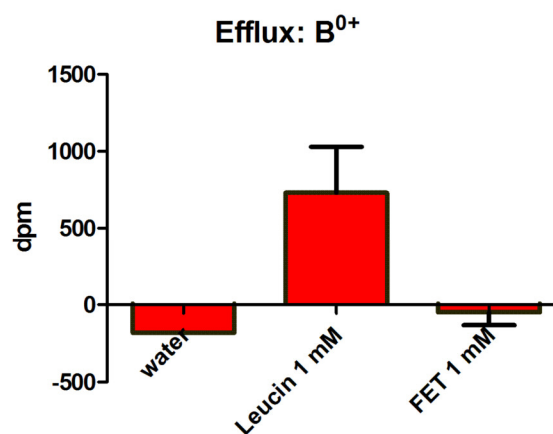


Figure 3: Results of the efflux experiment with $\text{B}^{0,+}$ expressed on oocytes preloaded with 30 nmol [^3H]leucine

As to be expected, the efflux study with $\text{B}^{0,+}$ showed no significant activity outside the cell. That could be explained with the fact that $\text{B}^{0,+}$ is a Na^+ -dependent concentrating transporter. So possibly the transport out of the cell is minimized by the concentrating nature of $\text{B}^{0,+}$. The measurement with leucine outside the cell showing efflux of the activity could be explained with a higher affinity to leucine or a little leakage. A further examination will give assurance. The other four amino acid transporters, namely LAT1, LAT2, $\text{b}^{0,+}$ and $\gamma^+\text{LAT2}$ were tested under the same conditions. In these experiments all four candidates showed counter transport of [^3H]leucine. This is surprising because FET showed only poor counter transport with LAT1 in an analogue experiment with [^3H]phenylalanine [12]. It is not determined yet, if the amino acid used for the counter transport has any influence on the transport behavior.

The efflux of [^3H]leucine via $\gamma^+\text{LAT2}$ is recognizably lower compared to the other transporters. The complete results of the efflux studies are shown in figure 4.

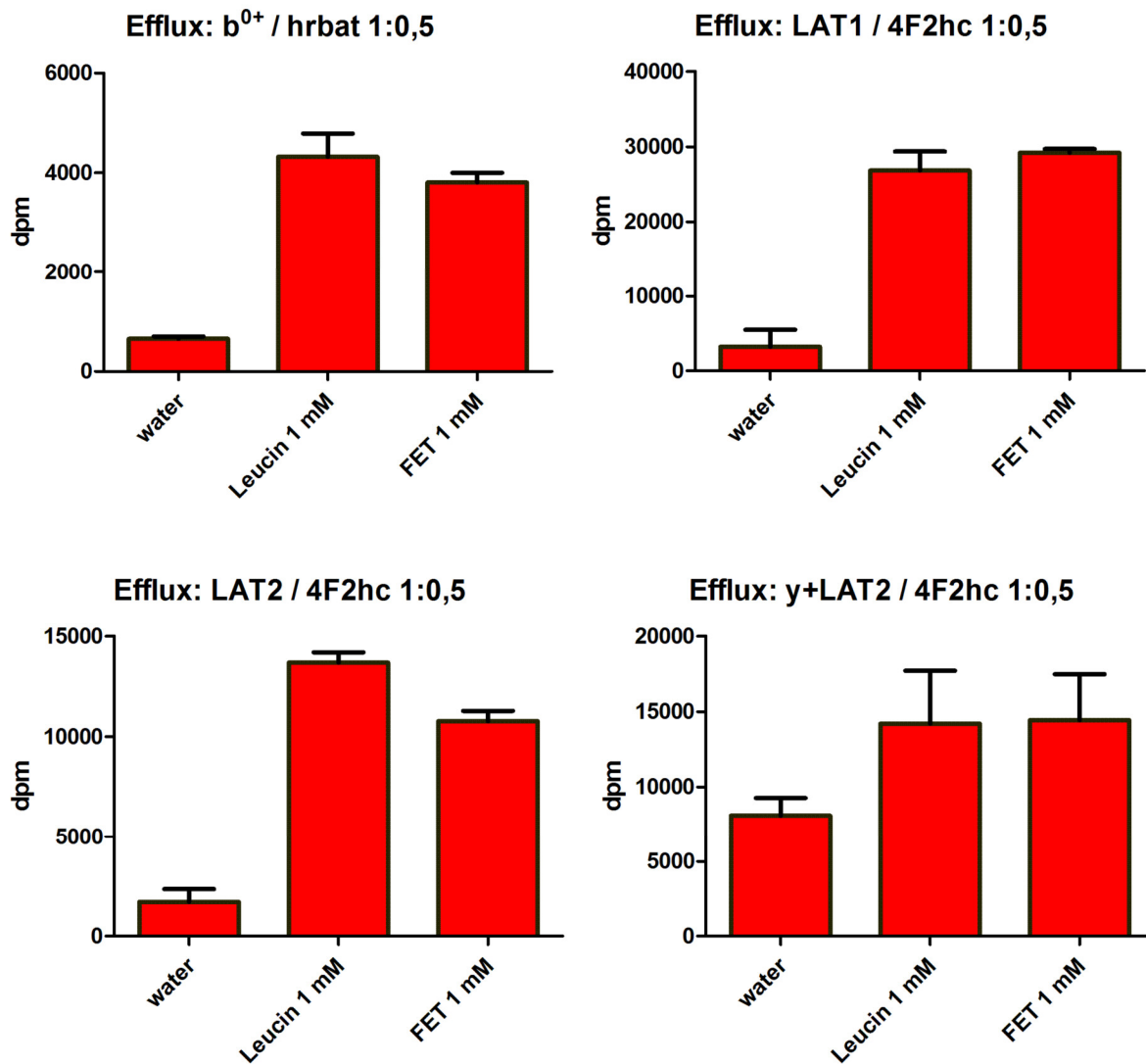


Figure 4: Efflux studies of pre-injected [^3H]leucine by counter transport with FET in LAT1, LAT2, b^{0+} and $\gamma^+\text{LAT2}$ expressed on oocytes. Errors are 1 standard deviation.

Summary and conclusion

Six amino acid transporters were tested towards their capability of transporting FET. So LAT1, LAT2, $\gamma^+\text{LAT1}$, $\gamma^+\text{LAT2}$, b^{0+} and B^{0+} were selectively expressed on oocytes of the *Xenopus laevis*. The binding of FET was checked in a competition experiment with [^3H]leucine, inhibiting the uptake of [^3H]leucine with increasing concentrations (0, 0.1, 0.3, 1 mmol) of [^{19}F]FET. These concentrations were chosen after non-specific binding of FET was

occurring at a concentration of 3 mmol. It was shown that FET binds to all tested amino acid transporters except γ^+ LAT1. The highest inhibition of the [3 H]leucine uptake was found for LAT2. In efflux experiments was examined if FET is transported into the oocytes. The oocytes expressing LAT1, LAT2, $b^{0,+}$ and γ^+ LAT2, respectively, were preloaded with 30 nmol [3 H]leucine and then incubated with 1 mmol FET. These experiments clearly demonstrated transport via all four examined amino acid transporters.

Altogether the uptake mechanism of FET is a lot more complex than assumed. It is not only mediated by LAT2. LAT1, $b^{0,+}$ and γ^+ LAT2 seem to participate in the uptake, too. These findings have to be considered for future studies with FET. Hence the expression of these amino acid transporters on various examined tumors and their contribution to the FET-uptake should be determined, to finally validate the results *in vivo*.

Materials and methods

Amino acids

The [19 F]FET used in all studies was purchased from ABX Radeberg, Germany.

Methods

The presented approach to examine the uptake mechanism of O-(2- [18 F]fluoroethyl)-L-tyrosine (FET) was performed with oocytes of the African clawed frog (*Xenopus laevis*). As described elsewhere [12,14], we used the *Xenopus laevis* oocytes as an expression system and as an examination object for influx and efflux studies. 3 H-Leucin served as detectable competitor to non radio-radioactive FET ([19 F]FET), differing from reference [14] for example, utilizing radioactive substance under investigation.

Injection of the cRNA

The RNA was prepared as described earlier [15]. Similar to [16,17], the cRNA was injected into the *Xenopus laevis* oocytes using fine-tipped glass micropipettes. The injection volume was about 40 nL being calculated over the drop size and adjusted with the inner scale-tool of the microscope and the micromanipulator. The concentration was 1 µg polynucleotide per µL of the injection solution. So the overall amount of injected cRNA was 40 ng of the transporters LAT1, LAT2, γ-LAT1, γ-LAT2, b⁰⁺, B⁰⁺. The light chain 4F2hc/CD89 was added in a ratio of 0.5 to the transporter (LAT1, LAT2, γ-LAT1, γ-LAT2), for b⁰⁺ it was the cRNA for the light chain hrbat. As the transport studies with amino acids showed a concentration dependency of control values because of natural amino acid transporters of oocytes, six to eight oocytes were injected with sterile water for baseline calculations. Within the scope of this experiment, water-injected and non-injected oocytes did not show any difference in measured values. Therefore tests could be done with non-injected oocytes as control. But in the tests described below we always used water-injected oocytes as control.

