

**Radiomarkierung von HPMA-basierten,  
funktionalisierten Polymeren mit metallischen Radionukliden  
für die medizinische Anwendung als Theranostika**

**Dissertation**

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

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

**Elisabeth Eppard**

geboren in Mainz

Mainz, 2013



Tag der mündlichen Prüfung: 06.12.2013



**Meiner Familie**

Was ist ein Gelehrter?

Ein unerträglicher Kauz, der grundsätzlich  
alles studiert und veröffentlicht,  
was keinen interessiert.

---

*Anatole France (1844–1924)*

# Zusammenfassung

Für eine erfolgreiche Behandlung bösartiger Tumore ist eine frühzeitige Diagnose, aber auch eine effektive und effiziente Therapie essentiell. In diesem Zusammenhang sind Nanomaterialien in den Fokus der Arzneimittelentwicklung gerückt, welche für Diagnostik und Therapie genutzt werden könnten.

Systematische Studien zur Radiometallmarkierung von Nanopartikeln und deren Stabilität *in vitro* im Zusammenhang mit der Struktur des Linkers und dem Anteil an Chelator wurden anhand verschiedener HPMa-DOTA-Konjugate durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Linkerstruktur und der Belegungsgrad sowohl die Markierung als auch die *in vitro*-Stabilität von radiometallmarkierten HPMa-DOTA-Konjugaten beeinflussen.

Für die Markierung selbst stehen mehrere Generator-produzierte metallische Positronenemitter zur Verfügung. Infolge der gesetzlichen Bestimmungen muss das Eluat der Generatoren bestimmte Spezifikationen (Elutionsausbeute, Durchbruch des Mutternuklids, Gehalt an Fremdionen, pH-Wert etc. ) erfüllen, um für die Darstellung von Radiopharmaka verwendet werden zu können.

Für das bereits etablierte PET-Nuklid  $^{68}\text{Ga}$  konnte eine Ethanol-basierte Aufreinigung entwickelt werden, welche hohe Elutions- und Markierungsausbeuten sowie Radionuklidreinheit garantiert und damit einen wichtigen Schritt für die Entwicklung von Kit-Formulierungen repräsentiert. Ausserdem konnten zwei Methoden zur Qualitätskontrolle entwickelt werden, welche es ermöglichen die Radionuklidreinheit des initialen  $^{68}\text{Ga}$ -Eluats, aber auch des finalen  $^{68}\text{Ga}$ -Radiopharmakons innerhalb einer Stunde ohne  $\gamma$ -Spektroskopie zu bestimmen.

Während mit  $^{68}\text{Ga}$  die Pharmakokinetik markierter Derivate für einen Zeitraum von bis 3 Stunden zugänglich ist, deckt das Generator-produzierte  $^{44}\text{Sc}$  eine Periode von bis zu einem Tag ab. Damit lässt sich die Pharmakokinetik markierter polymerer Drug Carrier-Systeme – von der frühen Ausscheidungsphase bis hin zu organspezifischen Akkumulationen durch passives und aktives Targeting – gut beschreiben.

Für  $^{44}\text{Sc}$  konnte anhand der Modellverbindung DOTATOC gezeigt werden, dass das aufgereinigte Generatoreluat für die Markierung mit hohen radiochemischen Ausbeuten geeignet ist und etablierte Markierungsmethoden übertragbar sind. In weiterführenden Studien zur molekularen Bildgebung könnte das Potential dieses PET-Nuklids für die Langzeitbildgebung gezeigt werden.





# Abstract

An early diagnosis of cancer followed by an effective and efficient therapy is essential for a successful tumor treatment. Nanomaterials moved into the focus of modern research and medicine, which could be utilized for diagnostic and therapeutic purposes.

Systematic investigations in regard to labeling with metallic radionuclides and their *in vitro* stability in relation to linker structure and incorporation rate of the chelator performed using several HPMA-DOTA conjugates. This study confirms the influence of linker structure and incorporation rate on labeling and *in vitro* stability.

For labeling several metallic positron emitter are available via radionuclide generator systems. As a result of legal regulations the generator eluate has to comply assigned specifications (elution yield, generator breakthrough, content of impurities, pH etc. ) to be utilized for radiopharmaceutical synthesis.

For the established PET isotope  $^{68}\text{Ga}$  an ethanol-based purification method was developed, which ensures radionuclidic purity with simultaneous high elution and improved labeling yields. This represents an important step towards the kit-type synthesis of  $^{68}\text{Ga}$ -radiopharmaceuticals. Furthermore two quality control methods were developed which allow the determination of radionuclidic purity in initial  $^{68}\text{Ga}$ -eluate and of the final injectable  $^{68}\text{Ga}$ -radiopharmaceutical within one hour without the need of  $\gamma$ -spectroscopy. Utilizing  $^{68}\text{Ga}$  pharmacokinetics of labeled derivatives are only accessible for a period of up to 3 hours, while generator-produced  $^{44}\text{Sc}$  covers periods up to one day. Thereby pharmacokinetics of labeled polymer drug carrier systems can be tracked from early elimination up to organ specific accumulation with passive or active targeting.

At last, it was shown that labeling with  $^{44}\text{Sc}$  of a model compound (DOTATOC) is possible, achieving high radiochemical yields utilizing purified generator eluate. It could be demonstrated that established radiochemical methods can be adopted easily and may allow follow-up research on PET/CT imaging with this new trivalent metallic positron emitter.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Nanomaterialien in der Medizin . . . . .	2
1.1.1	Nanopartikel als Drug Delivery-Systeme . . . . .	3
1.1.2	Passives Targeting: Der EPR-Effekt . . . . .	5
1.1.3	Aktives Targeting . . . . .	7
1.1.4	Polymere Therapeutika . . . . .	8
1.1.4.1	Polyethylenglykol (PEG) . . . . .	9
1.1.4.2	Poly(N-(2-Hydroxypropyl)-Methacrylamid) (Poly(HPMA)) . . . . .	10
1.1.4.3	Herstellung von HPMA-Polymeren mittels radikalischer Polymerisation . . . . .	10
1.1.4.4	Darstellung von Polymer-Wirkstoff-Konjugaten . . . . .	14
1.2	Radiometalle für die nuklearmedizinische Anwendung . . . . .	15
1.2.1	Radiometalle zur Diagnostik . . . . .	16
1.2.1.1	Positronen-Emissions-Tomographie (PET) . . . . .	17
1.2.1.2	Generator-produzierte Positronenemitter . . . . .	18
1.2.2	Radiometalle für die therapeutische Anwendung . . . . .	22
1.2.3	Markierungsstrategien für Radiometalle . . . . .	24
1.3	Theranostik – Theranostics . . . . .	26
1.3.1	Radiometalle für die Theranostik . . . . .	26
1.3.2	Anwendungen von Nanomaterialien in der Theranostik – Nanotheranostika . . . . .	29
1.3.3	Funktionalisierung von Polymeren mit Chelatoren . . . . .	30
<b>2</b>	<b>Problemstellung</b>	<b>45</b>
<b>3</b>	<b>Manuskripte</b>	<b>49</b>
3.1	Labeling of HPMA-based polymer-conjugates with metallic radionuclides for theranostic application . . . . .	50
3.2	Ethanol-based post-processing of generator derived <sup>68</sup> Ga towards kit-type preparation of <sup>68</sup> Ga-radiopharmaceuticals . . . . .	79

3.3	Quantitative online isolation of $^{68}\text{Ge}$ from $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generator eluates for purification and immediate quality control of breakthrough . . . . .	97
3.4	Quality control of $^{68}\text{Ge}$ content in $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generator eluates and $^{68}\text{Ga}$ radiopharmaceuticals – a protocol for the determination of the $^{68}\text{Ge}$ content using thin-layer chromatography . . . . .	109
3.5	Radiolabeling of DOTATOC with the long-lived positron emitter $^{44}\text{Sc}$ . . . . .	123
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>141</b>
4.1	Radiometallmarkierung von HPMA-basierten Polymeren für die Theranostik . . . . .	141
4.2	Entwicklung eines Ethanol-basierten Post-Prozessings für Generator-produziertes $^{68}\text{Ga}$ auf Grundlage der etablierten Kationenaustauscher-Methodik . . . . .	147
4.3	Entwicklung von Methoden zur Bestimmung des $^{68}\text{Ge}$ -Gehalts in $^{68}\text{Ga}$ -Lösungen zur Qualitätssicherung . . . . .	151
4.4	Etablierung von $^{44}\text{Sc}$ als PET-Nuklid . . . . .	156
<b>5</b>	<b>Ausblick</b>	<b>161</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>163</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>167</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>169</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>170</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>172</b>

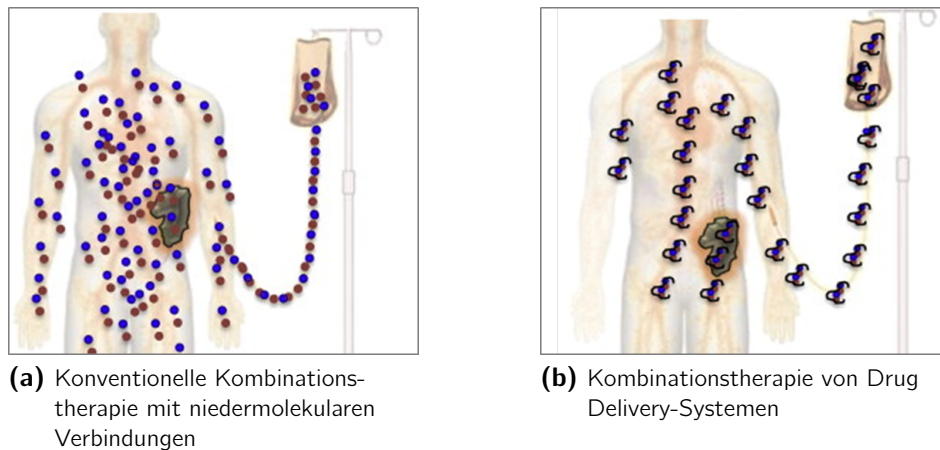
# 1 Einleitung

Maligne Tumore zählen zu den häufigsten tödlichen Erkrankungen weltweit. In den Industrie- und Schwellenländern sind sie die zweit- und dritthäufigste Todesursache. Allein 2008 starben 7,6 Millionen Menschen, das sind ca. 13 % aller Todesfälle, an den Folgen von Tumorerkrankungen [1].

Eine erfolgreiche Bekämpfung von Tumoren hängt von der Prävention, einer frühzeitigen Diagnose und besonders aber von einer effektiven und möglichst effizienten Therapie ab. Der Großteil der derzeit zugelassenen Zytostatika, die in der Tumorthherapie Anwendung finden, sind niedermolekulare Verbindungen (Molekulargewicht  $< 800 \text{ g mol}^{-1}$ ), welche unspezifisch die Zellteilung hemmen. Diese verteilen sich im Organismus durch Diffusion homogen und haben nur eine kurze Retentionszeit im Blut. Aufgrund der homogenen Verteilung erreicht lediglich ein geringer Anteil der verabreichten Medikamente den Wirkort (Abb. 1a). Um einen therapeutischen Effekt zu erzielen, müssen daher große Mengen der Medikamente appliziert werden. Dadurch kann es zu teils erheblichen Nebenwirkungen kommen.

Das von Paul Ehrlich eingeführte Konzept der „magischen Kugel“ hat zur Entwicklung von Strategien für den gezielten Transport der Chemotherapeutika (Targeted Drug Delivery) an den Wirkort geführt [2, 3]. Durch „Drug Targeting“ und die Verwendungen von Nanomaterialien als Drug Delivery-Systeme können heute darüber hinaus die Konzentration der niedermolekularen Chemotherapeutika am Wirkort sowie der therapeutische Effekt erhöht werden. Die Optimierung des Wirkstofftransports und eine therapiebegleitende Diagnose kann zusätzlich durch die Einbindung von Targeting-Vektoren oder bildgebenden Funktionen ermöglicht werden (Abb. 1b). Als bildgebende Funktionen können z. B. Fluoreszenzfarbstoffe (optische Bildgebung), Kontrastmittel (Magnetresonanztomographie (MRT); photoakustische Bildgebung) oder Radionuklide (Positronen-Emissions-Tomographie (PET), Einzelphotonen-Emissions-Computer-Tomographie (SPECT)) eingebunden werden.

Diese Verzahnung von Therapie und Diagnostik durch ein solches „Theranostikum“ ist ein wichtiger Schritt für eine individualisierte Therapie dank gezielterer Diagnostik.



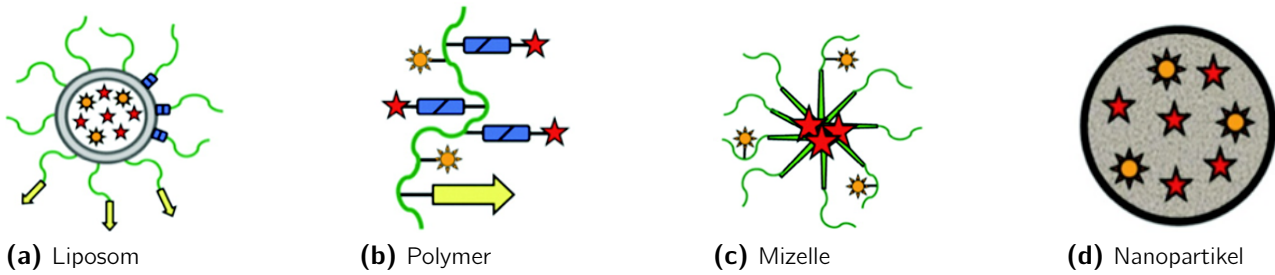
**Abb. 1:** Schematische Darstellung des Vorzugs von Drug Delivery-Systemen gegenüber den traditionellen niedermolekularen Verbindungen in der Tumorthherapie [4].

## 1.1 Nanomaterialien in der Medizin

Der Begriff Nanomedizin bezeichnet die Anwendung von Werkzeugen im Nanometermaßstab zur Prävention, Diagnostik und Therapie, mit dem Ziel, die Lebensqualität des Patienten zu verbessern und zum besseren Verständnis der komplexen Pathophysiologie von Erkrankungen beizutragen [5].

Das vorrangige Ziel der Nanomedizin ist die Verbesserung des therapeutischen Index von probaten Wirkstoffen, d. h. eine Steigerung des therapeutischen Effekts bei gleichzeitiger Reduktion der unerwünschten Nebenwirkungen. Der therapeutische Index beschreibt das Verhältnis der mittleren letalen Dosis (die Dosis, bei der 50 % der Probanden sterben) zur mittleren Effektivdosis (die Dosis, bei der bei 50 % der Probanden der erwünschte therapeutische Effekt auftritt) eines Wirkstoffs. Um das Freigabeprofil von Wirkstoffen in der gewünschten Art und Weise zu kontrollieren (Controlled Drug Release) und darüber hinaus den Wirkstoff gezielt an den Wirkort zu transportieren (Drug Targeting), wurden Transportsysteme (Drug Carrier bzw. Drug Delivery-Systeme) entwickelt.

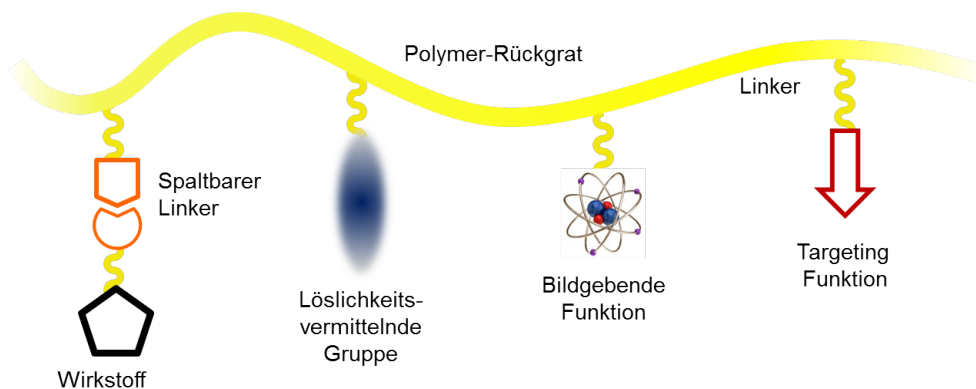
Mittlerweile gibt es zahlreiche Drug Carrier-Systeme für den zielgerichteten Wirkstofftransport [6, 7]: unter anderem Liposome [8, 9], Mizellen [8, 10], natürliche und synthetische Polymernanopartikel [11, 12], metallische Nanopartikel [13] und Mikrosphären [14]. Klinische Relevanz haben derzeit Liposome, Polymere, Mizellen und feste Nanopartikel (Abb. 2) [15].