The injection was proceeded in Ca²⁺-containing solution (Bx) at room temperature. Afterwards the oocytes were left for two days at 18 °C in a culture medium (half concentrated Leibovitz with hepes and gentamicin) for expression.

Competition experiment

First of all the oocytes were washed three times with Na⁺-uptake buffer to remove culture medium residues. Then they were transferred into 2 mL vials in groups of six to eight *Xenopus laevis* oocytes (to form one measurement value). These vials contained 200 µL of an ice-cooled solution of [³H]-Leucin (50 µM) including varied concentration of [¹⁹F]FET (0.1 – 3 mM) in a Na-containing uptake buffer. After incubation at 20 °C in a waterbath for 15 min, the grouped oocytes were abstracted from the radioactive solution and washed five times in the used buffer (Bx). For being measured individually with the gamma counter, the oocytes were separated into tubes, treated with 2% SDS-solution for more than 20 min in a shaker and then 2 mL of the liquid scintillator were added. After Initial tests with 0, 1, 2 and

3 mM FET provided the assumption that at 3 mM FET the ^3H -Leucin intake was strongly decreased because of non-specific effects, next studies were performed with series of 0, 0.1, 0.3 and 1 mM [^{19}F]FET. At the same time, the water injected *Xenopus Laevis* oocytes were treated identical to form the control values.

Efflux study

After expression for two days at 18 °C, the *Xenopus Laevis* oocytes were washed two times with the Na^+ -containing solution. They were left about 6 hours for equilibration at 18 °C. About 30 nL of 10 mM carrier-added ^3H -Leucin solution were injected into the oocytes in the same way. In groups of three individuals, they were transferred in a 2 mL vial with 200 μL of a differing environmental solution (0 | 1 mM Leucin | 1 mM [^{19}F]FET) under Na^+ -containing conditions. After Incubation for 30 min at 20 °C, 150 μL of the excess volume were extracted, combined with 2 mL liquid scintillator, shaken and measured with the counter. The same procedure was accomplished simultaneously three times to get an average value with a quantity of $n = 3$. Three values seemed to be adequate for a qualitative conclusion. The treatment and the measurement of the control probes followed the same procedure.

References

- [1] M. E. Phelps, *Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes*, Proc. Nat. Acad. Sci. 97, **2000**, 9226.
- [2] M. Allen-Auerbach, W. A. Weber, *Measuring Response with FDG-PET: Methodological Aspects*, Oncologist 14, **2009**, 369.
- [3] P. L. Jager, W. Vaalburg, J. Pruijm, E. G. de Vries, K. J. Langen, D. A. Piers, *Radiolabeled amino acids: basic aspects and clinical applications in oncology*, J. Nucl. Med. 42, **2001**, 432.
- [4] K. J. Langen, D. Pauleit, H. H. Coenen, [^{123}I]Iodo- α -Methyl-L-tyrosine: uptake mechanisms and clinical applications, Nucl. Med. Biol. 29, **2002**, 625.
- [5] B. Langström, G. Antoni, P. Gullberg, C. Halldin, P. Malmberg, K. Nagren, A. Rimland, H. Svärd, *Synthesis of L- and D-[Methyl- ^{11}C]Methionine*, J. Nuc. Med. 28, **1987**, 1037.

- [6] H. H. Coenen, P. Kling, G. Stöcklin, *Cerebral metabolism of L-[2-¹⁸F]Fluorotyrosin, a new PET tracer for protein synthesis*, J. Nucl. Med. 30, **1989**, 1367.
- [7] H. J. Wester, M. Herz, W. Weber, P. Heiss, R. Senekowitsch-Schmidtke, M. Schwaiger, G. Stöcklin, *Synthesis and Radiopharmakology of O-(2-[¹⁸F]fluoroethyl)-L-Tyrosine for Tumor Imaging*, J. Nucl. Med. 40, **1999**, 205.
- [8] K. Hamacher, H. H. Coenen, *Efficient routine production of the ¹⁸F-labelled amino acid O-(2-[¹⁸F]fluoroethyl)-L-tyrosine*, Appl. Rad. Isot. 57, **2002**, 853.
- [9] W. Weber, H. J. Wester, A. L. Grosu, M. Herz, B. Dzewas, H. J. Feldmann, M. Molls, G. Stöcklin, M. Schwaiger, *O-(2-[¹⁸F]Fluoroethyl)-L-tyrosine and L-[methyl-¹¹C]methionine uptake in brain tumours: initial results of a comparative study*, Eur. J. Nucl. Med. 27, **2000**, 542.
- [10] a) K. J. Langen, K. Hamacher, M. Weckesser, F. Floeth, G. Stoffels, D. Bauer, H. H. Coenen, D. Pauleit, *O-(2-[¹⁸F]fluoroethyl)-L-tyrosine: uptake mechanisms and clinical applications*, Nucl. Med. Biol. 33, **2006**, 287; b) D. Pauleit, G. Stoffels, W. Schaden, K. Hamacher, D. Bauer, L. Tellmann, H. Herzog, S. Bröer, H. H. Coenen, K. J. Langen, *PET with O-(2-[¹⁸F]fluoroethyl)-L-tyrosine (FET) in peripheral tumors: first clinical Results*, J. Nucl. Med. 46, **2005**, 411.
- [11] A. H. Kaim, B. Weber, M. O. Kurrer, G. Westera, A. Schweitzer, J. Gottschalk, G. K. Von Schultheiss, A. Buck, *[¹⁸F]FDG and [¹⁸F]FET uptake in experimental soft tissue infection*, Eur. J. Nucl. Med. Mol. I. 29, **2002**, 648.
- [12] T. Lahoutte, V. Caveliers, S. M. R. Camargo, R. Franca, T. Ramadan, E. Veljkovic, J. Mertens, A. Bossuyt, F. Verrey, *SPECT and PET amino acid tracer influx via System L (h4F2hc-hLat1) and its transstimulation*, J. Nucl. Med. 45, **2004**, 1591.
- [13] S. Bröer, *Amino Acid Transport Across Mamalian Intestinal and Renal Epithelia*, Physiol Rev 88, **2008**, 249.
- [14] N. Shikano, Y. Kanai, K. Kawai, H. Endou, *Characterization of 3-[125I]iodo-alpha-methyl-L-tyrosine transport via human L-type amino acid transporter 1*, Nucl. Med. Biol. 30, **2003**, 31.

- [15] E. I. Closs, P. Gräf, A. Habermeier, J. M. Cunningham, U. Förstermann, *Human cationic amino acid transporters hCAT-1, hCAT-2A, and hCAT-2B: three related carriers with distinct transport properties*, *Biochem.* 36, **1997**, 6462.
- [16] Y. Kanai, Y. Fukasawa, S. H. Cha, H. Segawa, A. Chairoungdua, D. K. Kim, H. Matsuo, Y. Y. Kim, K. Miyamoto, E. Takeda, H. Endou, *Transport properties of a system γ +L neutral and basic amino acid transporter. Insights into the mechanisms of substrate recognition*, *J. Biol. Chem.* 275, **2000**, 20787.
- [17] Y. Fukasawa, H. Segawa, J. Y. Kim, A. Chairoungdua, D. K. Kim, H. Matsuo, S. H. Cha, H. Endou, Y. Kanai, *Identification and characterization of a Na(+)-independent neutral amino acid transporter that associates with the 4F2 heavy chain and exhibits substrate selectivity for small neutral D- and L-amino acids*, *J. Biol. Chem.* 275, **2000**, 9690.

3 Zusammenfassung und Ausblick

3.1 Divalente Chelatoren

^{68}Ga -markierte PET-Radiopharmaka stellen eines der interessantesten und am schnellsten wachsenden Forschungsgebiete in der molekularen Bildgebung dar⁵⁶. Die hervorragende Verfügbarkeit des Radionuklids über den $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Radionuklidgenerator macht das Nuklid kostengünstig und zu einer Alternative zu Zyklotron-produzierten Positronenemittern wie ^{11}C und ^{18}F ⁵⁷. Wichtige Aspekte bei der Planung eines ^{68}Ga -Radiopharmakons sind die Auswahl eines geeigneten Targeting Vektors und der strukturell geschickte Einbau de, für die Komplexierung von ^{68}Ga notwendigen bifunktionellen Chelators.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte der Einbau des bifunktionellen Chelators erfolgte nach einem neuen Konzept zwischen zwei, über Spacer angebrachte, Targeting Vektoren. ^{68}Ga benötigt nur 6 Donorfunktionen, um stabile Komplexe zu bilden. Die im Fall des DOTA beiden verbliebenen freien Ringstickstoffe können daher genutzt werden, um Spacer-Targeting Vektor-Einheiten anzubringen. Mit diesem Konzept ist es möglich, durch eine höhere Anzahl an Targeting Vektoren im Molekül, die Affinität zum gewählten Target zu steigern. Diese Chemie ist allerdings synthetisch relativ aufwendig.