**Abb. 2:** Klinisch relevante Drug Carrier-Systeme [15].

### 1.1.1 Nanopartikel als Drug Delivery-Systeme

Das Konzept der Anwendung makromolekularer Polymer-basierter Systeme für den Wirkstofftransport in Form von Wirkstoff-Polymer-Konjugaten wurde erstmals von Ringsdorf entwickelt [16, 17]. In diesem Modell sind mehrere Wirkstoffmoleküle an ein Polymer-Rückgrat gebunden. Die Freigabe des Wirkstoffs kann optional über einen spaltbaren Linker erfolgen. Aufgrund seiner Größe kann das Polymer-Konjugat mit weiteren Funktionen, z. B. Löslichkeitsvermittelnden Gruppen, targeting oder bildgebenden Funktionen versehen werden (Abb. 3). Die große Bandbreite an Drug Carrier-Systemen ermöglicht ein breites Anwendungsspektrum in der Medizin, weil vor allem die Wahl des Transporters Auswirkungen auf Bioverfügbarkeit und Biodistribution des zu transportierenden Wirkstoffs hat [18].



**Abb. 3:** Ringsdorf-Modell für polymer-basierte Drug Carrier-Systeme.

Für die Auswahl des Drug Carrier-Systems müssen viele Faktoren berücksichtigt werden. Dazu gehören das Target, die Applikationsform und die Charakteristika des Wirkstoffs.

Die wichtigsten Gründe für ihren Einsatz sind [19]:

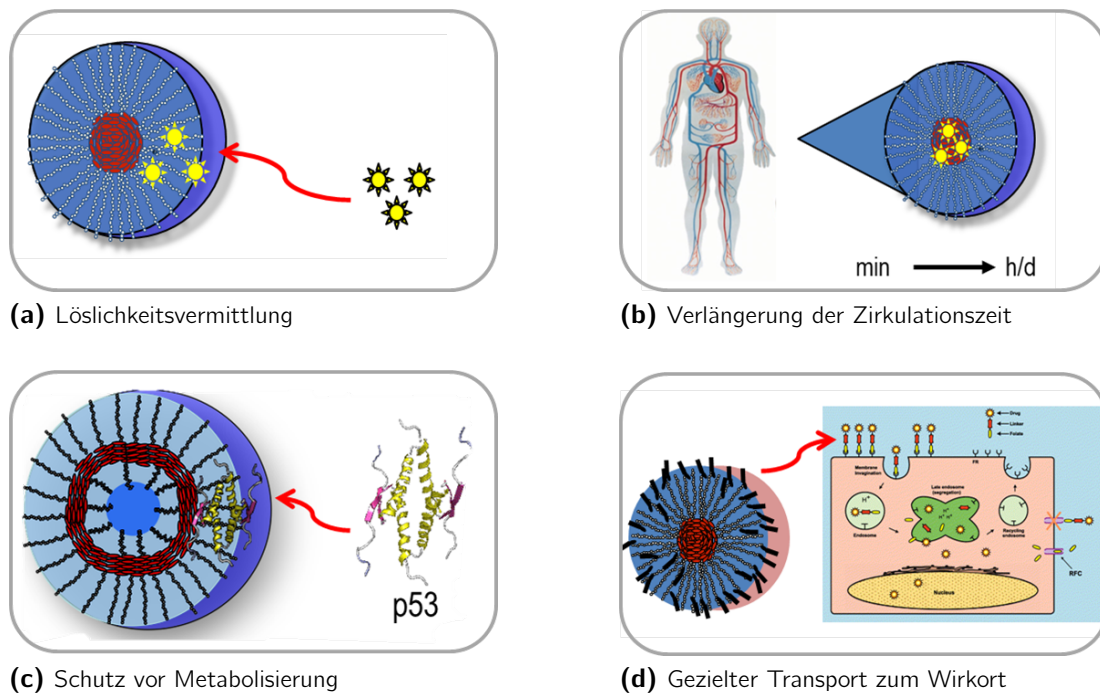
- Schutz des Wirkstoffs vor frühzeitiger Metabolisierung und dadurch Verlängerung der Bioverfügbarkeit.
- Beeinflussung der Löslichkeit des Wirkstoffs.
- Akkumulation des Wirkstoffs am Wirkort, durch spezifischen oder unspezifischen Transport.
- Reduktion von Nebenwirkungen.
- Ausnutzung lokaler Veränderungen (z. B. pH-Änderungen), um die gewünschten Pharmakokinetiken zu erzielen.
- Möglichkeit für passives und aktives Targeting durch Modifikationen.

Infolge ihrer verbesserten Bioverfügbarkeit, Löslichkeit und Retentionszeit gehören Nanopartikel zu den am meist genutzten Drug Carrier-Systemen [20]. Physikalisch oder chemisch eingebundene Wirkstoffe können mit ihrer Hilfe gezielt durch Extravasation oder durch Einsatz von spaltbaren Linkern im Zielgewebe freigesetzt werden, eine Fähigkeit, welche Mikropartikel (1–50  $\mu\text{m}$ ) nicht besitzen [21]. Makropartikel (50–200  $\mu\text{m}$ ) und Nanopartikel (10–1000 nm) können überdies sowohl aktiv als auch passiv in der Zielregion angereichert werden. Die passive Anreicherung erfolgt über den Enhanced Permeability and Retention Effekt (EPR-Effekt), wohingegen ein aktives Targeting durch Anbindung targetspezifischer Liganden erfolgt.

Bei der Entwicklung von Nanopartikeln als Drug Carrier-System sind unter anderem die Partikelgröße, Rigidität, Ladung, Löslichkeit oder auch Oberflächenmodifikationen, welche für die Pharmakokinetik des Carriers und damit für einen erfolgreichen Wirkstofftransport von Bedeutung sind, zu beachten (Abb. 4).

Wenngleich Nanopartikel von großem praktischen Nutzen sind, erfahren sie jedoch einige Limitierungen. Die Nanopartikel müssen wasserlöslich sein, eine geringe Immunogenität aufweisen und dürfen möglichst wenige unspezifische Wechselwirkungen mit dem Organismus, z. B. Komponenten des Blutes, eingehen. Ihre Risiken für die Gesundheit des Menschen oder Auswirkungen auf die Umwelt sind noch unzureichend erforscht [18].



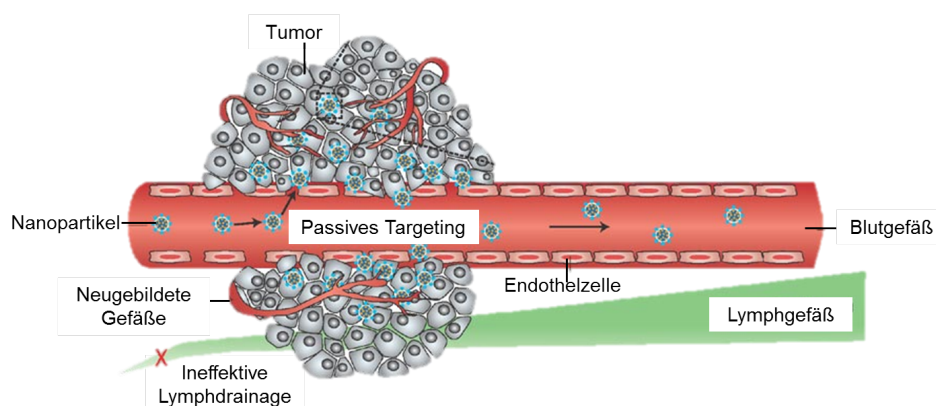


**Abb. 4:** Nanopartikel beeinflussen die Löslichkeit und Zirkulationszeit eines Wirkstoffes, während sie zusätzlich Schutz vor Metabolisierung gewähren und einen gezielten Transport zum Zielgewebe ermöglichen.

### 1.1.2 Passives Targeting: Der EPR-Effekt

Wie Matsumura und Maeda bereits 1986 beschrieben haben, ist der EPR-Effekt eine Möglichkeit zur gezielten Akkumulation von Wirkstoffen in Tumoren [22, 23]. Dieser passive Anreicherungsmechanismus nutzt die physiologischen Besonderheiten von tumorösem oder auch entzündetem Gewebe aus (Abb. 5) [24].

Aufgrund der hohen Zellteilungsrate zeichnet sich Tumorgewebe durch ein schnelles Wachstum aus. Dieses führt zu einem erhöhten Nährstoffbedarf des Tumors. Kann dieser nicht mehr gedeckt werden, entsteht ein Versorgungsmangel im Tumorinneren, was häufig ein Absterben der Zellen und einer Nekrotisierung der unterversorgten Tumorbereiche induziert. Der Nährstoffmangel kann aber auch zu einer Aktivierung der Angiogenese führen. Es kommt zur Ausbildung und Migration von Endothelzellen und Gewebe, infolgedessen Blutgefäße in den Tumor einwachsen [25]. Er erhält dadurch freien Zugang zum Blutkreislauf, was eine ausreichende Nährstoffversorgung gewährleistet und zusätzlich die Metastasenbildung ermöglicht.



**Abb. 5:** Passives Targeting von Nanopartikeln mittels EPR-Effekt, überarbeitet nach [24].

Während der Angiogenese werden ungehemmt Wachstumsfaktoren wie VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ausgeschüttet, welche maßgeblich für die Fenestrierung (Leaky Vessels) und die damit einhergehende Durchlässigkeit des Tumorgewebes verantwortlich sein sollen [26]. Da auch entzündetes bzw. arthritisches oder infektiöses Gewebe einen ähnlichen Aufbau besitzt, kann davon ausgegangen werden, dass gefäßerweiternde Faktoren die Ausbildung der durchlässigen Gewebestruktur verursachen [27, 28].

Als Folge des unkontrollierten Tumorwachstums ist die lymphatische Drainage unzureichend oder gar nicht ausgebildet. Daraus resultiert ein erschwerter Abtransport von im Tumorgewebe angereicherten Substanzen [26, 29, 30]. Die Größe der Fenestrierungen variieren je nach Tumorart zwischen 380 und 780 nm [31–33]. Gesundes Gewebe besitzt im Vergleich dazu so genannte Tight Junctions. Diese sind mit einem Durchmesser von weniger als 10 nm (meist 2–4 nm) undurchlässig für Nanopartikel [34].

Der EPR-Effekt kann zur Steigerung der Effizienz einer Behandlung bei gleichzeitiger Reduktion der Nebeneffekte ausgenutzt werden. Allerdings hängt der EPR-Effekt von vielen Faktoren, wie Molekulargewicht, Oberflächenladung, Hydrophobizität und Immunogenität des Nanopartikels sowie den Merkmalen des Tumors ab, welche bei der Entwicklung und Optimierung der Drug Carrier-Systeme berücksichtigt werden müssen [35].

Weitere Eigenschaften von Tumorgewebe sind (i) ein verändertes pH-Milieu (pH 5,8–7,8), (ii) die Überexpression von Rezeptoren (z. B. Folat-Rezeptor, Somatostatin-Rezeptor) und (iii) die erhöhte Aktivität bestimmter Enzyme (z. B. Phospholipase A2) [30, 36, 37].

### 1.1.3 Aktives Targeting

Das passive Targeting ist limitiert durch eine geringe Tumorspezifität. Durch den EPR-Effekt findet eine Interaktion hauptsächlich im fenestrierten Gewebe statt. Infolgedessen kann die Wirkstoffkonzentration im Zielgewebe zu gering ausfallen. Dieser Mangel an Spezifität kann durch Anbindung von Targeting-Vektoren an der Oberfläche des Drug Carrier-Systems kompensiert werden. Der Targeting-Vektor ist für das Erreichen des Wirkorts (Target) maßgeblich und beeinflusst somit die Pharmakokinetik des Drug Carrier-Systems. Dieser Ansatz wird als aktives Targeting bezeichnet und kann auch für die gezielte Akkumulation von niedermolekularen Verbindungen verwendet werden, indem der Wirkstoff selbst an den Targeting-Vektor gekoppelt wird (Vektor-Wirkstoff-Konjugate).

Aktives Targeting mit Drug Carrier-Systemen bietet gegenüber dem aktiven Targeting von Vektor-Wirkstoff-Konjugaten diverse Vorteile [38]:

- Transport und spezifische Akkumulation einer Vielzahl von Wirkstoffmolekülen erhöht die Wirkstoffkonzentration am Target.
- Die Modifikation des Drug Carriers-Systems mit dem Target-Vektor lässt den Wirkstoff unbeeinflusst.
- Mehrere Target-Vektoren pro Drug Carrier erhöhen die Wahrscheinlichkeit einer Vektor-Target-Interaktion.

Auch wenn das aktive Targeting die Selektivität der Akkumulation deutlich verbessert, müssen seine Nachteile beachtet werden. So kann der Drug Carrier hauptsächlich auf der Tumoroberfläche bzw. in peripheren Regionen an der Bindungsstelle des Target-Vektors verbleiben. Infolge dieses Mechanismus, „Binding Site Barrier“ genannt, mindert sich dann der therapeutische Effekt, da der Wirkstoff nicht ins Tumoriinnere eindringen kann [39, 40]. Weiterhin können voluminöse Antikörper, zusätzlich zum erhöhten hydrostatischen Druck im Tumoriinneren, die Diffusion in den Tumor erschweren [29, 41]. Ebenso von Nachteil sind allergische Reaktionen des Immunsystems auf den Antikörper. Abgesehen davon findet eine schnellere Aktivierung des retikulo-endothelialen Systems (RES) und Aufnahme von Makrophagen statt, wenn sich Antikörper auf der Partikeloberfläche befinden, deren Folge eine Verringerung der Zirkulationszeit ist [42]. Dies kann verhindert werden, indem der Drug Carrier zusätzlich mit einer auch vor Plasmaproteinen schützenden Struktur, wie einer Polyethylenglykol-Hülle (PEG), versehen wird. Diese

Hülle darf jedoch nicht den Target-Vektor in seiner Affinität zum Target beeinflussen.

Auch die Anwendungen von physikalischen Kräften oder Energien, wie Ultraschall oder Hyperthermie, von außen, führt zu einer selektiven Anreicherung von Drug Carrier-Systemen [38].

Für eine Reihe von Tumoren wurden bereits molekulare Marker identifiziert, welche als Target-Vektoren dienen können. Als Target-Vektoren können Antikörper, Peptide, aber auch kleinere organische Moleküle verwendet werden. In Tabelle 1 ist eine Auswahl von Drug Carrier-Systemen mit aktivem Targeting aufgeführt.

**Tab. 1:** Auswahl an Target-Vektoren, welche für das aktive Targeting von Drug Carrier-Systemen bisher verwendet wurden; modifiziert nach [38]

Target-Vektor	Target	Drug Carrier-Systeme
<b>Rezeptor-Liganden</b>		
Folsäure	Folatrezeptor	Liposome
Transferrin	Transferrin-Rezeptor	Liposome, Nanogel
Insulin	Insulin-Rezeptor	Magnetische Nanopartikel
<b>Antikörper/-Fragmente</b>		
Anti-HER2/-Fragmente	HER2 (oder ERBB2)-Rezeptor	Liposome
OX26 (anti-Transferrin)	Transferrin-Rezeptor	Liposome
Anti-Flk-1	VEGF-Rezeptor (Flk-1)	Lipidnanopartikel
<b>Peptide</b>		
RGD-Peptid	Zelluläre Adhäsionsmoleküle wie Integrine	Polymernanopartikel
Luteinisierendes Hormon/ Releasing Hormon	Luteinisierendes Releasing Hormon Rezeptor	Polymernanopartikel
Aptamere	Proteine, Peptide, Enzyme, Antikörper, verschiedene Rezeptoren der Zelloberfläche und kleine organische Moleküle	Polymernanopartikel

#### 1.1.4 Polymere Therapeutika

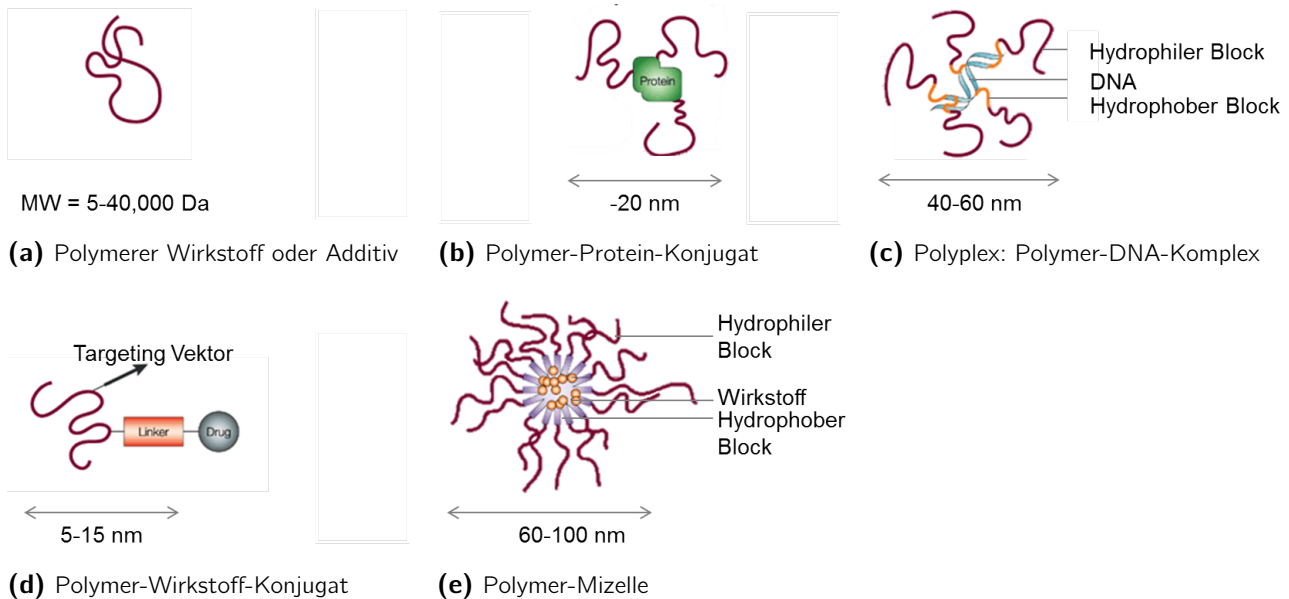
Wirkstoff-Polymer-Konjugate und andere Polymer-basierte Drug Carrier-Systeme werden unter dem Sammelbegriff „polymere Therapeutika“ zusammengefasst (Abb. 6) [43], zu denen auch supramolekulare Drug Carrier-Systeme, Polymer-Protein-Konjugate und Wirkstoff-Polymer-Konjugate gehören [44, 45].

Die Kopplung von Zytostatika an Polymere mit Hilfe spaltbarer Linker führt zu einer Steigerung des therapeutischen Index. Inzwischen sind auch selbstorganisierende Systeme, wie Polyplexe oder polymere

## 1 Einleitung

---

Mizellen, für den Transport von Wirkstoffen entwickelt worden. Als Ausgangspolymere werden natürliche Polymere wie Dextran, Heparin, Chitosan oder synthetische Polymere wie Polyethylenglykol (PEG) und Poly(N-(2-Hydroxypropyl)-Methacrylamid) (Poly(HPMA)) genutzt. Die für die Formulierung polymerer Therapeutika verwendeten synthetischen Polymere sollten biokompatibel, wasserlöslich, nicht toxisch und biologisch abbaubar oder eliminierbar sein.



**Abb. 6:** Die fünf Klassen der polymeren Therapeutika [43].

### 1.1.4.1 Polyethylenglykol (PEG)

Der positive Einfluss von PEG auf die pharmakokinetischen Eigenschaften von aktiven Molekülen oder Transportsystemen hat zu seiner weiten Verbreitung in Pharmazie und Medizin geführt. Die Verbesserung der Pharmakokinetik von Drug Carrier-Systemen ergibt sich aus der Abschirmung des Transporters gegen unspezifische Wechselwirkungen mit dem Organismus (Opsonierung), infolgedessen die frühzeitige Eliminierung verhindert und die Blutzirkulationszeit erhöht wird. Diese Abschirmung ist unter dem Begriff „Stealth-Effekt“ bekannt.

Die Verknüpfung von klinisch relevanten Proteinen oder Enzymen mit Polyethylenglycol-Einheiten (PEGylierung) führte zu zahlreichen Polymer-Wirkstoff-Konjugaten mit verbesserten pharmakologischen Eigenschaften. Das erste zugelassene Konjugat war Adagen<sup>®</sup> (Enzon Pharmaceuticals Inc. USA), eine PEGylierte bovine Adenosin-Deaminase, zur Behandlung einer Form von SCID (Severe Combined Immunodeficiency Disease). Seitdem ist eine Vielzahl von PEG-Konjugaten für die medizinische Anwendung

zugelassen worden, z. B. PEG-Intron<sup>®</sup> (Schering-Plough Corp.) oder Macugen<sup>®</sup> (Pfizer).

Obwohl bereits in den 1970er Jahren der Einfluss der PEGylierung auf die Pharmakokinetik von biologisch aktiven Molekülen untersucht wurde, begann erst in den 1990er Jahren die breite Anwendung für diverse Drug Carrier-Systeme [46]. Seitdem wurde PEG für die Modifizierung einer Vielzahl von Drug Carrier-Systemen verwendet. Er ist mittlerweile der Goldstandard für polymer-basierte Stealth Drug Carrier-Systeme und das meistverwendete Polymer in der Biomedizin.

#### **1.1.4.2 Poly(N-(2-Hydroxypropyl)-Methacrylamid) (Poly(HPMA))**

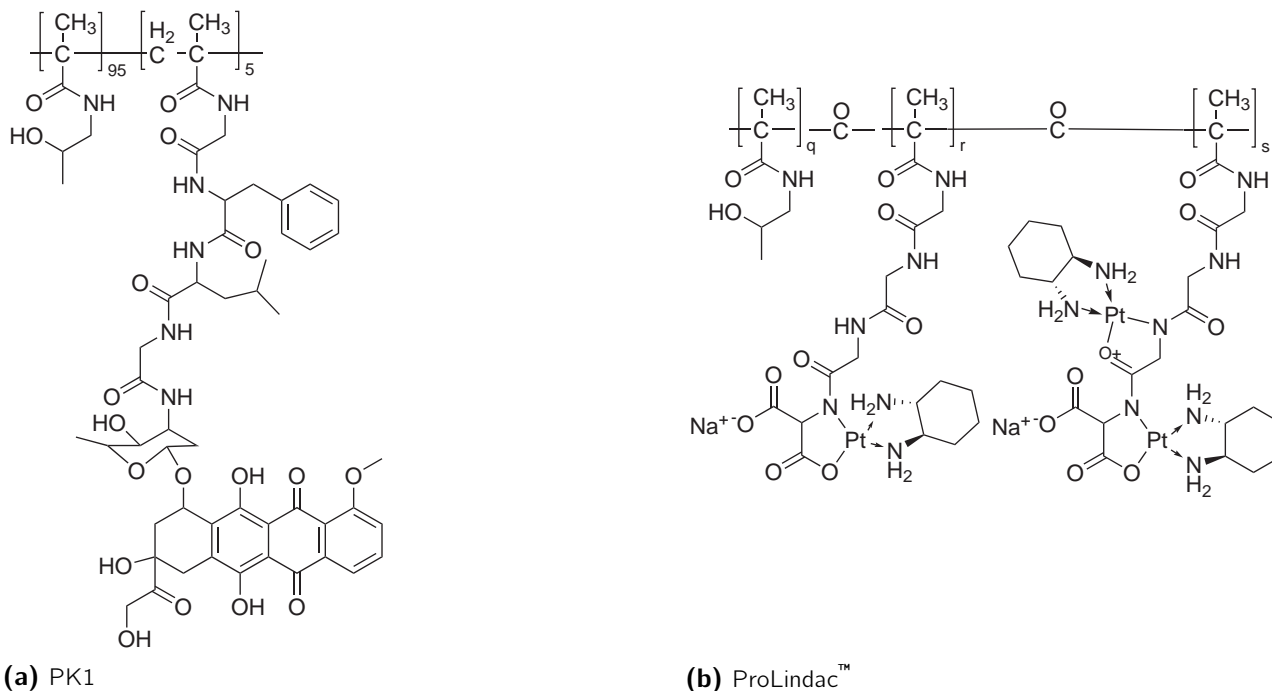
Poly(HPMA) ist gegenwärtig eines der aussichtsreichsten Biopolymere im Hinblick auf die Anwendung als Drug Delivery-System und als Alternative zu PEG. So kam bereits 1994 ein Doxorubicin-HPMA-Konjugat (PK1; FCE 28068) (Abb. 7a) als Chemotherapeutikum in die klinische Phase [47–49].

HPMA wurde aufgrund der kristallinen Beschaffenheit, der hydrolytisch stabilen Seitenketten im Polymer und seiner hydrophilen Eigenschaften ausgewählt. Erste Homo- und Copolymerisationen wurden etabliert [50–52]. In Experimenten mit Ratten zeigten Poly(HPMA) und HPMA-Copolymere keine Immunogenität, eine der wichtigsten Voraussetzungen für die Anwendung als Wirkstofftransporter [53]. Seit seiner Einführung wurden zahlreiche HPMA-Copolymer-basierte Wirkstoffkonjugate hergestellt. Einige davon befinden sich bereits in der klinischen Phase, darunter das Platinat-HPMA-Konjugat ProLindac<sup>™</sup> (AP 5346) (Abb. 7b), welches aktuell einer der aussichtsreichsten Kandidaten für die medizinische Anwendung ist [54].

Da HPMA nicht natürlich abgebaut werden kann, besteht das Risiko einer Akkumulation des Polymers im Gewebe. Da für HPMA-basierte Polymere die renale Ausscheidung nur bis 45 kDa erfolgt [55], haben die meisten klinisch angewendeten HPMA-Copolymere ein Molekulargewicht  $<40\,000\text{ g mol}^{-1}$ .

#### **1.1.4.3 Herstellung von HPMA-Polymeren mittels radikalischer Polymerisation**

Zu Beginn wurden HPMA-Copolymere mit reaktiven N-methacrylierten Funktionalitäten oder Wirkstoffen durch radikalische Fällungspolymerisation [52] oder freie Lösungscopolymerisation hergestellt [56–58].



**Abb. 7:** Struktur des HPMA-Doxorubicin-Copolymers PK1 und des Platinat-HPMA-Konjugats ProLindac™.

Generell zeichnen sich radikalische Polymerisationen durch einen Initiierungsschritt aus, bei welchem aus einem Initiator oder Radikalstarter durch thermischen oder photolytischen Zerfall freie Radikale gebildet werden. Die freien Radikale lagern sich dann in der Wachstumsreaktion an Monomermoleküle an, bis das Kettenwachstum durch Rekombination, Disproportionierung oder Kettenübertragung beendet wird. Infolge dieser Abbruchreaktionen haben die Polymere eine breite Molmassenverteilung, welche mit der Schulz-Flory-Verteilung beschrieben werden kann. Die Schulz-Flory-Verteilung ist charakteristisch für Polymerisationen mit Kettenabbruchreaktionen, wie sie in der freien radikalischen Polymerisation vorliegen. Das Verhältnis von Masse- ( $M_w$ ) und Zahlenmittel ( $M_n$ ) der Molmasse, die Polydispersität ( $PDI = M_w/M_n$ ), einer Schulz-Flory-Verteilung entspricht  $\frac{2}{1}$ . Die Verteilung der Polymere aus einer radikalischen Polymerisation wird bei höheren Umsätzen breiter und folgt nicht mehr Schulz-Flory.

Die Polydispersität der Polymere einer freien radikalischen Polymerisation ist ein entscheidender Nachteil in Hinblick auf medizinische Anwendungen, wo klar definierte Systeme mit engen Molmassenverteilungen gefragt sind. Diese kann durch den Einsatz Thiol-basierter Kettenüberträger (Chain Transfer Agent (CTA)) in gewissem Maße beeinflusst werden. Die Wahl des eingesetzten Thiols bestimmt dabei die Eigenschaften und Funktionalitäten der semitelechelen Polymere (ST-Polymer), welche reaktive funktionelle Gruppen an einem Kettenende haben [59]. Doch ist die CTA-vermittelnde Polymerisation lediglich

zur Herstellung von Poly(HPMA) mit kleinen Molmassen bei geringen Umsätzen geeignet [59].

Zugang zu engverteilten Polymeren bieten die „lebenden“ freien radikalischen Polymerisationen (LFRP) [60]. Hier wird der kinetische Verlauf der Polymerisation durch die Wahl der Reaktionsbedingungen und Additive kontrolliert. Die polymerisierenden Kettenenden bleiben solange aktiv, bis es zum kontrollierten Abbruch kommt. Für die LFRP charakteristisch ist die geringe Polydispersität der entstehenden Polymere ( $PDI < 1,5$ ), welche mathematisch mit einer Poisson-Verteilung beschrieben werden kann.

Es gibt diverse Verfahren der LFRP:

- Stabile Freie Radikalische Polymerisation (Stable Free Radical Polymerisation; SFRP).
- Atom-Transfer Radikalische Polymerisation (Atom Transfer Radical Polymerisation; ATRP).
- Reversible Additions-Fragmentierungs Kettenübertragungs Polymerisation (Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer Polymerisation; RAFT).

Je nach Methode kommen Nitroxyl-Radikale wie TEMPO (SFRP), Übergangsmetallkomplexe und Alkylhalogenide (ATRP) oder Di- und Trithioester in Kombination mit Radikalstartern zur Anwendung (RAFT). Alle drei Verfahren sind Iniferter-vermittelte Polymerisationen, wobei ein Iniferter eine Substanz ist, welche als Initiator, Kettenüberträger (Chain Transfer Agent) und Terminierungsreagenz wirken kann [61]. Für die Herstellung von HPMA sind lediglich ATRP und RAFT relevant.

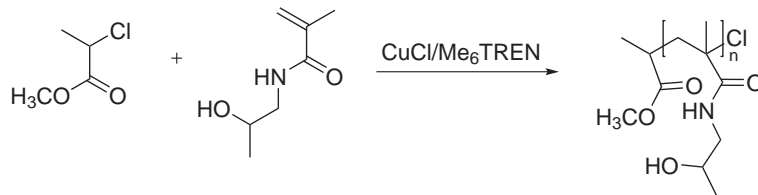
### **Darstellung der HPMA-Polymere via ATRP**

Bei der ATRP wird das Kettenwachstum über einen Übergangsmetallkatalysator kontrolliert. Dieser sorgt für ein Gleichgewicht zwischen der aktiven wachsenden und einer inaktiven (schlafenden) Polymerkette, wobei das Gleichgewicht auf der Seite der inaktiven Spezies liegt. Infolgedessen ist die Konzentration wachsender Ketten gering, wodurch unerwünschte Nebenreaktionen wie Rekombination und Kettenabbruch minimiert werden. Als Katalysator werden infolge ihrer Redox Eigenschaften, ihrer Affinität zu Halogeniden und ihres Komplexierungsvermögens meist Kupfersalze eingesetzt. ATRP-hergestellte Polymere zeichnen sich durch eine enge Molmassenverteilung und die für die ATRP charakteristische Halogenfunktionalität aus [62].

ATRP kann bei einer Vielzahl von Monomeren in Gegenwart verschiedener Funktionalitäten angewendet werden, wobei Methacrylamide, besonders HPMA, eine Ausnahme bilden. Wang und Matyjaszewski



nutzen als Katalysator einen Cu-Komplex mit Me<sub>6</sub>TREN (Tris(2-Dimethylaminoethyl)-Amin) und MCP (Methyl-2-Chlorpropionat) (Abb. 8) [63, 64].



**Abb. 8:** HPMA-Darstellung via ATRP [63, 64].

Das auf diese Weise dargestellte Poly(HPMA) hatte zwar einen geringen PDI (1,3), jedoch höhere Molmassen als theoretisch berechnet und geringe Umsätze auch nach langen Reaktionszeiten. Diese wurden mit einer Inaktivierung des Katalysators begründet, wobei der Mechanismus nicht vollständig geklärt wurde [64].

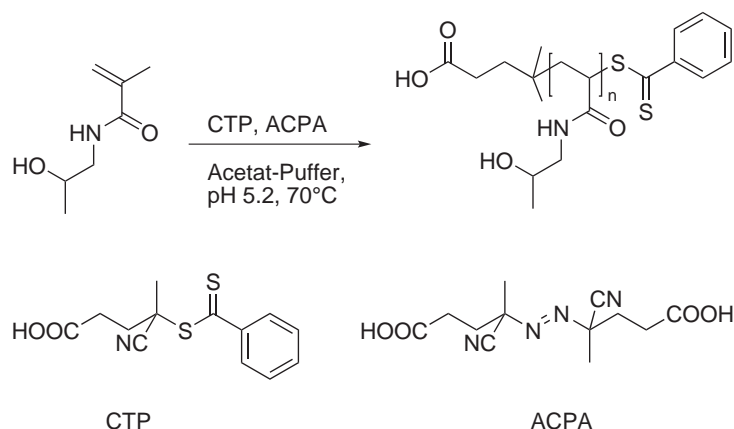
### Darstellung mit Hilfe des RAFT-Prozesses

Der RAFT-Prozess setzt reaktive Transfersubstanzen ein, die ein Gleichgewicht zwischen aktiven und inaktiven Polymerketten herstellen und dadurch das Molekulargewicht und damit die Polydispersität kontrollieren. Als Iniferter werden Dithioester, Dithiocarbamate, Xanthate oder Trithiocarbonate genutzt [65, 66]. Um den kontrollierten Ablauf zu gewährleisten, müssen bestimmte Kriterien erfüllt sein: i) die Kettenübertragung muss schnell erfolgen, ii) das entstehende Radikal muss eine gut homolytisch spaltbare Abgangsgruppe sein und zusätzlich eine neue Polymerisation initiieren können und iii) die Zahl der Polymerketten muss im Verlauf der Polymerisation konstant sein [67].

Charakteristisch für RAFT-Polymere ist die Dithio- bzw. Trithiofunktionalität und dass das Endprodukt lediglich eine inaktive Form einer Polymerkette ist, die durch erneute Zugabe von Monomer weiter umgesetzt werden kann. Die RAFT-Polymerisation ermöglicht so die Darstellung maßgeschneiderter Polymerarchitekturen wie Diblockcopolymere.

Die erste direkte HPMA-Polymerisation mit Hilfe des RAFT-Prozesses wurde mit 4-Cyanopentansäure-Dithiobenzoat (CTP) als RAFT-Reagenz und 4,4'-Azobis(4-Cyanopentansäure) (ACPA) als Initiator durchgeführt (Abb. 9) [68].