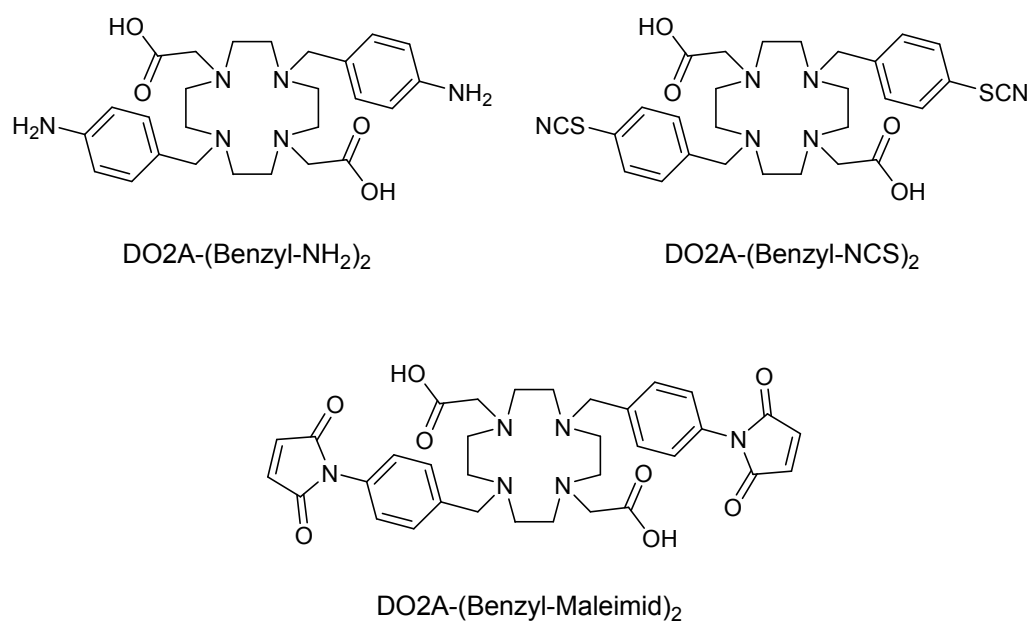


Abbildung 14: Neue, kopplungsfähige DO2A-Derivate

Ein weiterer entscheidender Schritt war die Entwicklung einer leicht zugänglichen Syntheseroute, die in sehr guten Ausbeuten zu DO2A-Derivaten mit jeweils zwei kopplungsfähigen Gruppen, wie z. B. primärem Amin, Isothiocyanat oder Maleimid führte. Die Synthese kann im multi-Gramm-Maßstab durchgeführt werden und eröffnet somit den Zugang zu vielen neuen, divalenten Radiopharmaka, die durch einfache Kopplung von interessanten Targeting Vektoren an diese funktionellen Gruppen erhalten werden können.

3.2 SUR1-Liganden

Die Möglichkeit der Quantifizierung der β -Zell-Masse der Langerhans'schen Inseln im Pankreas mittels PET könnte zu einer entscheidende Verbesserung der Diagnostik von Diabetes Mellitus Typ 1 führen. Die bisherigen Versuche einen ^{11}C oder ^{18}F -markierten Tracer zu entwickeln scheiterten an der hohen Leberaufnahme. Das Einbringen eines BFC zur Markierung mit ^{68}Ga sollte zum einen die Lipophilie senken und böte zum anderen die Möglichkeit, zwei Targeting Vektoren an einen Chelator zu koppeln. Aus diesem Grund sollten neue, über jeweils zwei Propylspacer an DO2A gekoppelte Derivate synthetisiert werden. An Nateglinid, Repaglinid und Glibenclamid wurde jeweils eine Iodpropyleinheit gekoppelt, über welche die Verknüpfung mit den beiden freien Ringstickstoffen des DO2A erfolgen sollte.

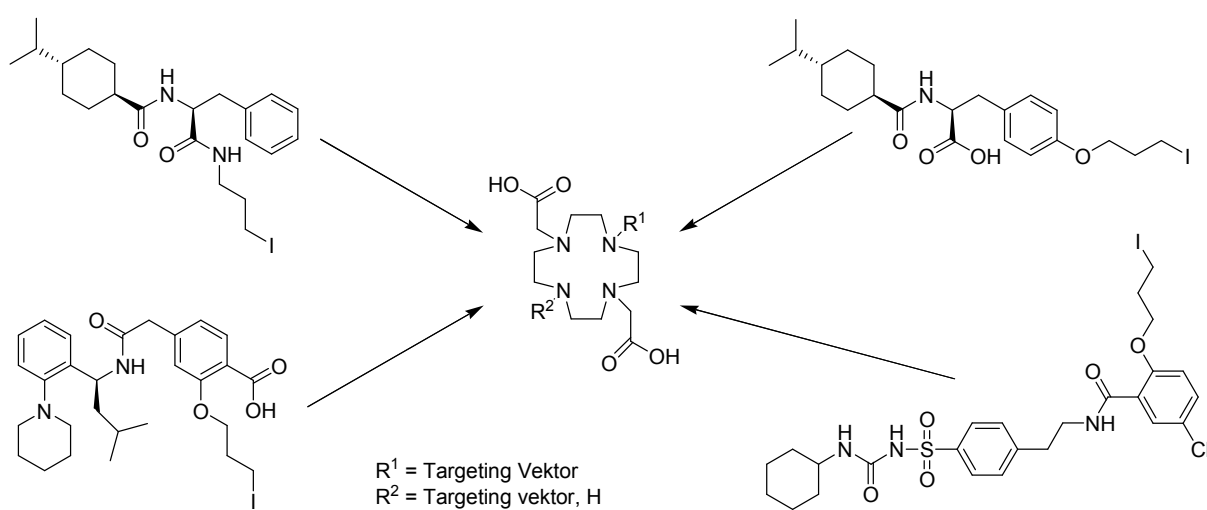


Abbildung 15: Geplante Synthesen der β -Zell-Tracer

Die Synthese der Nateglinid- und Repaglinid-Derivate konnte in guten Ausbeuten durchgeführt werden. Die synthetisierten Derivate (siehe Abbildung 16) stehen nun für eingehende biologische Evaluierungen bereit.