Unter diesen Bedingungen konnte ein Blockcopolymer aus HPMA und N-[3-(Dimethylamino)-Propyl]-Methacrylamid (DMAPMA) hergestellt und für die Verwendung als Carrier-System von siRNA erfolgreich angewendet werden [69–72].



**Abb. 9:** HPMA-Darstellung via RAFT [68].

Seither wurde CTP für eine Reihe von RAFT-Polymerisationen von HPMA verwendet, z. B. für die Darstellung eines Blockcopolymers aus HPMA und 2-(2-Pyridyldisulfid)-Ethylmethacrylat (PDSM), wobei die Redoxeigenschaften der PDS-Gruppe des Poly(PDSM)-Blocks für die Konjugation von Doxorubicin und für das Crosslinking der sich ausbildenden Mizellen genutzt wurden [73]. Weiterhin konnte CTP in ein bifunktionales peptidisches RAFT-Reagenz mit einer enzymatisch spaltbaren Peptidsequenz umgewandelt werden. Eine anschließende Umsetzung von HPMA in Gegenwart dieses Peptid-CTP ermöglicht den Zugang zu abbaubaren Multiblock-HPMA-Polymeren [74].

#### 1.1.4.4 Darstellung von Polymer-Wirkstoff-Konjugaten

Für die Darstellung von Polymer-Wirkstoff-Konjugaten sind grundsätzlich zwei Strategien möglich: i) die Einführung des Wirkstoffs im Verlauf der Polymerisation und ii) die Einführung des Wirkstoffs in einer polymeranalogen Reaktion [75].

Die erste Methode überführt bioaktive Moleküle durch Methacrylierung in Monomere, welche mit nicht-funktionalisierten Monomeren copolymerisieren. Dieses Vorgehen führt direkt zu den bioaktiven Polymeren, hat jedoch den Nachteil, dass die Liganden zuerst in das entsprechende Monomer überführt werden müssen. Die vorhergehende Monomersynthese bedeutet einen synthetischen Mehraufwand und mindert die Variationsmöglichkeiten. Ferner kann die Verbindung von Monomeren mit zum Teil stark unterschied-

lichen physikalisch-chemischen Eigenschaften zu Inhomogenitäten im finalen Polymer führen [75].

Die Darstellung nach der zweiten Strategie erfolgt durch eine Aktivierung des Polymer-Rückgrats mit anschließender Konjugation in einer polymeranalogen Reaktion. In einer solchen Reaktion werden Polymere chemisch modifiziert, ohne dabei den Polymerisationsgrad zu verändern. Die anschließende Modifizierung des Rückgrats bietet den Zugang zu diversen Polymer-Konjugaten. Die Anwendbarkeit der Methode wird dadurch beschränkt, dass das Rückgrat von biokompatiblen Polymeren wie Poly(HPMA) nicht problemlos modifiziert werden kann. Dies kann jedoch umgangen werden, indem reaktive Monomere mit nicht-funktionalisierten Monomeren copolymerisiert werden. Daraus resultieren biokompatible Polymere mit für die polymeranaloge Funktionalisierung geeigneten Gruppen. Diese Strategie ist variabel in Hinsicht auf die Wahl der Liganden, die Art der Aktivierung und die Beladungsdichte mit Liganden und wurde in Hinblick auf HPMA-basierte Konjugate bereits vielfach angewandt [76].

Multifunktionelle Copolymere wurden durch die Umsetzung eines Vorläuferaktivesterpolymers mit mehreren Liganden erhalten. Die HPMA-basierten Copolymere wurden ausgehend von Poly(Pentafluor-Phenylmethacrylat) durch Umsatz mit 2-Hydroxylamin für den HPMA-Anteil und entsprechenden Liganden dargestellt [77, 78].

## 1.2 Radiometalle für die nuklearmedizinische Anwendung

Die Anwendung von Radioaktivität in den Lebenswissenschaften geht zurück auf den ungarischen Chemiker Georg de Hevesy (1885–1966, Nobelpreis 1943). Bereits 1923 konnte er erfolgreich die Verwendung von Radiotracern zur Untersuchung von Stoffwechselfvorgängen in Pflanzen [79], und kurz darauf in Ratten demonstrieren [80]. Das Tracerprinzip ist von fundamentaler Bedeutung für die Untersuchung chemischer, biochemischer und pharmakologischer Prozesse und damit auch für die diagnostische Nuklearmedizin. Infolgedessen gilt de Hevesy als Vater der Nuklearmedizin.

Für die Diagnostik ist es wichtig, dass sich das Radionuklid unter Aussendung durchdringender Strahlung ( $\gamma$ -Strahlung) umwandelt, welche möglichst quantitativ detektiert werden kann. Für therapeutische Nutzung werden Partikel-emittierende Radionuklide benötigt, welche ihre Zerfallsenergie innerhalb eines relativ geringen Radius (z. B. in Tumorzellen bzw. im Tumor) abgeben.

Ein Großteil der heutzutage in der Nuklearmedizin verwendeten Radiopharmaka basieren auf Radiometallen, welche entweder kationisch (z. B.  $^{82}\text{Rb}^+$ ,  $^{201}\text{Tl}^+$ ), als Radiometallkomplexe (z. B.  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Sestamibi,  $^{67}\text{Ga}$ -Citrat) oder als targetspezifische, radiometallmarkierte Biomoleküle (z. B.  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -TRODAT) vorliegen.

### 1.2.1 Radiometalle zur Diagnostik

Die in der Nanomedizin verwendeten Drug Carrier-Systeme werden in erster Linie dafür entwickelt, den therapeutischen Index von systemisch applizierten Chemotherapeutika zu verbessern. Um die Pharmakokinetik der Drug Carrier-Systeme zu steigern, ist es sehr wichtig, auf nicht-invasivem Wege deren Zirkulationszeit und Biodistribution bestimmen zu können. Deshalb wurden bereits verschiedene Arten von Nanopartikeln sowohl mit Wirkstoffen als auch mit bildgebenden Funktionen, wie Fluoreszenzfarbstoffen oder Radionukliden, versehen.

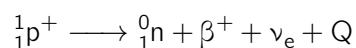
Die nicht-invasive Visualisierung und Charakterisierung von biologischen Prozessen auf molekularem oder zellulärem Level *in vivo* ist mit Hilfe der molekularen Bildgebung möglich. Ihre Bedeutung für die klinische Anwendung ist immens, erlaubt sie doch die nicht-invasive Diagnose, Therapieplanung und Therapiekontrolle einer Krankheit. Zu den in der Nuklearmedizin verwendeten Verfahren der molekularen Bildgebung zählen die planare Szintigraphie, die Einzelphotonen-Emissions-Computer-Tomographie (SPECT) und die Positronen-Emissions-Tomographie (PET).

SPECT ist die am häufigsten angewendete nuklearmedizinische, nicht-invasive Bildgebungstechnik, welche  $\gamma$ -emittierende Radionuklide mit einer  $\gamma$ -Energie zwischen 70–360 keV verwendet. Zu den in der SPECT genutzten Radionukliden gehören  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{123}\text{I}$  und  $^{201}\text{Tl}$ , wobei  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  das mit Abstand wichtigste und am weitesten verbreitete ist. Laut International Atomic Energy Association (IAEA) wird  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  in über 80 % der weltweit durchgeführten nuklearmedizinischen diagnostischen Untersuchungen genutzt. Die weite Verbreitung von  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  vor allem auf seiner guten Verfügbarkeit über den  $^{99\text{m}}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Generator und schließlich seiner Chemie, welche die Inkorporation in eine Vielzahl von Formulierungen ermöglicht. Seine Verwendung wurde durch die Entwicklung von „Kits“, welche eine schnelle, reproduzierbare Synthese in hohen Ausbeuten ermöglicht, gefördert. Diese „Kits“ enthalten bereits alle für die

Markierung benötigten Substanzen außer dem Radiometall. Um das Radiopharmakon darzustellen muss nur noch das Generatoreluat hinzugefügt und nach Synthesevorschrift verfahren werden (z. B. 30 min bei 95 °C erhitzen). Typischerweise erhält man Ausbeuten >90 %, welche für die medizinische Anwendung geeignet sind.

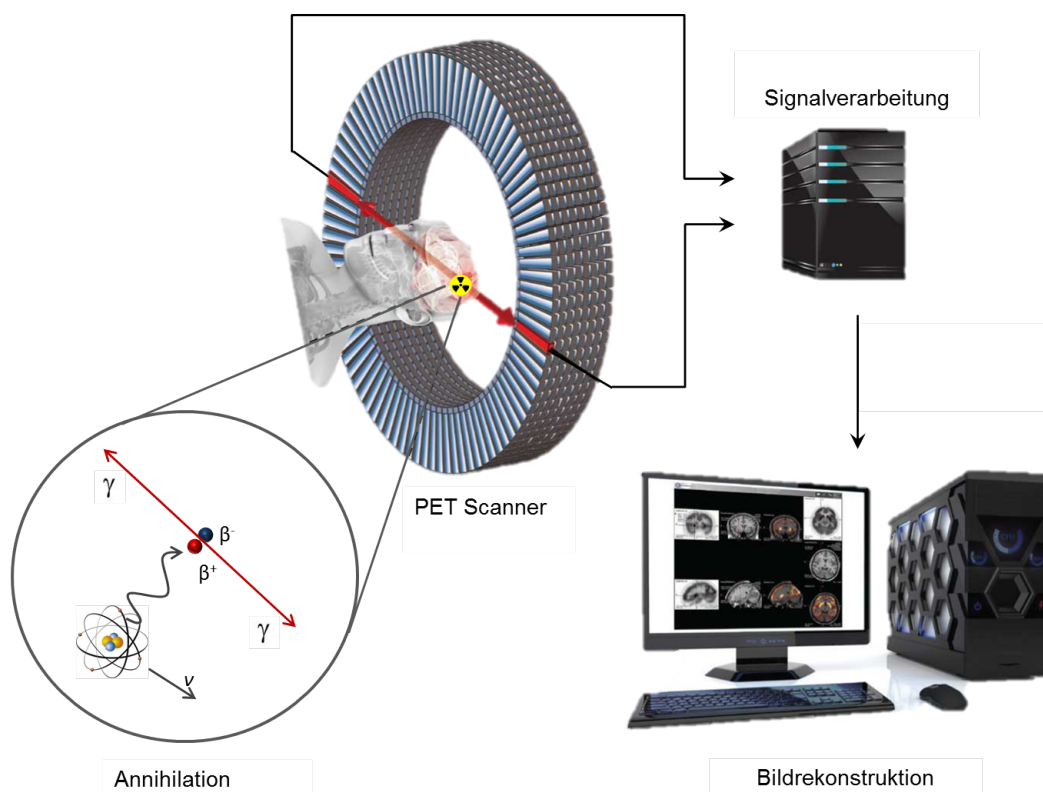
### 1.2.1.1 Positronen-Emissions-Tomographie (PET)

Die für die PET geeigneten Radionuklide sind protonenreich und stabilisieren sich durch die Umwandlung eines Protons in ein Neutron, wobei die Emission eines Positrons erfolgt: ein Proton des Kerns wird in ein Neutron und ein Positron ( $\beta^+$ -Teilchen) umgewandelt. Ein zusätzlich emittiertes Neutrino  $\nu_e$  ist für den Spinerhalt verantwortlich.



Bei der PET wird jedoch nicht das emittierte Positron, sondern die bei seiner Annihilation mit einem Elektron entstehende Annihilationsstrahlung detektiert. Bevor es zu einer Annihilation kommen kann, muss das Positron thermalisieren. Hierbei legt das Positron eine von seiner kinetischen Energie abhängige Wegstrecke zurück, auf der es durch Wechselwirkungen mit seiner Umgebung kinetische Energie abgibt, bis es zu einer Rekombination mit einem Elektron aus der Umgebung kommen kann. Intermediär kann auch ein Positronium gebildet werden, welches dann annihiliert. Die Masse des sehr kurzlebigen Positroniums ( $\tau > 10^{-7}$  s) im Singulettzustand geht dabei in zwei 511 keV  $\gamma$ -Quanten über. Diese Vernichtungsstrahlung wird in einem Winkel von ca. 180° emittiert (Abb. 10).

Die Detektion der Vernichtungsstrahlung wird nur dann als wahres Ereignis gewertet, wenn zeitgleich (innerhalb von 15–20 ns) zwei Photonen im 180° Winkel detektiert werden [81]. Um eine möglichst große Nachweiswahrscheinlichkeit zu erreichen, müssen die verwendeten Detektoren diverse Bedingungen erfüllen. Idealerweise haben sie eine hohe Quantenausbeute und eine möglichst geringe Totzeit. Mit Hilfe spezieller Computerprogramme wird aus den Detektorsignalen das Bild rekonstruiert. Im Hinblick auf den Einsatz in modernen Hybridgeräten (PET/CT oder PET/MR) ist es zusätzlich erforderlich, dass die Detektoren inklusive ihrer Elektronik auch dann verwendet werden können, wenn sie starken Magnetfeldern mit schnell wechselnden Gradienten ausgesetzt werden.



**Abb. 10:** Prinzip der PET: Positronenzerfall mit anschließender Anihilation unter Bildung zweier  $\gamma$ -Quanten von 511 keV.

Bei der PET wird nicht der Ort der Kernumwandlung, sondern der Ort der Anihilation detektiert. Daraus resultiert eine Abhängigkeit der Ortsauflösung von der maximalen  $\beta^+$ -Energie ( $\beta^{\max}$ ) und damit auch vom eingesetzten Radionuklid. Ein weiterer Faktor, der zur Ortsauflösung der PET beiträgt, ist die räumliche Anordnung der einzelnen Detektorsegmente. Hierbei spielen die räumliche Ausdehnung sowie die Distanz Anihilation-Detektor eine Rolle.

### 1.2.1.2 Generator-produzierte Positronenemitter

Die konventionell für die PET genutzten Isotope sind Fluor-18 ( $^{18}\text{F}$ ), Sauerstoff-15 ( $^{15}\text{O}$ ), Stickstoff-13 ( $^{13}\text{N}$ ) und Kohlenstoff-11 ( $^{11}\text{C}$ ). Diese können einerseits in Wirkstoffe eingebaut werden, ohne deren Pharmakokinetik zu verändern, andererseits können Prozesse mit langer biologischer Halbwertszeit aufgrund der kurzen Halbwertszeiten (20,30 min ( $^{11}\text{C}$ ); 9,96 min ( $^{13}\text{N}$ ); 2,03 min ( $^{15}\text{O}$ ); 109,65 min ( $^{18}\text{F}$ )) nicht erforscht werden. Infolge der fortlaufenden Entwicklung neuer Targeting-Vektoren (z. B. Proteine, Peptide, Antikörper oder Nanopartikel) mit denen ein breites Spektrum physiologischer Prozesse zugänglich

wird, steigt die Notwendigkeit für neue Radionuklide, deren Halbwertszeiten für die Visualisierung dieser Prozesse geeignet sind. Deshalb wurden Radiometalle mit geeigneten Zerfallseigenschaften in Hinblick auf ihre Produktion und Radiochemie untersucht, um einen breiteren Bereich biologischer Halbwertszeiten zugänglich zu machen [82].

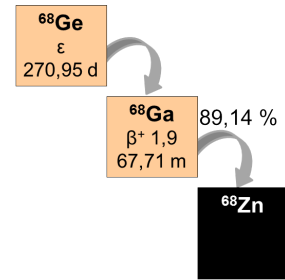
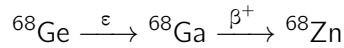
Der Großteil dieser Nuklide wird am Zyklotron produziert. Eine kostengünstigere und komfortable Alternative hierzu ist die Produktion mit Hilfe von Radionuklidgeneratoren. Diese nutzen den Zerfall eines langlebigen Mutternuklids in ein kurzlebige Tochternuklid. Nach Separation kann das entstandene Tochternuklid zur Markierung eingesetzt werden. Das prominenteste und am weitesten verbreitete Beispiel für ein solches Generatorsystem ist der  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Generator. Die für PET relevanten Generatorsysteme sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

**Tab. 2:** PET-relevante Generatorsysteme [83].

Generator	Mutter			Tochter	
	$t_{1/2}$	$t_{1/2}$	$\beta_{\text{branch}}^+$ [%]	$E_{\beta^+}$ [MeV]	Hauptanwendung
$^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$	60,00 a	3,97 h	94,27	0,632	Markierung
$^{52}\text{Fe}/^{52\text{m}}\text{Mn}$	8,28 h	21,10 min	95,0	1,170	Perfusion
$^{62}\text{Zn}/^{62}\text{Cu}$	9,26 h	9,67 min	97,43	1,314	Markierung; Perfusion
$^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$	270,95 d	67,71 min	89,14	0,830	Perfusion → Markierung
$^{72}\text{Se}/^{72}\text{As}$	8,40 d	26,00 h	87,80	1,170	Markierung
$^{82}\text{Sr}/^{82}\text{Rb}$	25,55 d	1,27 min	3,0	1,479	Markierung
$^{110}\text{Sn}/^{110\text{m}}\text{In}$	4,11 h	69,1 min	73,5	1,040	Perfusion
$^{128}\text{Ba}/^{128}\text{Cs}$	2,43 d	3,62 min	68,90	1,270	Perfusion
$^{134}\text{Ce}/^{134}\text{La}$	3,16 d	6,45 min	64,0	1,206	Perfusion
$^{140}\text{Nd}/^{140}\text{Pr}$	3,37 d	3,39 min	51,0	1,067	Perfusion

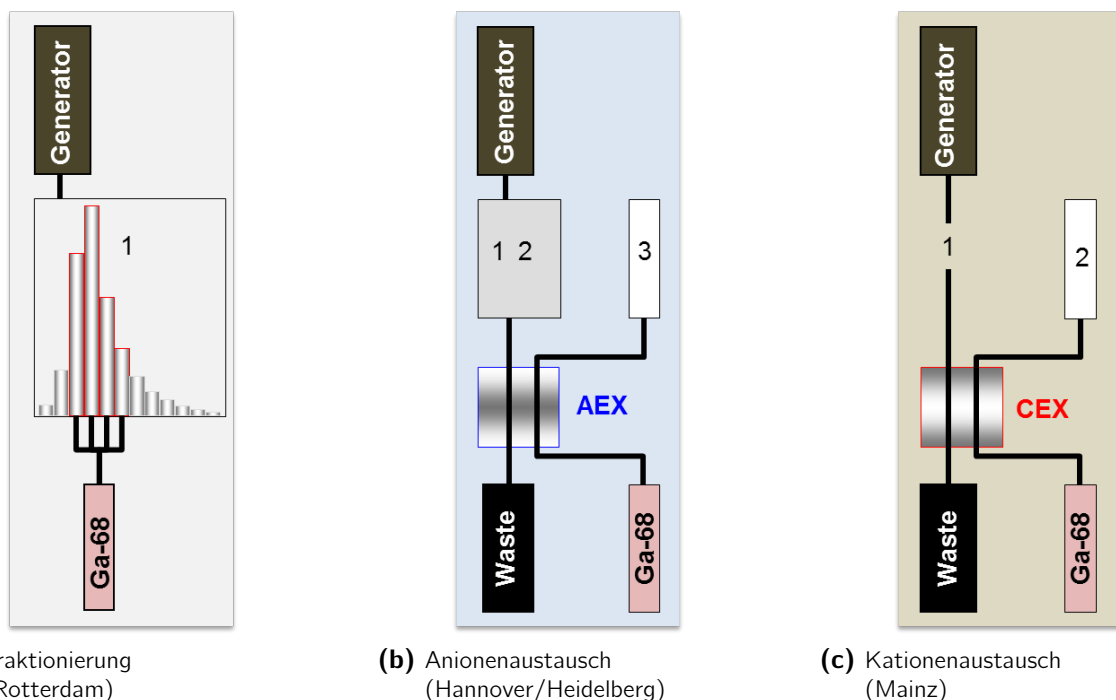
### $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generator

$^{68}\text{Ga}$  zerfällt mit einer Halbwertszeit von 67,71 min in das stabile  $^{68}\text{Zn}$  unter Aussendung eines Positrons (89,14 %), dessen Energie maximal 1,9 MeV beträgt. Das für einen  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generator verwendete Mutternuklid  $^{68}\text{Ge}$  wird in einer  $^{69}\text{Ga}(p, 2n)^{68}\text{Ge}$ -Kernreaktion bei Protonenenergien um 23 MeV hergestellt. Das  $^{68}\text{Ge}$  wird nach einer radiochemischen Abtrennung vom bestrahlten Target auf einer anorganischen oder organischen Matrix fixiert, auf der sich das Mutternuklid kontinuierlich unter Elektroneneinfang in das Tochternuklid  $^{68}\text{Ga}$  umwandelt.



Das auf der Matrix gebildete  ${}^{68}\text{Ga}$  kann mehrfach am Tag je nach Generator mit 5–10 mL 0,05–1,0 N HCl eluiert und für die Synthese von  ${}^{68}\text{Ga}$ -Radiopharmaka verwendet werden. Allerdings werden mit  ${}^{68}\text{Ga}$  auch ein gewisser Anteil  ${}^{68}\text{Ge}$  (Durchbruch) und  ${}^{68}\text{Zn}$  ebenso wie Trägermaterial eluiert. Weitere Verunreinigungen mit Fremdionen, vor allem Fe(III), werden durch die Verwendung von HCl in das Eluat eingebracht. Darüber hinaus sind das stark saure Milieu und das große Volumen des Generatoreluats in Hinblick auf die Markierung der Targeting-Vektoren mit möglichst hohen spezifischen Aktivitäten ungeeignet.

Drei Methoden finden heute Anwendung, mit denen diese Probleme minimiert werden können (Abb. 11).



**Abb. 11:** Schematische Darstellung der drei Post-Processing Methoden für  ${}^{68}\text{Ge}/{}^{68}\text{Ga}$ -Generatoren [84].



Bei der Fraktionierung (Abb. 11a) wird nur die Fraktion des Eluats mit der höchsten Volumenaktivität  $A_V(^{68}\text{Ga})$  verwendet. Zwar wird dadurch das Volumen reduziert (auf ca.  $(1,5 \pm 0,5)$  mL) und die Kontamination mit  $^{68}\text{Ge}$  minimiert, andererseits aber auch die  $^{68}\text{Ga}$ -Ausbeute reduziert. Weitere störende Fremdionen werden nicht entfernt [85].

Die zweite Methode (Abb. 11b) nutzt den Anionenaustausch. Dabei wird dem initialen Eluat konzentrierte HCl zugesetzt. In diesem stark sauren Medium bildet Gallium einen Tetrachlorokomplex, welcher anschließend auf einem starken Anionenaustauscher absorbiert wird, während andere Fremdionen schlechter oder gar nicht gebunden werden.  $\text{Ga}^{3+}$  kann mit wenig Wasser vom Anionenaustauscher eluiert werden [86]. Bei der dritten Methode (Abb. 11c) wird der Kationenaustausch genutzt. Das  $^{68}\text{Ga}$  wird auf einem starken Kationenaustauscher online absorbiert und kann mit verschiedenen Lösungen wieder eluiert werden [87, 88]. Die beiden Austauscher-basierten Methoden werden als Post-Prozessing bezeichnet und garantieren die zuverlässige Herstellung von  $^{68}\text{Ga}$ -Radiopharmaka für die medizinische Anwendung.

### **$^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ -Generator**

Der Positronenemitter  $^{44}\text{Sc}$  hat eine Halbwertszeit von 3,97 h und einen  $\beta^+$ -Anteil von 94,27 % mit einer mit  $^{18}\text{F}$  vergleichbaren Energie (632 keV). Die Produktion von  $^{44}\text{Sc}$  kann an einem Zyklotron durch die Bestrahlung von angereichertem  $^{44}\text{Ca}$  mit Protonen ( $^{44}\text{Ca}(p, n)^{44}\text{Sc}$ ) erfolgen [89]. Eine alternative Route ist die Produktion über einen Radionuklidgenerator. In den 60er und 70er Jahren wurden verschiedene Ansätze verfolgt um einen  $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ -Generator zu konstruieren, allerdings ohne pharmazeutische Aspekte zu berücksichtigen [90–92]. Ein Prototyp eines 5 mCi (185 MBq)  $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ -Generators, geeignet für radiopharmazeutische Anwendung, wurde am Institut für Kernchemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, entwickelt und in Hinsicht auf seine medizinische Anwendung evaluiert [93–95].

Das Mutternuklid  $^{44}\text{Ti}$  zerfällt mit einer Halbwertszeit von 60 Jahren via Elektroneneinfang in  $^{44}\text{Sc}$ , welches sich in das stabile Isotop  $^{44}\text{Ca}$  umwandelt. Das  $^{44}\text{Ti}$  wird über eine  $^{45}\text{Sc}(p, 2n)^{44}\text{Ti}$ -Reaktion hergestellt, aufgereinigt und auf einen Anionenaustauscher (AG 1–X8; 200–400 mesh,  $\text{Br}^-$ -Form; BioRad) aufgebracht. Die Elution des  $^{44}\text{Sc}$  erfolgt mit 20 mL 0,07 M HCl/0,005 M  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$  [93].



Infolge der langen Halbwertszeit von  ${}^{44}\text{Ti}$  kann der Generator über viele Jahre hinweg verwendet werden. Daher muss gewährleistet werden, dass theoretisch die Separationsparameter des Generators konstant bleiben. Damit die Verteilung des  ${}^{44}\text{Ti}$  auf dem Anionenaustauscher auch nach vielen Elutionen möglichst unverändert bleibt, wird der Generator im Anschluss an die  ${}^{44}\text{Sc}$ -Elution ein weiteres Mal eluiert. Diese zweite Elution verläuft in die Gegenrichtung und ist für die Lebensdauer des Generators unabdingbar [93]. Analog zu dem Kationenaustausch-basierten Post-Processing für den  ${}^{68}\text{Ge}/{}^{68}\text{Ga}$ -Generator wurde eine Aufreinigungsmethode für den  ${}^{44}\text{Ti}/{}^{44}\text{Sc}$ -Generator entwickelt [94]. Die Anwendung dieses Post-Processings minimiert Verunreinigungen mit Fremdionen, optimiert den pH-Wert und reduziert das Volumen des  ${}^{44}\text{Sc}$ -Eluats für eine folgende Markierung von Targeting-Vektoren und garantiert damit die sichere Herstellung von  ${}^{44}\text{Sc}$ -Radiopharmaka [95].

Scandiumisotope sind in der Medizin sowohl für die Therapie ( ${}^{47}\text{Sc}$ ) als auch für die Diagnostik ( ${}^{44}\text{Sc}$ ) von Interesse. Durch Kopplung an Targeting-Vektoren kann  ${}^{44}\text{Sc}$  zur Dosisabschätzung für die Therapie mit Therapienukliden wie  ${}^{90}\text{Y}$ ,  ${}^{47}\text{Sc}$  oder  ${}^{177}\text{Lu}$  verwendet werden [96]. Das Isotopenpaar  ${}^{44}\text{Sc}/{}^{47}\text{Sc}$  ist auch von Interesse für die Anwendung in der Theranostik, da  ${}^{44}\text{Sc}$  für die Diagnose mit PET und  ${}^{47}\text{Sc}$  für Therapie und Diagnose verwendet werden kann [97].

## 1.2.2 Radiometalle für die therapeutische Anwendung

Als Radionuklidtherapie oder auch Endoradiotherapie werden die nuklearmedizinischen Therapieverfahren mit systemischer Applikation des relevanten Radiopharmakons bezeichnet. Hierbei werden die Radionuklide eingesetzt, um einen therapeutischen Effekt zu erzielen. In der Endoradiotherapie werden Radionuklide verwendet, die sich unter Aussendung von Partikeln ( $\beta^-$ ,  $\alpha$ -Partikel oder Auger- bzw. Konversionselektronen) umwandeln. Der therapeutische Effekt ergibt sich aus der Schädigung des Gewebes durch die ionisierende Wirkung der emittierten Strahlung. Es ist unerlässlich, dass sich das Radiopharmakon im er-

## 1 Einleitung

---

kranken Gewebe selektiv anreichert, um die Schädigung von normalem Gewebe und die Dosisleistung für den Patienten möglichst gering zu halten. Die therapeutische Anwendung von Radionukliden wird z. B. bei chronisch-entzündlichen Gelenkerkrankungen, Schilddrüsenerkrankungen, neuroendokrinen Tumoren und der palliativen Therapie von Knochenmetastasen eingesetzt.

Bei der Auswahl eines Radionuklids für die therapeutische Anwendung müssen diverse Faktoren berücksichtigt werden [97]:

- Halbwertszeit des Radionuklids.
- Spezifische Aktivität.
- Art und Energie der emittierten Partikel.
- Kosten und Verfügbarkeit des Radionuklids.
- Art des biologischen Targets.

Die Halbwertszeit des Radionuklids ist aus zweierlei Gründen von Bedeutung. Zum einen muss sie passend zur Pharmakokinetik des Radiopharmakons gewählt werden, sodass die Dosis im normalen Gewebe minimiert und im krankhaft veränderten Gewebe maximiert werden kann. Zum anderen spielt sie auch eine Rolle bei der Verfügbarkeit. So müssen Radionuklide mit kurzer Halbwertszeit vor Ort produziert werden können, was entweder sehr kostenintensiv ist oder ein Generatorsystem voraussetzt.

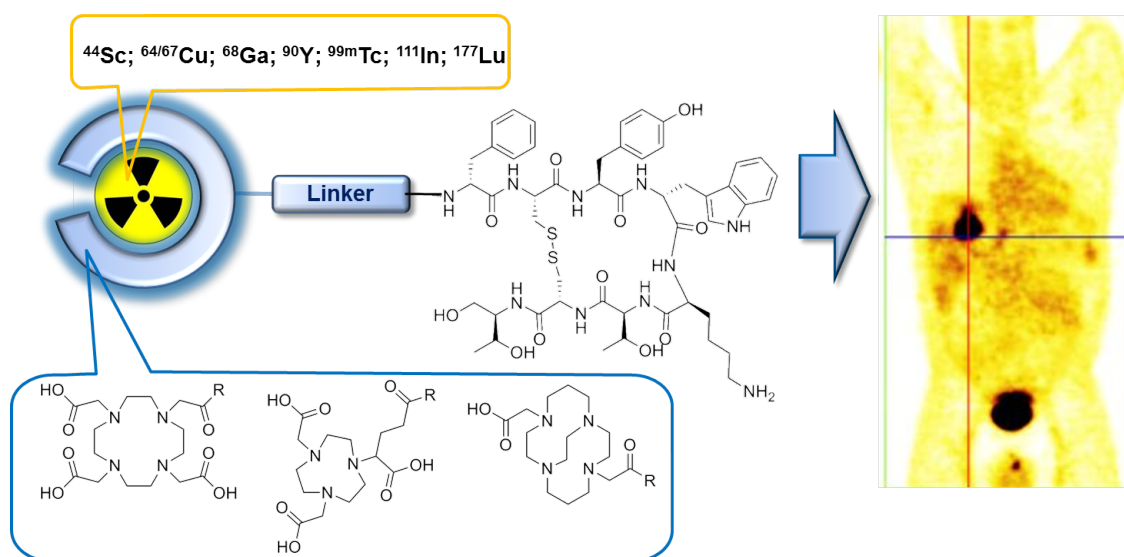
Die spezifische Aktivität ist das Verhältnis von Radioaktivität zur Masse des Radiopharmakons. Je nach Art und Häufigkeit eines Targets ist die spezifische Aktivität von Bedeutung für die Wirksamkeit eines Radiopharmakons.

Die Art und Energie der Partikelemission sollte der Größe und Morphologie des Tumors angepasst sein. Als letztes zu berücksichtigen sind die Kosten und die Verfügbarkeit des Radionuklids. So werden Nuklide mit guter Verfügbarkeit und geringen laufenden Kosten, wie Generator-produzierte, bevorzugt.

In der Nuklearmedizin verwendete therapeutische Radionuklide sind z. B.  $^{131}\text{I}$  (vor allem für die Radiojodtherapie von Schilddrüsenerkrankungen),  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{188}\text{Re}$  und  $^{169}\text{Er}$  (Radiosynoviorthese von chronisch-entzündlichen Gelenkerkrankungen),  $^{89}\text{Sr}$  (palliative Therapie von Knochenmetastasen) oder  $^{177}\text{Lu}$  (Radiopeptidtherapie neuroendokriner Tumore). Die Nuklide  $^{90}\text{Y}$  und  $^{188}\text{Re}$  sind über Radionuklidgeneratoren verfügbar.

### 1.2.3 Markierungsstrategien für Radiometalle

Ein metall-basiertes Radiopharmakon ist aus vier Teilen aufgebaut: Radiometall, Chelator, Linker und Targeting-Vektor (Abb. 12). Je nach Anwendung kann allerdings auch das reine Radiometallkation (z. B.  $^{82}\text{Rb}^+$ ,  $^{201}\text{Tl}^+$ ), ein Radiometallkomplex (z. B.  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Sestamibi,  $^{67}\text{Ga}$ -Citrat) oder ein einfaches Radiometall-Chelator-Konjugat (z. B.  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC,  $^{111}\text{In}$ -Capromab Pendetide) verwendet werden.



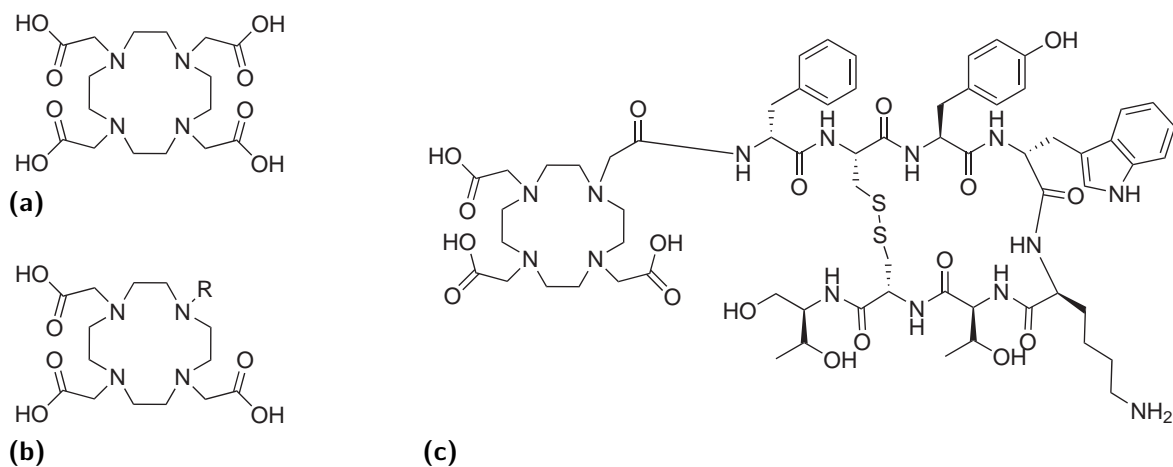
**Abb. 12:** Aufbau eines metallbasierten Radiopharmakons: ein bifunktionaler Chelator komplexiert das Radiometall und wird über einen Linker an den Targeting-Vektor gebunden, der für die spezifische Anreicherung im Zielgewebe sorgt.