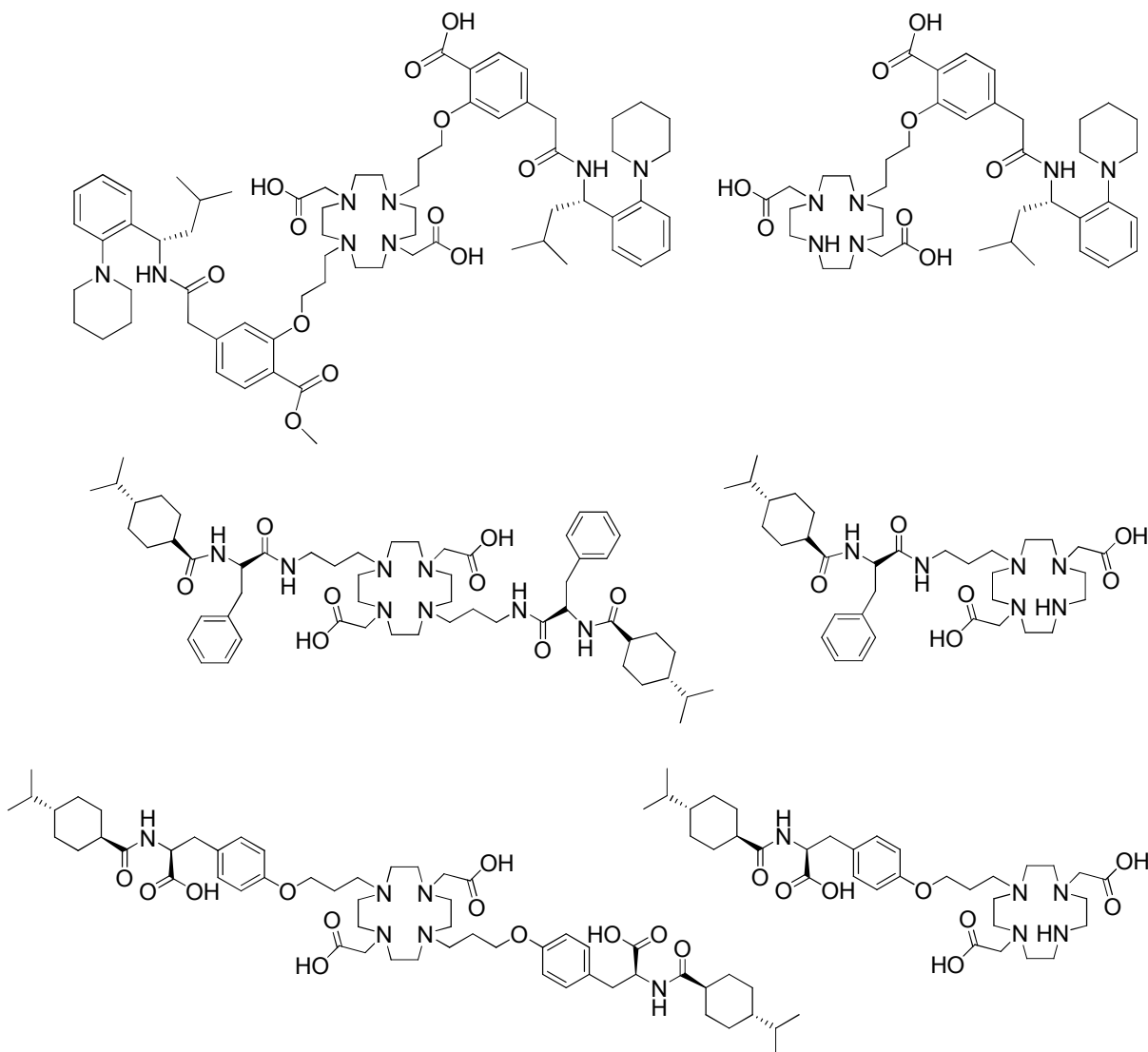


Abbildung 16: Synthetisierte mono- (auf der rechten Seite) und divalente (auf der linken Seite) DO2A-konjugierte SUR1-affine Liganden auf der Basis von Nateglinid und Repaglinid

Bei den Glibenclamid-Derivaten scheiterte die finale Kopplung an das DO2A. Dies lässt sich auf das sehr azide Sulfonylharnstoffproton zurückführen, das die Reaktion entscheidend stört. Eine Perspektive könnte die Einführung eines primären Amins an der phenolischen Hydroxygruppe darstellen, das anschließend mit dem neu synthetisierten Di-

Benzylisothiocyanat-DO2A gekoppelt werden könnte. Folgende Syntheseroute wäre hierzu denkbar (Abb. 17).

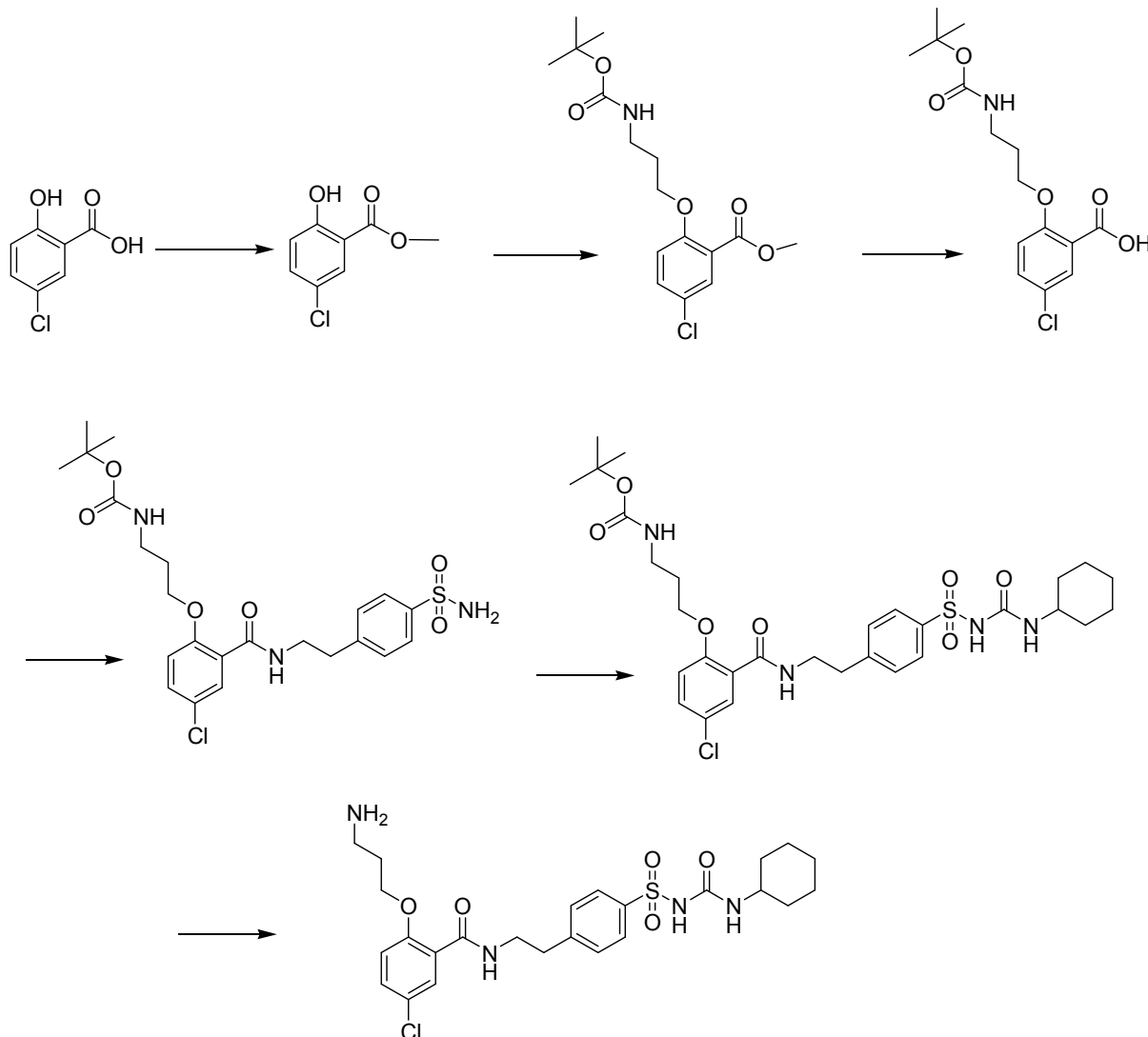


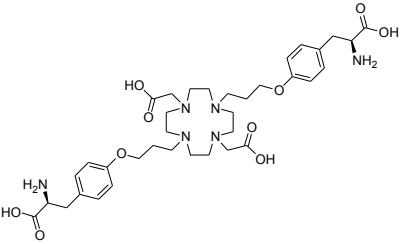
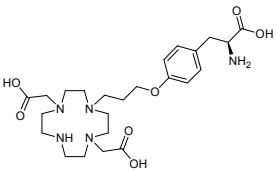
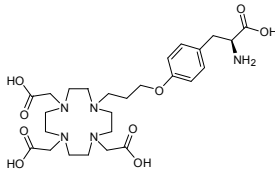
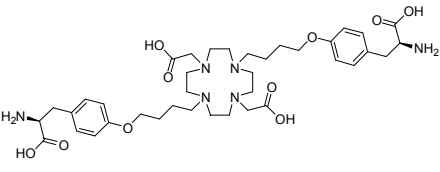
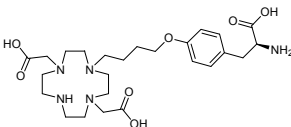
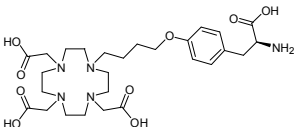
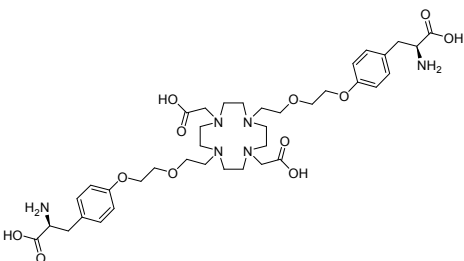
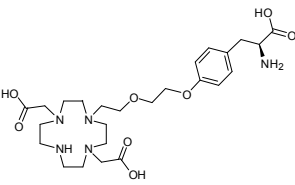
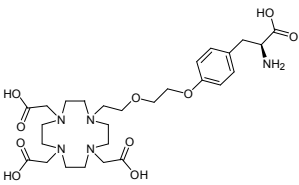
Abbildung 17: Mögliche Syntheseroute eines Amino-funktionalisierten Glibenclamid-Derivats

3.3 Aminosäuretransporter-Liganden

Ein weiteres Hauptaugenmerk lag auf der Synthese, Markierung und Evaluierung von ^{68}Ga -markierten Aminosäuren. ^{11}C - und ^{18}F -markierte Aminosäuren werden bereits routinemäßig bei der Diagnostik von Glioblastomen eingesetzt. Eine ^{68}Ga -markierte Aminosäure, die diese Diagnostik ebenfalls leisten könnte, hätte einen enormen Nutzen für klinische Anwendungen ebenso wie für die Forschung. In einer vorangegangenen Diplomarbeit wurden bereits 8

Zusammenfassung und Ausblick

Markierungsvorläufer synthetisiert und erste ^{68}Ga -Markierungen durchgeführt. Das Portfolio wurde in dieser Arbeit auf 12 Derivate erweitert.