Das Radiometall dient, je nach Kerneigenschaften, als diagnostische oder therapeutische Funktion.

Der bifunktionelle Chelator wird benötigt, um das Radiometall in das Radiopharmakon einzubinden. Er wird kovalent, entweder direkt oder über einen Linker an den Targeting-Vektor gebunden. Die Wahl des Chelators ist dabei stark abhängig von der Koordinationschemie des Radiometalls, welche sich signifikant von Metall zu Metall unterscheiden kann. Idealerweise komplexiert der Chelator das Radiometall mit sowohl hoher thermodynamischer als auch kinetischer Stabilität, wobei die kinetische Stabilität für *in vivo*-Anwendungen von größerer Bedeutung sein kann als die thermodynamische [98–100]. Im Allgemeinen sind azyklische Chelatoren von geringerer kinetischer Stabilität als makrozyklische Komplexe [101–105]. Andererseits erfolgt die Komplexbildung mit azyklischen Liganden schneller und teilweise unter milderen Bedingungen als mit den Makrozyklen [106–109].

Der Radiometallkomplex kann die biologischen Eigenschaften des Radiopharmakons drastisch beeinflussen. Durch Modifizierung der Koordinationssphäre des Metalls mittels Variation des Chelators oder durch

den Einsatz von Coliganden kann die Biodistribution des Radiopharmakons systematisch verändert und optimiert werden [110]. Die Forschung beschränkt sich derzeit nicht nur auf die Entwicklung neuer Chelatoren mit verbesserter Selektivität und Affinität zu den medizinisch relevanten Metallen. Vielmehr steht auch die Entwicklung neuer Derivate etablierter Chelatoren wie DTPA (Diethylenpentaessigsäure) oder DOTA (1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-Tetraessigsäure, Abb. 13a)) im Fokus, mit dem Ziel, eine schnelle und effektive Konjugation an Antikörper, Peptide [111] oder an Polymere zu ermöglichen [112–114].



**Abb. 13:** Strukturen von (a) DOTA, (b) DO3A und (c) DOTATOC.

Das Einführen eines Linkers zwischen Chelator und Targeting-Vektor ermöglicht die Einflussnahme auf die Pharmakokinetik des Radiopharmakons. Reine Kohlenwasserstoffketten erhöhen die Lipophilie, peptidische Linker die Hydrophilie und PEG-Linker reduzieren die Aufnahme in die Leber. Ziel ist, mit Hilfe einer geeigneten Linkerfunktion die Pharmakokinetik des Radiopharmakons derart zu manipulieren, dass die Aufnahme in gesundes Gewebe minimiert, die Aufnahme in Tumorgewebe dagegen maximiert wird [108, 115–117]. Des weiteren sorgt der Linker für einen gewissen Abstand zwischen Chelator und Targeting-Vektor. Dies kann notwendig sein, um zu verhindern, dass der Chelator die biologische Funktion des Targeting-Vektors einschränkt.

Mit Hilfe des Targeting-Vektors wird das biologische Verhalten des Radiopharmakons beeinflusst. Je nach Art des Targeting-Vektors ist er für eine spezifische Anreicherung im krankhaft veränderten Gewebe zuständig. Als Targeting-Vektoren können z. B. Peptide oder Antikörper verwendet werden.

## 1.3 Theranostik – Theranostics

Die Bezeichnung Theranostik (engl. Theranostics) ist ein Portmanteau-Wort und wird aus den Begriffen „**Therapie**“ und „**Diagnostik**“ zusammengesetzt [118]. In der Nuklearmedizin bezieht sich der Begriff Theranostik auf den Gebrauch von Radiopharmaka, welche entweder mit diagnostischen oder therapeutischen Radionukliden markiert sind, und sowohl für Diagnose als auch Therapie einer Erkrankung verwendet werden können [119]. Infolge der Vereinigung von therapeutischer und diagnostischer Funktion in einem Agens kann eine auf den einzelnen Patienten individuell abgestimmte Therapie erfolgen. Durch Verwendung von theranostischen Radionukliden oder Radionuklidpaaren werden beide Applikationen zugänglich bei minimaler Änderung der Pharmakokinetik. So können auch kleine Moleküle im Sinne der Theranostik verwendet werden. Ein Beispiel hierfür ist die routinemäßige Verwendung von  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC für die Diagnostik und  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC bzw.  $^{90}\text{Y}$ -DOTATOC für die Therapie von neuroendokrinen Tumoren [96].

### 1.3.1 Radiometalle für die Theranostik

Für die Theranostik sind besonders solche Radionuklide oder Radionuklidpaare (Matched Pair) interessant, deren Kerneigenschaften sowohl Diagnostik als auch Therapie ermöglichen [120]. Ihr Einsatz ist ein weiterer Schritt in Richtung individualisierter Therapie, da die elektronische Struktur und damit einhergehend die chemischen und biochemischen Eigenschaften des diagnostischen und des therapeutischen Nuklids identisch sind. Dadurch werden Dosimetrieberechnungen und Vorhersagen über die Biodistribution des Radiopharmakons im Individuum präziser und unerwünschte Nebenwirkungen der Therapie minimiert. Den optimalen Fall stellt die Verwendung eines einzigen Radionuklids oder mehrerer Isotope eines Elements für beide Applikationen dar. Allerdings sind im Falle des Radionuklidpaares viele wichtige Informationen (z. B. Langzeitdistribution) infolge der unterschiedlichen Halbwertszeiten der beiden Radionuklide, nicht verfügbar. Dessen ungeachtet kann die Anwendung der Radionuklidpaare bereits eine erhebliche Verbesserung in Bezug auf die Planung und Durchführung von Therapien für den einzelnen Patienten darstellen.

Die Strahlenbelastung in einem bestimmten Gewebe kann durch Gleichung 1 bestimmt werden.

$$\bar{D}_{t \leftarrow s} = S_{t \leftarrow s} \tilde{A}_s \quad (1)$$

## 1 Einleitung

---

$\bar{D}$  = mittlere absorbierte Dosis,  $s$  = Quellorgan;  $t$  = Zielorgan;  $S$  = mittlere absorbierte Dosis des Zielorgans, wenn die Einheitsdosis im Quellorgan homogen verteilt ist;  $\tilde{A}$  = Zeitintegral der akkumulierten Aktivität.

Für das Zeitintegral der akkumulierten Aktivität gilt:

$$\tilde{A}_s = \int A_s(t) dt \quad (2)$$

$$= \int A_s \exp[-(\lambda_{phys} + \lambda_{biol})t] dt \quad (3)$$

$A_s$  = Aktivität;  $\lambda_{phys}$  = physikalische Komponente;  $\lambda_{biol}$  = biologische Komponente.

Dieser Formalismus wurde ursprünglich von der Arbeitsgruppe Medical Internal Radiation Dose (MIRD) der Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging (SNMMI) entwickelt und besagt, dass zur Bestimmung der absorbierten Dosis im Patienten sowohl die physikalische als auch die biologische Komponente berücksichtigt werden muss. Die physikalische Komponente ist abhängig vom verwendeten Radionuklid bzw. dessen Umwandlungseigenschaften. Die biologische Komponente beinhaltet die Größe, Form und Lagebeziehungen der Organe und die Pharmakokinetik des Radiopharmakons [121].

Im Falle eines PET/Therapie-Radiopharmakons kann dessen Pharmakokinetik mit Hilfe eines adäquaten Positronenemitters vor Therapiebeginn individuell bestimmt werden [96].

$$\bar{D}_{t \leftarrow s} = \underbrace{S_{t \leftarrow s}}_{\text{MIRD:}} \int \underbrace{A_s}_{\text{PET:}} \exp[-(\lambda_{phys} + \underbrace{\lambda_{biol}}_{\text{PET:}})t] dt \quad (4)$$

MIRD: → S-Faktoren → $T_{1/2}$	PET: Aktivität im Zielorgan → (Bq/mL)	PET: Aufnahmekinetik → (Bq/mL/min)
--------------------------------------	---	--

$\bar{D}$  = mittlere absorbierte Dosis;  $s$  = Quellorgan;  $t$  = Zielorgan;  $S$  = mittlere absorbierte Dosis des Zielorgans, wenn die Einheitsdosis im Quellorgan homogen verteilt ist;  $\tilde{A}_s$  = Zeitintegral der akkumulierten Aktivität [96].

Kann weder ein einzelnes Radionuklid noch ein Radionuklidpaar für PET und Therapie verwendet werden, gilt Gleichung 4 nicht mehr. Ursache dafür ist die unterschiedliche elektronische Struktur des diagnostischen und therapeutischen Nuklids, welche dessen chemische Eigenschaften und damit auch die Pharma-

kinetik des Radiopharmakons beeinflusst. In diesem Fall wird ein weiterer Faktor eingeführt, um diese Abweichungen in den biologischen Eigenschaften der Radiopharmaka mit einzubeziehen, so wie es bereits in der Routine für 2-<sup>18</sup>Fluor-2-Desoxy-D-Glucose (<sup>18</sup>F-FDG) angewendet wird [96].

Weiterhin kann das diagnostische Radiopharmakon zur Therapiekontrolle eingesetzt werden. In Tabelle 3 werden einige in der Theranostik für PET und Therapie angewendete Radiometalle aufgezählt.

**Tab. 3:** Ausgewählte Radiometalle für die theranostische Anwendung (PET/Therapie) [96].

Therapeutisches Nuklid		Diagnostisches Nuklid			Verfügbarkeit
Nuklid	t <sub>1/2</sub>	Nuklid	t <sub>1/2</sub>	β <sub>branch</sub> <sup>+</sup> [%]	
<b>Isotopenpaare</b>					
<sup>47</sup> Sc	3,34 d	<sup>44</sup> Sc	3,93 h	94	<sup>44</sup> Ti/ <sup>47</sup> Sc
<sup>67</sup> Cu	2,58 d	<sup>62</sup> Cu	9,74 min	97	Zyklotron, <sup>62</sup> Zn/ <sup>62</sup> Cu
<sup>90</sup> Y	2,67 d	<sup>86</sup> Y	14,74 h	33	Zyklotron
<b>Nicht-isotopische Substituenten</b>					
<sup>90</sup> Y	2,67 d	<sup>68</sup> Ga	67,71 min	89	<sup>68</sup> Ge/ <sup>68</sup> Ga
<sup>153</sup> Sm	1,95 d	<sup>44</sup> Sc	3,93 min	94	<sup>44</sup> Ti/ <sup>47</sup> Sc
<sup>177</sup> Lu	6,71 d	<sup>110m</sup> In	1,15 h	62	<sup>110</sup> Sn/ <sup>110m</sup> In
<sup>213</sup> Bi	45,6 min				
<sup>225</sup> Ac	10,0 d				

Eine Reihe dieser Radiometalle sind via Generatorsysteme gut verfügbar. Die meisten dieser Generatorsysteme stehen jedoch nur einigen wenigen kernchemischen oder nuklearmedizinischen Einrichtungen zur Verfügung (z. B. <sup>44</sup>Ti/<sup>47</sup>Sc-Generator), während z. B. <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga-Generatoren bereits kommerziell erhältlich sind.



### 1.3.2 Anwendungen von Nanomaterialien in der Theranostik – Nanotheranostika

Nanomaterialien sind die ideale Basis für Theranostika. Aufgrund ihrer Partikelgröße ( $<100$  nm) sind sie in der Lage in das fenestrierte tumoröse Gewebe einzudringen, wo sie in Folge des EPR-Effekts akkumulieren. Gleichzeitig sind die Partikel zu groß, um die Tight Junctions (meist 2–4 nm) von gesundem Gewebe, aber auch die sogenannte Nierenschwelle (5–7 nm) zu überwinden. Dadurch werden die Zirkulationszeit wie auch die Bioverfügbarkeit erhöht und die Schädigung von gesundem Gewebe minimiert.

Nanotheranostika vereinen mehrere Funktionalitäten (z. B. Targeting-Vektor, Wirkstoff und Chelator), welche in der Regel jeweils nur für eine Anwendung (aktiver Wirkstofftransport, Therapie und Bildgebung) eingesetzt werden. Für Theranostika im Sinne der Nuklearmedizin ist ein angebundener Chelator bereits ausreichend, sofern er in der Lage ist, das diagnostische und das therapeutische Radionuklid stabil zu komplexieren. Durch Verwendung von theranostischen Radionukliden oder Radionuklidpaaren werden beide Applikationen zugänglich bei minimaler Änderung der Pharmakokinetik.

Die Kombination der positiven Eigenschaften von Nanopartikeln und theranostischen Radionukliden oder Radionuklidpaaren ermöglicht eine effektive, minimal-invasive Diagnostik und darauf aufbauend individualisierte Therapieplanung.

Die Unterteilung der Nanotheranostika erfolgt nach ihrem Grundgerüst in Gold-basierte, magnetische, polymere, Silica-basierte, Kohlenstoff- und Verbundnanotheranostika. Weiterhin kann man unterscheiden zwischen „klassischen“ Drug Carrier-Systemen (z. B. Polymere und Liposome) und Nanotheranostika mit intrinsischer diagnostischer Funktion (z. B. magnetische Nanopartikel). Besonders die „klassischen“ Drug Carrier-Systeme eignen sich als Basis für Nanotheranostika, da sie in ihrer Beladungsmenge nicht limitiert sind und sowohl mit diagnostischen als auch mit therapeutischen Funktionen ausreichend beladen werden können [122].

Infolge ihrer hohen Biokompatibilität, biologischen Abbaubarkeit und vor allem ihrer strukturellen Vielfalt haben polymere Materialien in der Vergangenheit eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung von Medikamenten und in jüngerer Zeit für die Applikation als Theranostika [123]. Einige Theranostika auf Polymerbasis sind in Tabelle 4 aufgeführt.

**Tab. 4:** Ausgewählte polymere Nanotheranostika [123].

Polymer	Therapeutikum	Diagnostikum	Anwendung
<b>Polymer-Konjugate</b>			
PGA	Mesochlorin e-6	Gd-DOTA	MRT/Photodynamische Therapie
HPMA	Doxorubicin	Iodine-123	$\gamma$ -Scintigrafie/Chemotherapy
<b>Nanosphären</b>			
PLGA	Doxorubicin	Eisenoxid Nanopartikel	MRT/Drug Delivery
PGA	Doxorubicin	Polyfluoren mit Oxodiazol	Fluoreszenz/Drug Delivery
<b>Polymere Mizellen</b>			
PGA-PEG	Cisplatin	Gd-DTPA	MRT/Drug Delivery
PLA-PEG	Doxorubicin	Eisenoxid	MRT/Drug Delivery
<b>Dendrimere</b>			
PAMAM	Fluoresceinisothiocyanat	Paclitaxel	Fluoreszenz/Drug Delivery

Allerdings existieren bislang nur sehr wenige systematischen Studien, um Nanotheranostika mit Radiometallen zu markieren, um wichtige Informationen über deren Pharmakologie zu erlangen.

### 1.3.3 Funktionalisierung von Polymeren mit Chelatoren

Die Funktionalisierung des Polymers mit dem Chelator kann grundsätzlich nach zwei Methoden erfolgen: i) im Verlauf der Polymerisation ii) in einer polymeranalogen Reaktion [75].

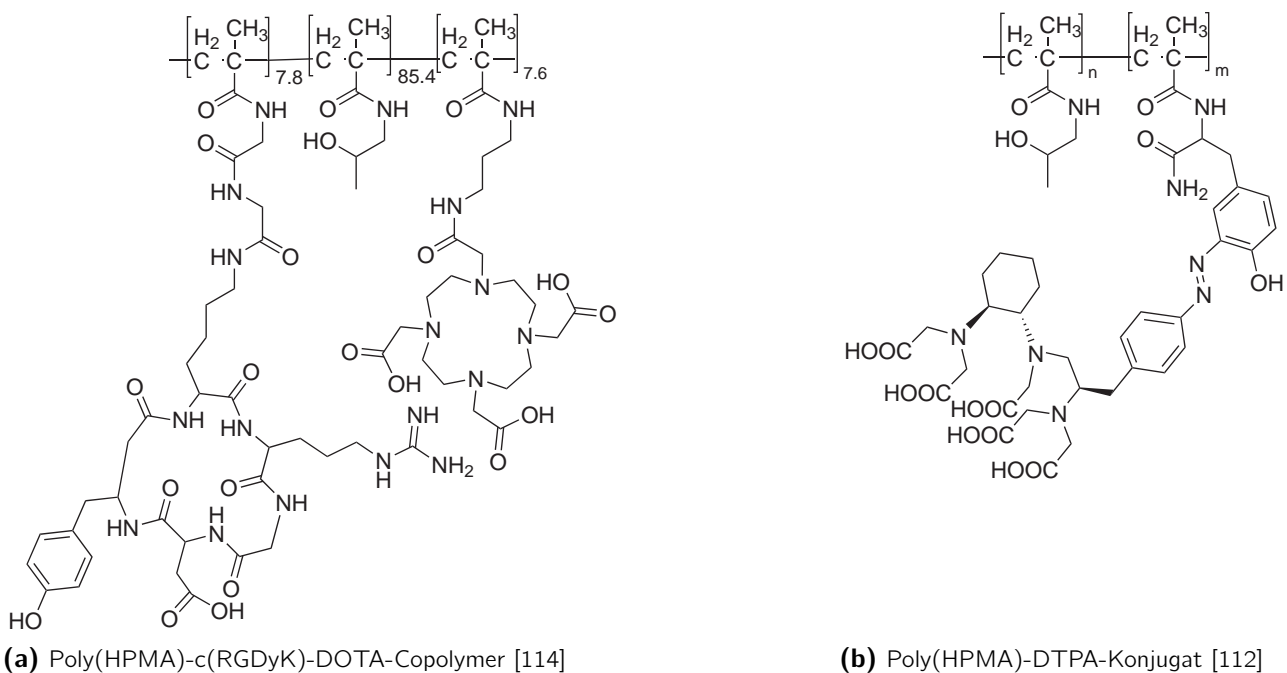
Bei der ersten Methode muss der Chelator durch Methacrylierung in ein Monomer überführt werden, welches dann mit weiteren Monomeren copolymerisieren kann. Beispiele hierfür sind die Darstellung von multivalenten Bürstenpolymeren für die diagnostische Anwendung nach Shokeen et al. [113] und die Darstellung eines theranostischen Poly(HPMA)-DOTA bzw. Poly(HPMA)-c(RGDyK)-DOTA-Copolymer (Abb. 14a) von Yuan et al. [114].

Die Funktionalisierung nach der zweiten Methode erfolgt durch eine Aktivierung des Polymer-Rückgrats mit anschließender Konjugation in einer polymeranalogen Reaktion. In einer solchen Reaktion werden Polymere nachträglich chemisch modifiziert, d. h. ohne Änderung ihres Polymerisationsgrades. Die nachträgliche Modifizierung des Rückgrats bietet den Zugang zu diversen Polymer-Konjugaten, kann jedoch für biokompatible Polymere wie Poly(HPMA) nicht problemlos angewandt werden. Durch Copolymeri-

## 1 Einleitung

---

sierung von aktivierten mit nicht-funktionalisierten Monomeren kann dieses Problem umgangen werden. Die resultierenden Polymere sind weiterhin biokompatibel, tragen aber zusätzlich für die polymeranaloge Funktionalisierung geeigneten Gruppen. Dadurch ist diese Strategie in Hinsicht auf die Wahl der Liganden, die Art der Aktivierung und die Beladungsdichte flexibler und wurde schon vielfach angewandt [76]. Beispiele für die Konjugation von Chelatoren in polymeranalogen Reaktionen sind die Poly(HPMA) bzw. Poly(NIPAA)-Konjugate von Hruby et al. mit DTPA und DOTA, welche via Azokupplung eingeführt werden (Abb. 14b) [112] oder die Sterncopolymer-DOTA-Konjugate von Fukukawa et al. [124].



**Abb. 14:** Struktur von (a) Poly(HPMA)-c(RGDyK)-DOTA-Copolymers und (b) Poly(HPMA)-DTPA-Konjugat [114, 124].

Pharmakologische Untersuchungen von Nanotheranostika nutzen aktuell alle zur Verfügung stehenden Methoden: MRT, Computer-Tomographie (CT), Ultraschall (US), optische Bildgebungsverfahren (Biolumineszenz, Fluoreszenz) und die nuklearmedizinischen Verfahren (PET, SPECT) [125, 126]. Diese Verfahren nutzen entweder intrinsische Eigenschaften der Nanopartikel oder bildgebende Funktionen mit denen diese beladen oder funktionalisiert sind. Für pharmakologische Studien mit Hilfe der nuklearmedizinischen Verfahren werden in der Regel nichtmetallische Isotope (z. B.  $^{18}\text{F}$ ) verwendet [127–129], welche kovalent eingeführt werden können. Neben den hier aufgeführten Beispielen existieren momentan jedoch nur wenige systematische Studien, welche sich mit der Radiometallmarkierung von Nanotheranostika beschäftigen.

---

## Referenzen

- [1] J. Ferlay, H. R. Shin, F. Bray, D. Forman, C. Mathers, D. Parkin, GLOBOCAN 2008 v2.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide, version 10, International Agency for Research on Cancer, **2010**, (visited on 04/23/2013).
- [2] P. Ehrlich, „Über den jetzigen Stand der Chemotherapie“, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1909**, *42*, 17–47.
- [3] K. Strebhardt, A. Ullrich, „Paul Ehrlich’s magic bullet concept: 100 years of progress“, *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 473–480.
- [4] R. Duncan, M. J. Vicent, „Polymer therapeutics-prospects for 21st century: The end of the beginning“, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 60–70.
- [5] R. Duncan, R. Gaspar, „Nanomedicine(s) under the Microscope“, *Mol. Pharmaceutics* **2011**, *8*, 2101–2141.
- [6] J. Kreuter, „Nanoparticles and microparticles for drug and vaccine delivery“, *J. Anat.* **1996**, *189*, 503–505.
- [7] D. D. Breimer, „Future challenges for drug delivery research“, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1998**, *33*, 265–268.
- [8] M. Brandl in *Biotechnology Annual Review, Vol. 7*, Elsevier, **2001**, pp. 59–85.
- [9] A. Estella-Hermoso de Mendoza, M. A. Campanero, F. Mollinedo, M. J. Blanco-Prieto, „Lipid nanomedicines for anticancer drug therapy“, *J. Biomed. Nanotechn.* **2009**, *5*, 323–343.
- [10] Y. Matsumura, T. Hamaguchi, T. Ura, K. Muro, Y. Yamada, Y. Shimada, K. Shirao, T. Okusaka, H. Ueno, M. Ikeda, N. Watanabe, „Phase I clinical trial and pharmacokinetic evaluation of NK911, a micelle-encapsulated doxorubicin“, *Br. J. Cancer* **2004**, *91*, 1775–1781.
- [11] J.-H. Lee, S.-W. Jung, I.-S. Kim, Y.-I. Jeong, Y.-H. Kim, S.-H. Kim, „Polymeric nanoparticle composed of fatty acids and poly(ethylene glycol) as a drug carrier“, *Int. J. Pharmaceutics* **2003**, *251*, 23–32.
- [12] Z. Liu, Y. Jiao, Y. Wang, C. Zhou, Z. Zhang, „Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems“, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 1650–1662.

- [13] Z. P. Xu, Q. H. Zeng, G. Q. Lu, A. B. Yu, „Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery“, *Chem. Eng. Sci.* **2006**, *61*, 1027–1040.
- [14] S. Dakhil, W. Ensminger, K. Cho, J. Niederhuber, K. Doan, R. Wheeler, „Improved regional selectivity of hepatic arterial bcnu with degradable microspheres“, *Cancer Res.* **1982**, *50*, 631–635.
- [15] T. Lammers, S. Aime, W. E. Hennink, G. Storm, F. Kiessling, „Theranostic Nanomedicine“, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 1029–1038.
- [16] H. Ringsdorf, „Structure and properties of pharmacologically active polymers“, *J. Polym. Sci.* **1975**, *51*, 135–153.
- [17] L. V. Gros, H. Ringsdorf, H. Schupp, „Polymere Antitumormittel auf molekularer und zellulärer Basis?“, *Angew. Chem.* **1981**, *93*, 311–332.
- [18] A. Fernandez-Fernandez, R. Manchanda, A. J. McGoron, „Theranostic Applications of Nanomaterials in Cancer: Drug Delivery, Image-Guided Therapy, and Multifunctional Platforms“, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2011**, *165*, 1628–1651.
- [19] S. Parveen, R. Misra, S. K. Sahoo, „Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging“, *Nanomed-Nanotechnol.* **2012**, *8*, 147–166.
- [20] A. Kumari, S. K. Yadav, S. C. Yadav, „Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems“, *Colloids Surface B* **2010**, *75*, 1–18.
- [21] B. Demirbag, S. Kardesler, A. Buyuksungur, A. Kucukturhan, G. Eke, N. Hasirci, V. Hasirci in *Bionanotechnology II. Global prospects*, pp. 228–248.
- [22] Y. Matsumura, H. Maeda, „A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs“, *Cancer Res.* **1986**, *46*, 6387–6392.
- [23] H. Maeda, Wu, J., T. Sawa, Y. Matsumura, K. Hori, „Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review“, *J. Control. Rel.* **2000**, *65*, 271–284.
- [24] D. Peer, J. M. Karp, S. Hong, O. C. Farokhzad, R. Margalit, R. Langer, „Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy“, *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 751–760.

- 
- [25] L. Brannon-Peppas, J. O. Blanchette, „Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy“, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, *56*, 1649–1659.
- [26] D. F. Baban, L. W. Seymour, „Control of tumour vascular permeability“, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1998**, *34*, 109–119.
- [27] H. Maeda, „The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: The key role of tumor selective macromolecular drug targeting“, *Adv. Enzyme Reg.* **2001**, *41*, 189–207.
- [28] H. Maeda, J. Fang, T. Inutsuka, Y. Kitamoto, „Vascular permeability enhancement in solid tumor: various factors, mechanisms involved and its implications“, *Int. Immunopharmacol.* **2003**, *3*, 319–328.
- [29] G. Barratt, „Colloidal drug carriers: Achievements and perspectives“, *Cell. Mol. Life Sci.* **2003**, *60*, 21–37.
- [30] K. R. West, S. Otto, „Reversible covalent chemistry in drug delivery“, *Curr. Drug Discov. Technol.* **2005**, *2*, 123–160.
- [31] S. K. Hobbs, W. L. Monsky, F. Yuan, W. G. Roberts, L. Griffith, V. P. Torchilin, „Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment“, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, *95*, 4607–4612.
- [32] F. Yuan, M. Dellian, D. Fukumura, „Vascular Permeability in a Human Tumor Xenograft: Molecular Size Dependence and Cutoff Size“, *Cancer Res.* **1995**, *55*, 3752–3756.
- [33] I. Brigger, C. Dubernet, P. Couvreur, „Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis“, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 631–651.
- [34] G. A. Hughes, „Nanostructure-mediated drug delivery“, *Nanomed-Nanotechnol.* **2005**, *1*, 22–30.
- [35] J. B. Hall, M. A. Dobrovolskaia, A. K. Patri, S. E. McNeil, „Characterization of nanoparticles for therapeutics“, *Nanomedicine* **2007**, *2*, 789–803.
- [36] K. K. Jain, „Nanotechnology-based drug delivery for cancer“, *Technol. Cancer Res. T.* **2005**, *4*, 407–416.
- [37] F. Marcucci, F. Lefoulon, „Active targeting with particulate drug carriers in tumor therapy: fundamentals and recent progress“, *Drug Discov. Today* **2004**, *9*, 219–228.
-

- [38] O. M. Koo, I. Rubinstein, H. Onyuksel, „Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review“, *Nanomed-Nanotechnol.* **2005**, *1*, 193–212.
- [39] W. van Osdol, K. Fujimori, J. N. Weinstein, „An Analysis of Monoclonal Antibody Distribution in Microscopic Tumor Nodules: Consequences of a "Binding Site Barrier"“, *Cancer Res.* **1991**, *51*, 4776–4784.
- [40] J. N. Weinstein, W. van Osdol, „Early Intervention in Cancer Using Monoclonal Antibodies and Other Biological Ligands: Micropharmacology and the "Binding Site Barrier"“, *Cancer Res.* **1992**, *52*, 2747–2751.
- [41] R. Krishna, L. D. Mayer, „Multidrug resistance (MDR) in cancer: Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs“, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2000**, *11*, 265–283.
- [42] J. Metselaar, E. Mastrobattista, G. Storm, „Liposomes for Intravenous Drug Targeting: Design and Applications“, *Mini-Rev. Med. Chem.* **2002**, *2*, 319–329.
- [43] R. Duncan, „The dawning era of polymer therapeutics“, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 347–360.
- [44] R. Haag, „Supramolekulare Wirkstoff-Transportsysteme auf der Basis polymerer Kern-Schale-Architekturen“, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 280–284.
- [45] R. Haag, F. Kratz, „Polymere Therapeutika: Konzepte und Anwendungen“, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 1218–1237.
- [46] K. Knop, R. Hoogenboom, D. Fischer, U. S. Schubert, „Anwendung von Poly(ethylenglycol) beim Wirkstoff-Transport: Vorteile, Nachteile und Alternativen“, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 6430–6452.
- [47] P. A. Vasey, S. B. Kaye, R. Morrison, C. Twelves, P. Wilson, R. Duncan, A. H. Thomson, L. S. Murray, T. E. Hilditch, T. Murray, S. Burtles, D. Fraier, E. Frigerido, J. Cassidy, „Phase I Clinical and Pharmacokinetic Study of PK1 [N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide Copolymer Doxorubicin]: First Member of a New Class of Chemotherapeutic Agents - Drug-Polymer Conjugates“, *Clin. Cancer Res.* **1999**, *5*, 83–94.

- 
- [48] P. M. Loadman, M. C. Bibby, J. A. Double, W. M. Al-Shakhan, R. Duncan, „Pharmacokinetics of PK1 and Doxorubicin in Experimental Colon Tumor Models with Differing Responses to PK1“, *Clin. Cancer Res.* **1999**, *5*, 3682–3688.
- [49] L. W. Seymour, D. R. Ferry, D. J. Kerr, D. Rea, M. Whitlock, R. Poyner, C. Boivin, S. Hesslewood, C. Twelves, R. Blackie, A. Schatzlein, D. Jodrell, D. Bissett, H. Calvert, M. Lind, A. Robbins, S. Burtles, R. Duncan, J. Cassidy, „Phase II studies of polymer-doxorubicin (PK1, FCE28068) in the treatment of breast, lung and colorectal cancer“, *Int. J. Oncol.* **2009**, *34*.
- [50] J. Kopecek, H. Bazilova, „Poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide]—I. Radical polymerization and copolymerization“, *Eur. Polym. J.* **1973**, *9*, 7–14.
- [51] J. Kopecek, I. Sprincl, D. Lim, „New types of synthetic infusion solutions. I. Investigation of the effect of solutions of some hydrophilic polymers on blood“, *J. Biomed. Mater. Res.* **1973**, *7*, 179–191.
- [52] J. Strohalm, J. Kopecek, „Poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide]. IV. Heterogeneous polymerization“, *Angew. Makromol. Chem.* **1978**, *70*, 109–118.
- [53] I. Sprincl, J. Exner, O. Sterba, J. Kopecek, „New types of synthetic infusion solutions. III. Elimination and retention of poly-[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide] in a test organism“, *J. Biomed. Mater. Res.* **1976**, *10*, 953–963.
- [54] D. P. Nowotnik, E. Cvitkovic, „ProLindac™ (AP5346): A review of the development of an HPMA DACH platinum Polymer Therapeutic“, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 1214–1219.
- [55] L. W. Seymour, R. Duncan, J. Strohalm, J. Kopecek, „Effect of molecular weight (Mw) of N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymers on body distribution and rate of excretion after subcutaneous, intraperitoneal, and intravenous administration to rats“, *J. Biomed. Mater. Res.* **1987**, *21*, 1341–1358.
- [56] T. Lammers, R. Kühnlein, M. Kissel, V. Subr, T. Etrych, R. Pola, M. Pechar, K. Ulbrich, G. Storm, P. Huber, P. Peschke, „Effect of physicochemical modification on the biodistribution and tumor accumulation of HPMA copolymers“, *J. Control. Rel.* **2005**, *110*, 103–118.
-



- [57] J. Drobnik, J. Kopecek, J. Labsky, P. Rejmanova, J. Exner, V. Saudek, J. Kalal, „Enzymatic cleavage of side chains of synthetic water-soluble polymers“, *Macromol. Chem. Phys.* **1976**, *177*, 2833–2848.
- [58] J. Kopecek, „Reactive copolymers of N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide with N-methacryloylated derivatives of L-leucine and L-phenylalanine, 1. Preparation, characterization, and reactions with diamines“, *Macromol. Chem. Phys.* **1977**, *178*, 2169–2183.
- [59] Z.-R. Lu, P. Kopecekova, Z. Wu, J. Kopecek, „Synthesis of semitelechelic poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide] by radical polymerization in the presence of alkyl mercaptans“, *Macromol. Chem. Phys.* **1999**, *200*, 2022–2030.
- [60] M. Szwarc, M. Levy, R. M. Milkovich, „Polymerisation initiated by electron transfer to monomer: A new method of formation block polymers“, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 2656–2657.
- [61] T. Otsu, M. Yoshida, „Role of initiator-transfer agent-terminator (iniferter) in radical polymerizations: Polymer design by organic disulfides as iniferters“, *Macromol. Chem. Rapid Commun.* **1982**, *3*, 127–132.
- [62] J.-S. Wang, K. Matyjaszewski, „Controlled "Living" Radical Polymerization. Atom Transfer Radical Polymerization in the Presence of Transition-Metal Complexes“, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5614–5615.
- [63] M. Teodorescu, K. Matyjaszewski, „Atom Transfer Radical Polymerization of (Meth)acrylamides“, *Macromolecules* **1999**, *32*, 4826–4831.
- [64] M. Teodorescu, K. Matyjaszewski, „Controlled polymerization of (meth)acrylamides by atom transfer radical polymerization“, *Macromol. Chem. Rapid Commun.* **2000**, *21*, 190–194.
- [65] J. Chiefari, Y. K. Chong, F. Ercole, J. Krstina, J. Jeffery, T. P. T. Le, R. T. A. Mayadunne, G. F. Meijs, C. L. Moad, G. Moad, E. Rizzardo, S. H. Thang, „Living Free-Radical Polymerisation by Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer: The RAFT Process“, *Macromolecules* **1998**, *31*, 5559–5562.
- [66] Y. K. Chong, T. P. T. Le, G. Moad, E. Rizzardo, S. H. Thang, „A More Versatile Route to Block Copolymers and Other Polymers of Complex Architecture by Living Radical Polymerization: The RAFT Process“, *Macromolecules* **1999**, *32*, 2071–2074.