<p>DO2A-(Propyl-L-Tyrosin)₂</p> 	<p>DO2A-Propyl-L-Tyrosin</p> 	<p>DO3A-Propyl-L-Tyrosin</p> 
<p>DO2A-(Butyl-L-Tyrosin)₂</p> 	<p>DO2A-Butyl-L-Tyrosin</p> 	<p>DO3A-Butyl-L-Tyrosin</p> 
<p>DO2A-(DEG-L-Tyrosin)₂</p> 	<p>DO2A-DEG-L-Tyrosin</p> 	<p>DO3A-DEG-L-Tyrosin</p> 

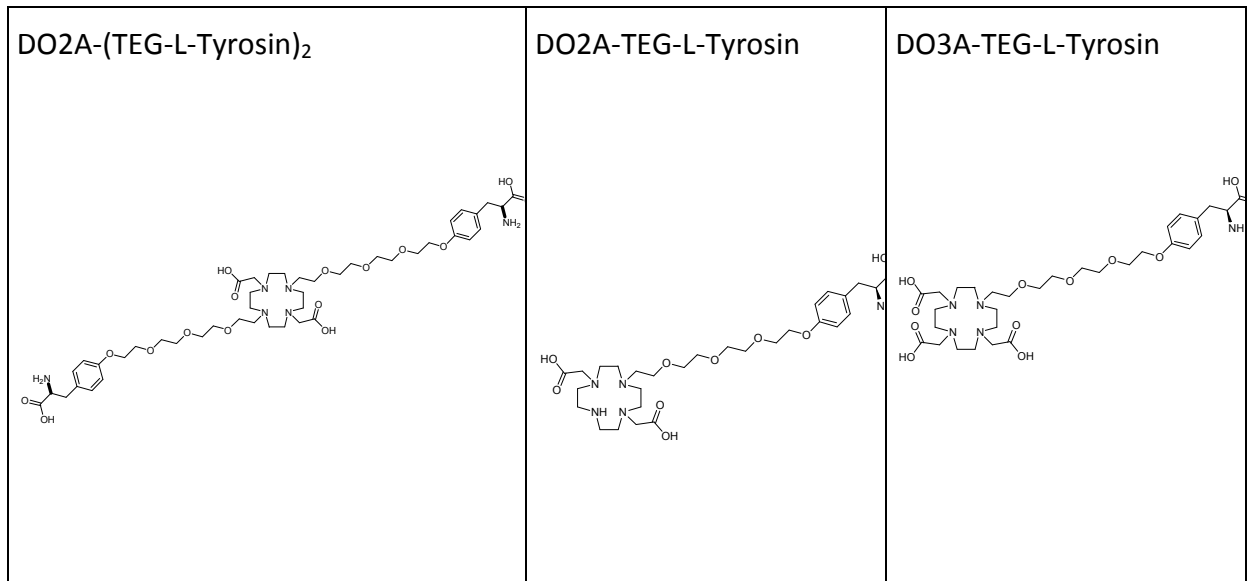


Abbildung 18: Synthetisierte DO2A-Tyrosin-Derivate

Außerdem wurden ausführliche Markierungsstudien durchgeführt, bei denen alle wichtigen Parameter untersucht und optimiert wurden. Der nächste wichtige Schritt bei den ^{68}Ga -Markierungen war die Anwendung der Labormikrowelle. Diese führte zu konstant sehr hohen Ausbeuten in extrem kurzen Reaktionszeiten. So konnte die Radiomarkierung weiter verbessert werden. Außerdem wurde eine Kartuschenaufreinigung etabliert und die Stabilität der gebildeten Komplexe überprüft.

Mit der Modelverbindung $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DO2A-(butyl-L-Tyrosin)}_2$ wurden Zellversuche an F98-Glioblastomzellen durchgeführt. Hierbei konnte eine spezifische Aufnahme des Tracers nachgewiesen werden. Dies gelang in sogenannten „blocking“-Experimenten. Die Aufnahme des Tracers konnte durch Zugabe eines Überschusses von Aminosäuren (BCH, Ser, Trp) auf das Niveau der unspezifischen Bindung, die mit $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DO2A}$ bestimmt worden war, reduziert werden.

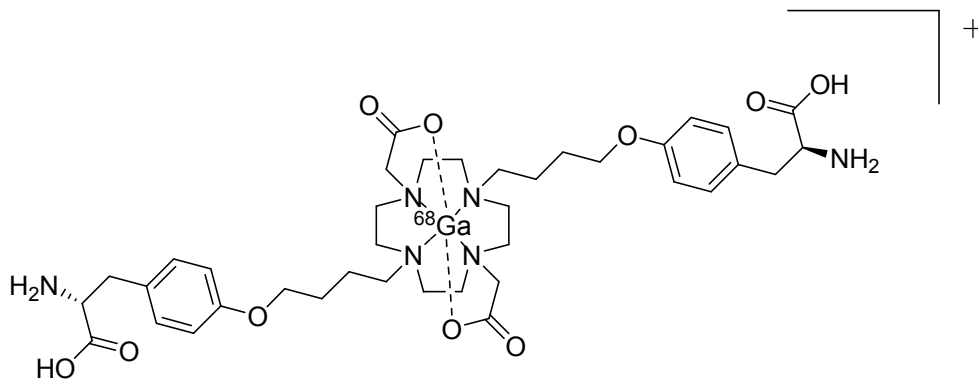


Abbildung 19: Strukturformel von $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DO2A}-(\text{butyl-L-Tyrosin})_2$

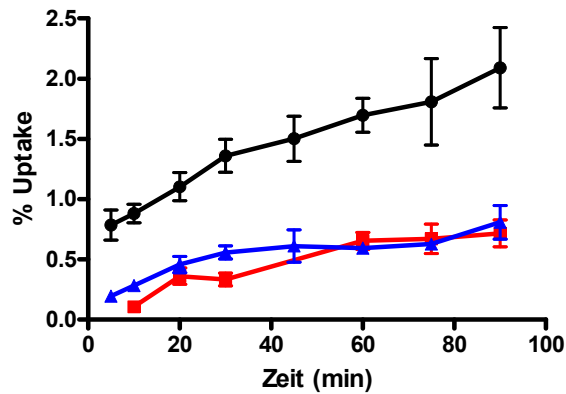


Abbildung 20: Zeitabhängigkeit der Aufnahme von $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DO2A}-(\text{butyl-L-Tyr})_2$ in F98-Glioblastomzellen *in vitro* (schwarz: Aufnahme, rot: geblockte Aufnahme, blau: unspezifische Bindung)

Um die Größenordnung dieser Aufnahme einordnen zu können, wurde ein vergleichendes Experiment mit dem klinisch etablierten Tracer $[^{18}\text{F}]\text{FET}$ durchgeführt. Dabei konnte durch eine vergleichbare Aufnahme in die F98-Zellen gezeigt werden, dass das untersuchte Derivat durchaus vielsprechend ist und in weiteren Studien genauer untersucht werden sollten.

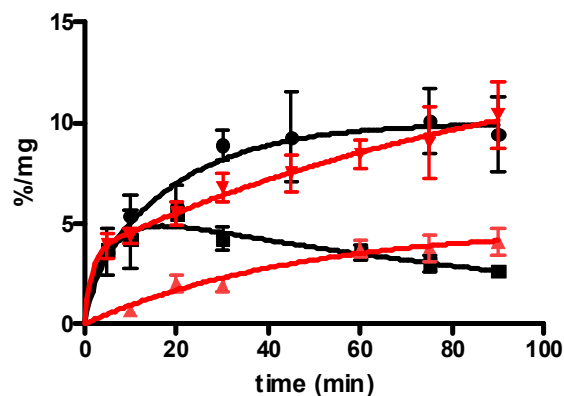


Abbildung 21: Vergleich der Aufnahme von [¹⁸F]FET (rot) und [⁶⁸Ga]Ga-DO2A-(butyl-L-Tyr)₂ (schwarz) in F98-Glioblastomzellen *in vitro*

Neben diesen Studien wurden auch initiale Tierstudien durchgeführt. Ein Tierexperiment wurde mit einer Kopenhagen-Ratte durchgeführt, der zwei AT1 Dunning Prostata Carcinome auf die Fußrücken implantiert wurden. Der Ratte wurden 20 MBq [⁶⁸Ga]Ga-DO2A-(butyl-L-Tyr)₂ injiziert, die Messzeit betrug 60 Minuten. Es zeigte sich eine deutlich höhere Aufnahme des Tracers in den Tumoren verglichen mit Normalgewebe.

Die Verbindung ([⁶⁸Ga]Ga-DO2A-(butyl-L-Tyrosin)₂) wurde in einer ersten humanen Studie getestet. Einem 40-jährigen, männlichen Patienten mit Glioblastom, der vorher bereits mit [¹⁸F]FET gescannt worden war, wurden 314 MBq des injektionsfertigen, steril-filtrierte Radiopharmakons appliziert. Es wurden ein dynamischer Scan über 60 Minuten und ein anschließender Ganzkörperscan durchgeführt. Die Ergebnisse des PET-Scans, eines low-dose CTs und des Fusionsbildes sind in Abbildung 22 dargestellt. Der Tumor ist visualisiert und der Verlauf der Aufnahme in den Tumor wird in Abbildung 23 gezeigt. Hier werden die Summenbilder von 0-15, 15-30, 30-45 und 45-60 Minuten gezeigt. Dabei ist klar erkennbar, dass die Aktivität im Tumor von Zeitpunkt zu Zeitpunkt zunimmt.

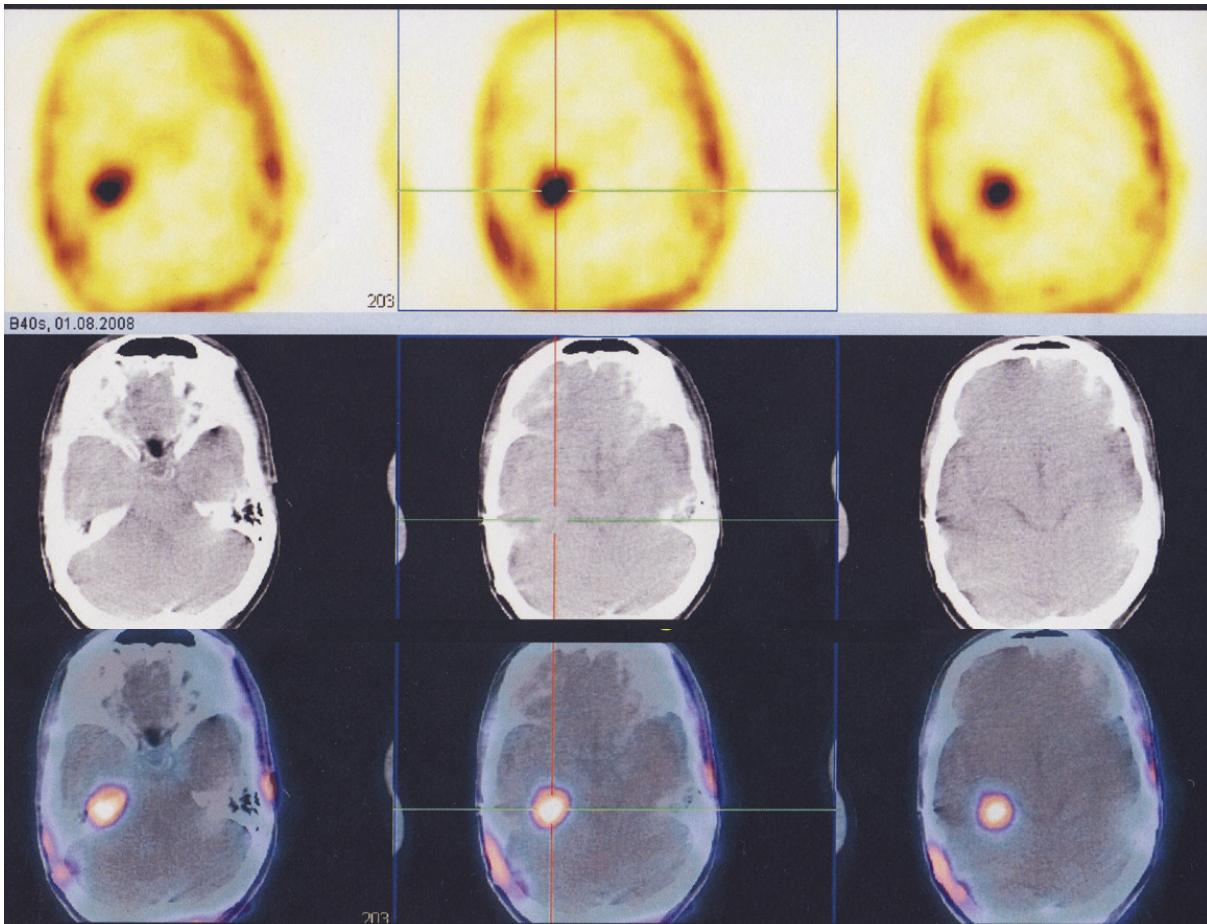


Abbildung 22: PET-Aufnahme (oben), low-dose CT (mitte) und Fusionsbild (unten) der initialen humanen Studie mit $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DO2A-(butyl-L-Tyrosin)}_2$

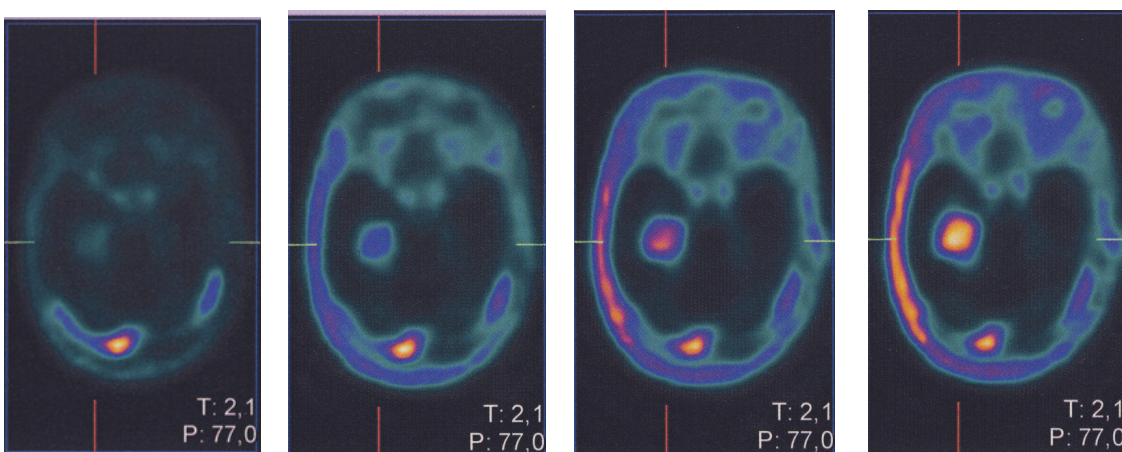


Abbildung 23: Akkumulation des Tracers $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DO2A-(butyl-L-Tyrosin)}_2$ in Summenbildern von 0-15, 15-30, 30-45 und 45-60 Minuten (von links nach rechts)

Allerdings war bei diesem Patienten die Blut-Hirn-Schranke aufgrund des Tumors bereits nicht mehr intakt. Um den Einfluss einer intakten Blut-Hirn-Schranke zu untersuchen wurde der Tracer einem weiteren Patienten, der eine noch intakte Blut-Hirn-Schranke besaß, appliziert. In dieser Studie konnte keine Anreicherung des Tracers im Tumor gezeigt werden. Vom jetzigen Stand des Wissens aus kann also nicht genau gesagt werden, ob in dem ersten Patienten die Anreicherung des Tracers im Tumor auf der Bindung an den Aminosäuretransporter beruht, oder ob lediglich der Blutfluss visualisiert wurde.

Das nächste Ziel ist es nun, den genauen Aufnahmemechanismus der Verbindung herauszufinden, um so vielleicht Rückschlüsse auf das Verhalten des Tracers *in vivo* ziehen zu können. Zu diesem Zweck wurde eine neue Technik auf ihre Eignung überprüft. Auf Eizellen (Oocyten) des *Xebopus laevis* (eines Frosches) können einzelne Aminosäuretransporter selektiv exprimiert werden. Anschließend kann in Wettbewerbsstudien mit anderen Aminosäuren überprüft werden, ob der Tracer an dem speziellen Aminosäuretransporter bindet und in Transstimulationsexperimenten, ob er auch tatsächlich transportiert wird. [¹⁹F]FET wurde hinsichtlich der Bindung und des Transports an/über verschiedene Aminosäuretransporter getestet. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Methode zwar relativ aufwendig, aber hervorragend geeignet ist, die Vorgänge zu quantifizieren.

Abbildung 24 zeigt eine Wettbewerbsstudie von [¹⁹F]FET gegen tritiiertes Leucin am Aminosäuretransporter LAT2. Hier wurde deutlich, dass die Aufnahme des tritiierten Leucins mit steigender Konzentration an [¹⁹F]FET immer stärker gehemmt wird.

Mit dieser Technik steht jetzt eine ausgezeichnete Methode zur Verfügung, um die Bindung und den Transport der ⁶⁸Ga-markierten Tracer an/über Aminosäuretransporter genau zu untersuchen.

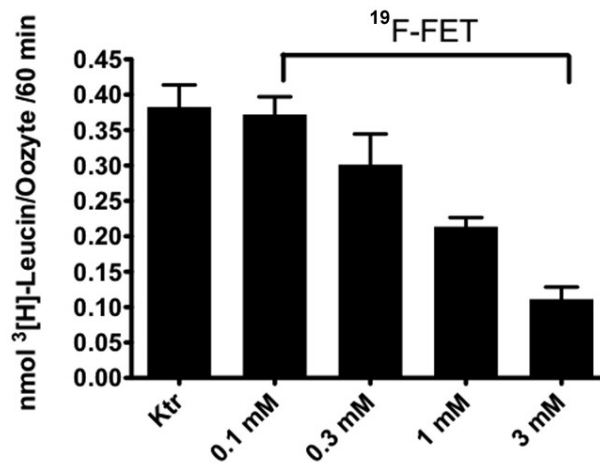


Abbildung 24: Konkurrenz von $[^{19}\text{F}]\text{FET}$ gegen ^3H -Leucin an in *Xenopus laevis*-Oozyten exprimierten LAT2

3.4 Spezifische Aktivität

Ein weiteres Projekt dieser Arbeit war die Entwicklung einer schnellen, kostengünstigen Aufreinigungsmethode für DOTA-konjugierte Radiopharmaka. Mit der bisher angewandten Aufreinigung über HPLC ist die Abtrennung des markierten Produkts, vom im Überschuss eingesetzten Markierungsvorläufer, aufgrund teilweise sehr ähnlicher Retentionszeiten, nicht immer möglich. Dies ist allerdings von großer Bedeutung, da der Markierungsvorläufer *in vivo* mit dem markierten Produkt konkurriert. Besonders in Fällen, in denen nur wenige Targets zur Verfügung stehen, z. B. bei Studien in Mäusen, ist dieser Effekt besonders dramatisch und es werden sehr hohe spezifische Aktivitäten benötigt.

Dieses Problem wurde mit der Kopplung zweier Festphasenextraktionskartuschen gelöst, indem man sich die unterschiedlichen Ladungen von Radiometall, Markierungsvorläufer und markiertem Produkt zunutze macht.

Die saure Markierungslösung wird zunächst über eine Kationenaustauscher-Kartusche gegeben und alle Bestandteile darauf fixiert. Anschließend wird die Kartusche mit Wasser gewaschen und dann mit PBS-Puffer pH 7,4 eluiert. Während das kationische Radiometall zurückgehalten wird, werden das Radiopharmakon, sowie der Markierungsvorläufer eluiert und anschließend über eine Anionenaustauscher-Kartusche gegeben. Das bei diesem schwach basischen pH-Wert dreifach negativ geladene DOTA des Markierungsvorläufers

wird hier adsorbiert, während das markierte Produkt die Kartusche passiert. Das Produkt kann nun auf einer weiteren Kartusche, z. B. einer C18-Kartusche adsorbiert und Ethanol von der Kartusche eluiert und eingesetzt werden. Mittels dieser Methode ist es möglich, den Gehalt an Markierungsvorläufer im finalen Produkt um mindestens den Faktor 25 zu senken.

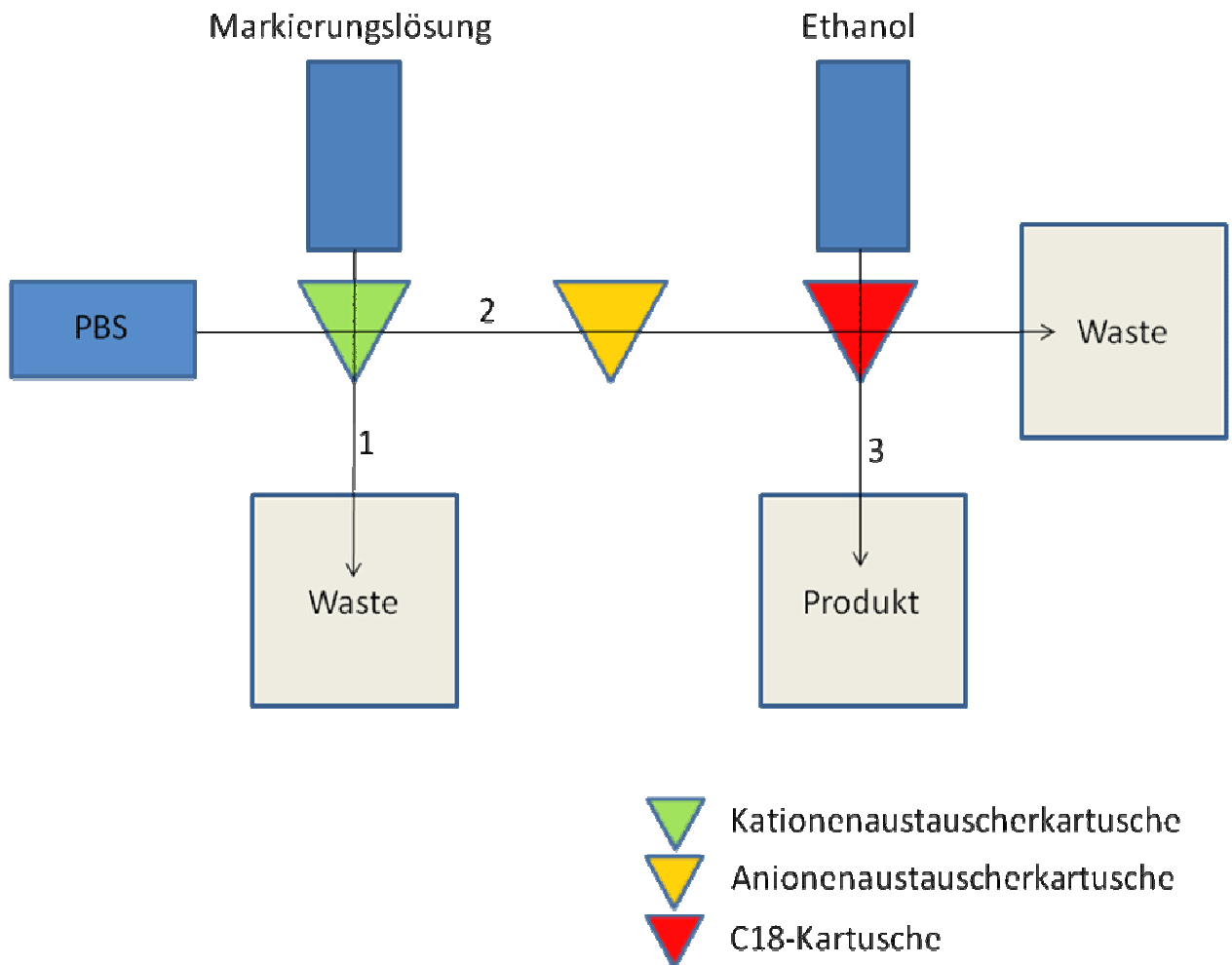


Abbildung 25: Schematischer Aufbau der Festphasenextraktionskartuschenreinigung mittels kombiniertem Kationen- und Anionenaustauscher

3.5 Markierungen in HEPES

In einer weiteren Studie wurde der Einfluss von HEPES als Puffersystem auf ^{68}Ga -Markierungsreaktionen untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass HEPES, besonders bei sehr niedrigen Markierungsvorläuferkonzentrationen, einen konkurrierenden $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -HEPES-Komplex bilden kann. Diese Erkenntnisse sollten bei der weiteren Planung von Markierungsreaktionen in HEPES berücksichtigt werden.

3.6 NMR-Analytik

Ein anderer erwähnenswerter Punkt war die genaue Charakterisierung von DO2A-Derivaten mittels NMR-Spektroskopie. Dies war nötig, da es nicht gelang, die mit $^{69,71}\text{Ga}$ umgesetzten Markierungsvorläufer zu kristallisieren und Röntgenstrukturanalysen durchzuführen. In den NMR-Spektren konnte allerdings ein deutlicher Shift der komplexierenden Gruppen nachgewiesen werden. Dies kann als indirekter Nachweis der Komplexbildung gedeutet werden. Besonders die Veränderung des Singuletts der CH_2 -Gruppe der komplexierenden Acetat-Gruppen von 3,3 im Markierungsvorläufer nach 3,65 im Komplex ist signifikant.

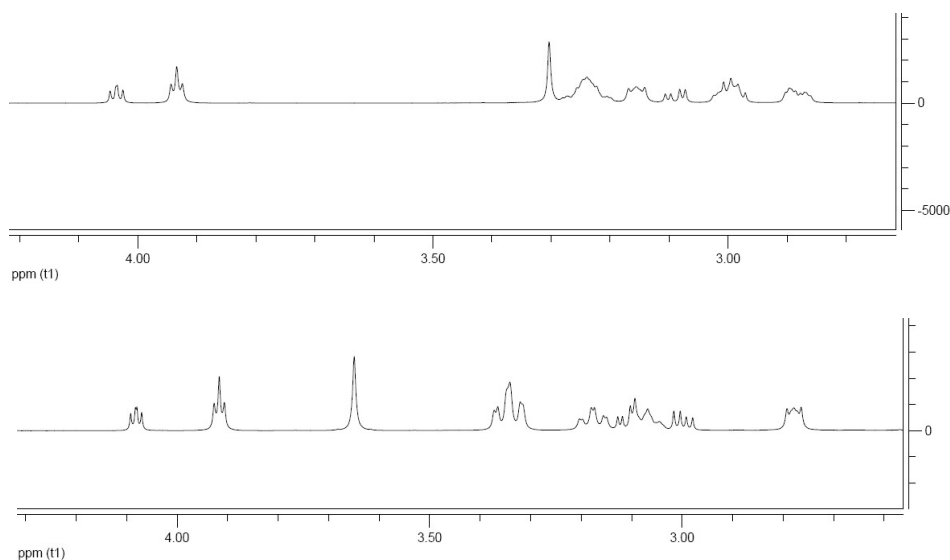


Abbildung 26: Vergleich der NMR-Spektren des Markierungsvorläufers (oben) und $[\text{}^{69,71}\text{Ga}]\text{Ga}$ -DO2A-(butyl-L-Tyrosin) $_2$ (D_2O , 600MHz)

3.7 Zusammenfassung

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass das Konzept, zwei Targeting Vektoren über den bifunktionellen Chelator zu verbrücken, präparativ chemisch gut umgesetzt werden kann. Die Möglichkeiten, die vor allem der breite Zugang zu neuen, potentiellen Radiopharmaka über die synthetisierten DO2A-Derivate bietet, sind als sehr groß einzuschätzen. So können in kurzer Zeit eine Vielzahl neuer Derivate hergestellt und getestet werden. Das Konzept zwei Targeting Vektoren an einen BFC zu koppeln, kann durch leichte Modifikationen auch für höher koordinierende, für die Endoradiotherapie geeignete Metalle, wie z. B. ^{90}Y oder ^{177}Lu übertragen werden⁵⁸. Ein Strukturvorschlag für solche Derivate findet sich in Abbildung 27. Allerdings ist hierbei zu beachten, dass das abgebildete Molekül ein Racemat ist und sich die unterschiedlichen Enantiomere *in vivo* unterschiedlich verhalten können.

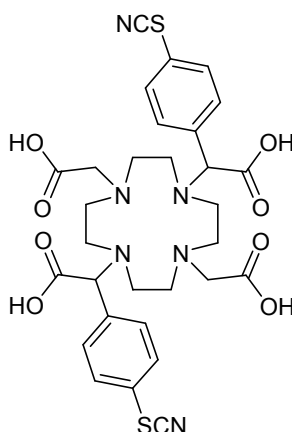


Abbildung 27: Strukturvorschlag für einen divalenten, für die Endoradiotherapie geeigneten bifunktionellen Chelator

Eine geeignete und aussagekräftige biologische Evaluierung stellt einen weiteren Kernpunkt in der Entwicklung neuer, ^{68}Ga -markierter Radiopharmaka dar. Nur wenn es gelingt, die biologischen Prozesse, die der Tracer *in vivo* durchläuft, zu verstehen, ist es möglich, den am besten geeigneten Kandidaten frühzeitig zu erkennen und weiter zu untersuchen. Neue, biologische *in vitro* Modelle, wie das exprimieren von Transportern auf Oocyten oder ein Blut-Hirn-Schranken Modell⁵⁹ können dazu einen wichtigen Beitrag leisten.

Langfristige Vision muss es sein, relevante ^{68}Ga -Radiopharmaka, ähnlich den bereits etablierten $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Kits, in einer sogenannten Kit-Form in die klinische Anwendung zu

bringen^{60,61}. Dazu wird eine weitere Optimierung der Markierungsreaktionen benötigt, um ⁶⁸Ga-Markierungen bestenfalls quantitativ, bei Raumtemperatur und in sehr kurzen Reaktionszeiten durchführen zu können. Würde dies mittels Verbesserungen des Chelatordesigns oder der Markierungsbedingungen gelingen, hätten ⁶⁸Ga-markierte Radiopharmaka, basierend auf der Vielzahl der Anwendungsmöglichkeiten, der hervorragenden Verfügbarkeit auch abseits von Zyklotronstandorten, und der deutlich gesenkten Kosten, ein immenses Potential und könnten helfen die diagnostischen Vorteile, die die PET bietet, mehr Menschen zugänglich zu machen.

⁵⁶ F. Roesch, P. J. Riss, *The renaissance of the ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga radionuclide generator initiates new developments in ⁶⁸Ga radiopharmaceutical chemistry*, *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, accepted.

⁵⁷ M. Fani, J. P. Andre, H. Mäcke. ⁶⁸Ga-PET: A powerful generator-based alternative to cyclotron-based radiopharmaceuticals. *Contrast Media Mol. I.* **3**, **2008**, 67.

⁵⁸ W. A. P. Breeman, E. de Blois, W. H. Bakker, E. P. Krenning, *Radiolabeling DOTA-peptides with ⁹⁰Y and ¹⁷⁷Lu to a high specific energy*, *Radionucl. Peptide Cancer Ther.* **2006**, 119.

⁵⁹ C. R. Kuhlmann, L. Librizzi, D. Closhen, T. Pflanzner, V. Lessmann, C. U. Pietrzik, M. de Curtis, H.H. J. Luhmann, *Mechanisms of C-protein induced blood-brain-barrier dirution*, *Stroke* **40**, **2009**, 1458.

⁶⁰ M. D. Bartholomä, A. S. Louie, J. F. Valliant, J. Zubieta, *Technetium and Gallium derived radiopharmaceuticals: Comparing and contrasting the chemistry of two important radiometals for the molecular imaging era*, *Chem. Rev.* **110**, **2010**, 2903.

⁶¹ W. A. P. Breeman, A. Verbruggen, *The ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga-generator has great potential, but when can we use ⁶⁸Ga in the clinical routine?*, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. I.* **34**, **2007**, 978.

Lebenslauf

Name	Carsten Burchardt
Geburtsdatum	27.08.1979
Geburtsort	Mainz
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig



Schulbildung

08 / 1986 – 06 / 1990	Grundschule Schwabenheim
08 / 1990 – 06 / 1999	Sebastian-Münster-Gymnasium Ingelheim Erlangung der Hochschulreife

Wehrdienst

11 / 1999 – 08 / 2000	Allgemeiner Grundwehrdienst
-----------------------	-----------------------------

Studium

10 / 2000	Beginn des Studiums der Chemie an der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
10 / 2003	Vordiplom in Chemie
11 / 2003	Beginn des Hauptstudiums
08 / 2006	Abschluss des Hauptstudiums
09 / 2006 – 05 / 2007	Anfertigung einer Diplomarbeit im Institut für Kernchemie unter der Anleitung von Prof. Dr. F. Rösch; Thema: „Synthese und ⁶⁸ Ga-Markierung von DOTA-Tyrosin Derivaten“
05 / 2007	Abschluss zum Diplom-Chemiker
seit 06 / 2007	Anfertigung einer experimentellen Doktorarbeit im Institut für Kernchemie im Arbeitskreis von Prof. Dr. F. Rösch; Thema: „Synthese, ⁶⁸ Ga-Markierung, Aufreinigung und Evaluierung von divalenten DO2A-basierenden Radiopharmaka“

Lehrtätigkeit

07 / 2005 Assistent im Praktikum „Chemie für Mediziner“
seit 09 / 2006 Assistent am Institut für Kernchemie, Betreuung von Übungen
sowie des Praktikums „Chemie für Physiker und
Geowissenschaftler“
11 / 08 – 07 / 2009 Betreuer und Ansprechpartner für Diplomarbeiten im AK Rösch
sowie seit 01 / 2010

Berufliche Tätigkeit

08 / 2001 – 09 / 2001 Studentische Aushilfskraft bei der IKK Rheinland-Pfalz
sowie
08 / 2002 – 09 / 2002

Sprachen

Englisch: Verhandlungssicher
Französisch: Grundkenntnisse
Deutsch: Muttersprache

Weitere Aktivitäten

1996 – 2004 Jugendarbeit: lizenzierter Übungsleiter und Betreuer
verschiedener Fußballjugendmannschaften der TSG
Schwabenheim

Hobbys

Fußball, Schach

Andreas Burckhardt

Mainz, den 25.07.2010