- 
- [67] H. d. Brouwer, Technischer Universität Eindhoven, Eindhoven, **2001**, 219 pp.
- [68] C. W. Scales, Y. A. Vasilieva, A. J. Convertine, A. B. Lowe, C. L. McCormick, „Direct, Controlled Synthesis of the Nonimmunogenic, Hydrophilic Polymer, Poly( N -(2-hydroxypropyl)methacrylamide) via RAFT in Aqueous Media“, *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 1846–1850.
- [69] C. W. Scales, F. Huang, N. Li, Y. A. Vasilieva, J. Ray, A. J. Convertine, C. L. McCormick, „Corona-Stabilized Interpolyelectrolyte Complexes of siRNA with Nonimmunogenic, Hydrophilic/Cationic Block Copolymers Prepared by Aqueous RAFT Polymerization †“, *Macromolecules* **2006**, *39*, 6871–6881.
- [70] A. W. York, C. W. Scales, F. Huang, C. L. McCormick, „Facile Synthetic Procedure for  $\omega$ , Primary Amine Functionalization Directly in Water for Subsequent Fluorescent Labeling and Potential Bioconjugation of RAFT-Synthesized (Co)Polymers“, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 2337–2341.
- [71] A. W. York, F. Huang, C. L. McCormick, „Rational Design of Targeted Cancer Therapeutics through the Multiconjugation of Folate and Cleavable siRNA to RAFT-Synthesized (HPMA- s -APMA) Copolymers †“, *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 505–514.
- [72] S. Kirkland-York, Y. Zhang, A. E. Smith, A. W. York, F. Huang, C. L. McCormick, „Tailored Design of Au Nanoparticle-siRNA Carriers Utilizing Reversible Addition–Fragmentation Chain Transfer Polymers“, *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 1052–1059.
- [73] Z. Jia, L. Wong, T. P. Davis, V. Bulmus, „One-Pot Conversion of RAFT-Generated Multifunctional Block Copolymers of HPMA to Doxorubicin Conjugated Acid- and Reductant-Sensitive Crosslinked Micelles“, *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 3106–3113.
- [74] H. Pan, J. Yang, P. Kopeckova, J. Kopecek, „Backbone Degradable Multiblock N -(2-Hydroxypropyl)methacrylamide Copolymer Conjugates via Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer Polymerization and Thiol–ene Coupling Reaction“, *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 247–252.
- [75] B. Apostolovic, H.-A. Klok, „Copolymerization Behavior of N -(2-Hydroxypropyl)methacrylamide and a Methacrylated Coiled-Coil Peptide Derivative“, *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 1891–1895.
- [76] J. Kopecek, P. Kopeckova, T. Minko, Z.-R. Lu, „HPMA copolymer-anticancer drug conjugates: design, activity, and mechanism of action“, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2000**, *50*, 61–81.
-

- [77] M. Barz, M. Tarantola, K. Fischer, M. Schmidt, R. Luxenhofer, A. Janshoff, P. Theato, R. Zentel, „From Defined Reactive Diblock Copolymers to Functional HPMA-Based Self-Assembled Nanoaggregates“, *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 3114–3118.
- [78] M. Barz, F. Canal, K. Koynov, R. Zentel, M. J. Vicent, „Synthesis and In Vitro Evaluation of Defined HPMA Folate Conjugates: Influence of Aggregation on Folate Receptor (FR) Mediated Cellular Uptake“, *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 2274–2282.
- [79] G. d. Hevesy, „The Absorption and Translocation of Lead by Plants, A Contribution to the Application of the Method of Radioactive Indicators in the Investigation of the Change of Substance in Plants“, *Biochem. J.* **1923**, *17*, 439–445.
- [80] O. Chiewitz, G. d. Hevesy, „Radioactive Indicators in the Study of Phosphorus Metabolism in Rats“, *Nat. Rev. Drug Discov.* **1935**, *136*, 754–755.
- [81] H. Herzog, F. Rösch, „PET- und SPECT-Technik: Chemie und Physik der Bildgebung“, *Pharm. unserer Zeit* **2005**, *34*, 468–473.
- [82] 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.* **2010**, *110*, 2858–2902.
- [83] F. Rösch, F. F. Knapp, *Radionuclide generators: Radiochemistry and Radiopharmaceutical Chemistry in Life Sciences*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, **2003**.
- [84] F. Rösch, „Maturation of a Key Resource - The Germanium-68/Gallium-68 Generator: Development and New Insights“, *Curr. Radiopharm.* **2012**, *5*, 202–211.
- [85] W. A. P. Breeman, M. Jong, E. Blois, B. F. Bernard, M. Konijnenberg, E. P. Krenning, „Radio-labelling DOTA-peptides with  $^{68}\text{Ga}$ “, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2005**, *32*, 478–485.
- [86] G.-J. Meyer, H. Mäcke, J. Schuhmacher, W. H. Knapp, M. Hofmann, „ $^{68}\text{Ga}$ -labelled DOTA-derivatised peptide ligands“, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2004**, *31*, 1097–1104.
- [87] D. Mueller, I. Klette, R. P. Baum, M. Gottschaldt, M. K. Schultz, W. A. P. Breeman, „Simplified NaCl Based  $^{68}\text{Ga}$  Concentration and Labeling Procedure for Rapid Synthesis of  $^{68}\text{Ga}$  Radiopharmaceuticals in High Radiochemical Purity“, *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 1712–1717.

- 
- [88] 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  $^{68}\text{Ga}$  for Medical Application“, *J. Nucl. Med.* **2007**, *48*, 1741–1748.
- [89] G. W. Severin, J. W. Engle, H. F. Valdovinos, T. E. Barnhart, R. J. Nickles, „Cyclotron produced  $^{44\text{g}}\text{Sc}$  from natural calcium“, *Appl. Rad. Isot.* **2012**, *70*, 1526–1530.
- [90] M. W. Greene, M. Hillman, „A scandium generator“, *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **1967**, *18*, 540–541.
- [91] M. Y. Mirza, A. Aziz, „A scandium generator“, *Radiochim. Acta* **1969**, *11*, 43–44.
- [92] E. Seidl, K. H. Lieser, „Die Radionuklidgeneratoren  $^{113}\text{Sn}/^{113\text{m}}\text{In}$ ,  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  und  $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ “, *Radiochim. Acta* **1973**, *19*, 196–1998.
- [93] D. V. Filosofov, N. S. Loktionova, F. Rösch, „A  $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$  radionuclide generator for potential application of  $^{44}\text{Sc}$ -based PET-radiopharmaceuticals“, *Radiochim. Acta* **2010**, *98*, 149–156.
- [94] M. Pruszyński, N. Loktionova, D. Filosofov, F. Rösch, „Post-elution processing of  $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$  generator-derived  $^{44}\text{Sc}$  for clinical application“, *Appl. Rad. Isot.* **2010**, *68*, 1636–1641.
- [95] M. Pruszyński, A. Majkowska-Pilip, N. S. Loktionova, E. Eppard, F. Rösch, „Radiolabeling of DOTATOC with the long-lived positron emitter  $^{44}\text{Sc}$ “, *Appl. Rad. Isot.* **2012**, *70*, 974–979.
- [96] F. Rösch, R. P. Baum, „Generator-based PET radiopharmaceuticals for molecular imaging of tumours: on the way to THERANOSTICS“, *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 6104–6111.
- [97] C. S. Cutler, H. M. Hennkens, N. Sisay, S. Huclier-Markai, S. S. Jurisson, „Radiometals for Combined Imaging and Therapy“, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 858–883.
- [98] C. J. Anderson, M. J. Welch, „Radiometal-Labeled Agents (Non-Technetium) for Diagnostic Imaging“, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2219–2234.
- [99] L. A. Bass, M. Wang, M. J. Welch, C. J. Anderson, „In Vivo Transchelation of Copper-64 from TETA-Octreotide to Superoxide Dismutase in Rat Liver“, *Bioconjugate Chem.* **2000**, *11*, 527–532.
- [100] C. A. Boswell, X. Sun, W. Niu, G. R. Weisman, E. H. Wong, A. L. Rheingold, C. J. Anderson, „Comparative in Vivo Stability of Copper-64-Labeled Cross-Bridged and Conventional Tetraaza-macrocyclic Complexes“, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1465–1474.
-

- [101] A. Harrison, C. A. Walker, D. Parker, K. J. Jankowski, J. P. L. Cox, A. S. Craig, J. M. Sansom, N. R. A. Beeley, R. A. Boyce, L. Chaplin, M. A. W. Eaton, A. P. H. Farnsworth, K. Millar, A. T. Millican, A. M. Randall, S. K. Rhind, D. S. Secher, A. Turner, „The In Vivo Release of  $^{90}\text{Y}$  from Cyclic and Acyclic Ligand-Antibody Conjugates“, *Nucl. Med. Biol.* **1991**, *18*, 469–476.
- [102] L. Camera, S. Kinuya, K. Garmestani, C. Wu, M. W. Brechbiel, L. H. Pai, T. J. McMurry, O. A. Gansow, I. Pastan, C. H. Paik, J. A. Carrasquillo, „Evaluation of the Serum Stability and In Vivo Biodistribution of CHX-DTPA and Other Ligands for Yttrium Labeling of Monoclonal Antibodies“, *J. Nucl. Med.* **1994**, *35*, 882–889.
- [103] J. B. Stimmel, F. C. J. Kull, „Samarium-153 and Lutetium-177 Chelation Properties of Selected Macrocyclic and Acyclic Ligands“, *Nucl. Med. Biol.* **1998**, *25*, 117–125.
- [104] J. B. Stimmel, M. E. Stockstill, F. C. J. Kull, „Yttrium-90 Chelation Properties of Tetraazatetraacetic Acid Macrocycles, Diethylenetriaminepentaacetic Acid Analogues, and a Novel Terpyridine Acyclic Chelator“, *Bioconjugate Chem.* **1995**, *6*, 219–225.
- [105] J. Byegard, G. Skarnemark, M. Skalberg, „The stability of some metal EDTA, DTPA and DOTA complexes: Application as tracers in groundwater studies“, *J. Radioanalyt. Nucl. Chem.* **1999**, *241*, 281–290.
- [106] D. L. Kukis, S. J. DeNardo, G. L. DeNardo, R. T. O'Donnell, C. F. Meares, „Optimized Conditions for Chelation of Yttrium-90-DOTA Immunoconjugates“, *J. Nucl. Med.* **1998**, *39*, 2105–2110.
- [107] Y. H. Jang, M. Blanco, S. Dasgupta, D. A. Keire, J. E. Shively, W. A. Goddard, „Mechanism and Energetics for Complexation of  $^{90}\text{Y}$  with 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic Acid (DOTA), a Model for Cancer Radioimmunotherapy“, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6142–6151.
- [108] S. Liu, D. S. Edwards, „Bifunctional Chelators for Therapeutic Lanthanide Radiopharmaceuticals“, *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 7–34.
- [109] J. Moreau, E. Guillon, J.-C. Pierrard, J. Rimbault, M. Port, M. Aplincourt, „Complexing Mechanism of the Lanthanide Cations  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$ , and  $\text{Tb}^{3+}$  with 1,4,7,10-Tetrakis(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (dota)—Characterization of Three Successive Complexing Pha-

- 
- ses: Study of the Thermodynamic and Structural Properties of the Complexes by Potentiometry, Luminescence Spectroscopy, and EXAFS", *Chem.-Eur. J.* **2004**, *10*, 5218–5232.
- [110] 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.* **2010**, *110*, 2903–2920.
- [111] L. M. d. León-Rodríguez, Z. Kovacs, „The Synthesis and Chelation Chemistry of DOTA–Peptide Conjugates“, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 391–402.
- [112] M. Hruby, J. Kucka, M. Novakova, H. Mackova, M. Vetrik, „New coupling strategy for radionuclide labeling of synthetic polymers“, *Applied Radiation and Isotopes* **2010**, *68*, 334–339.
- [113] M. Shokeen, E. D. Pressly, A. Hagooley, A. Zheleznyak, N. Ramos, A. L. Fiamengo, M. J. Welch, C. J. Hawker, C. J. Anderson, „Evaluation of Multivalent, Functional Polymeric Nanoparticles for Imaging Applications“, *ACS Nano* **2011**, *5*, 738–747.
- [114] J. Yuan, H. Zhang, H. Kaur, D. Oupicky, F. Peng, „Synthesis and characterization of theranostic poly(HPMA)-c(RGDyK)-DOTA-<sup>64</sup>Cu copolymer targeting tumor angiogenesis: tumor localization visualized by positron emission tomography“, *Mol. Imaging* **2013**, *12*, 203–212.
- [115] S. Liu, „Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides“, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 1347–1370.
- [116] S. Liu, „The role of coordination chemistry in the development of target-specific radiopharmaceuticals“, *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 445.
- [117] V. Carroll, D. W. Demoin, T. J. Hoffman, S. S. Jurisson, „Inorganic chemistry in nuclear imaging and radiotherapy: current and future directions“, *Radiochim. Acta* **2012**, *100*, 653–667.
- [118] G. L. DeNardo, S. J. DeNardo, „Concepts, Consequences, and Implications of Theranosis“, *Sem. Nucl. Med.* **2012**, *42*, 147–150.
- [119] R. P. Baum, „THERANOSTICS: From Molecular Imaging Using Ga-68 Labeled Tracers and PET/CT to Personalized Radionuclide Therapy - The Bad Berka Experience“, *Theranostics* **2012**, *2*, 437–447.
-

- [120] S. C. Srivastava, „Paving the Way to Personalized Medicine: Production of Some Promising Theragnostic Radionuclides at Brookhaven National Laboratory“, *Sem. Nucl. Med.* **2012**, *42*, 151–163.
- [121] M. Lassmann, „Dosimetrie offener Radionuklide mit kurzer Reichweite“, *Nuklearmed.* **2010**, *49*, 46–49.
- [122] S. Svenson, „Theranostics: Are We There Yet?“, *Molecular Pharmaceutics* **2013**, *10*, 848–856.
- [123] Z. Wang, G. Niu, X. Chen, „Polymeric Materials for Theranostic Applications“, *Pharmaceutical Research* **2013**, DOI 10.1007/s11095-013-1103-7.
- [124] K.-i. Fukukawa, R. Rossin, A. Hagooley, E. D. Pressly, J. N. Hunt, B. W. Messmore, C. J. Hawker, „Synthesis and Characterization of Core–Shell Star Copolymers for In Vivo PET Imaging Applications“, *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 1329–1339.
- [125] Y. Liu, M. J. Welch, „Nanoparticles Labeled with Positron Emitting Nuclides: Advantages, Methods, and Applications“, *Bioconjugate Chemistry* **2012**, *23*, 671–682.
- [126] H. Cabral, N. Nishiyama, K. Kataoka, „Supramolecular Nanodevices: From Design Validation to Theranostic Nanomedicine“, *Accounts of Chemical Research* **2011**, *44*, 999–1008.
- [127] Y.-Y. Jiang, C. Liu, M.-H. Hong, S.-J. Zhu, Y.-Y. Pei, „Tumor Cell Targeting of Transferrin-PEG-TNF- $\alpha$ -Conjugate via a Receptor-Mediated Delivery System: Design, Synthesis, and Biological Evaluation“, *Bioconjugate Chemistry* **2007**, *18*, 41–49.
- [128] M. Allmeroth, D. Moderegger, B. Biesalski, K. Koynov, F. Rösch, O. Thews, R. Zentel, „Modifying the Body Distribution of HPMA-Based Copolymers by Molecular Weight and Aggregate Formation“, *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 2841–2849.
- [129] M. Hemmelmann, C. Knoth, U. Schmitt, M. Allmeroth, D. Moderegger, M. Barz, K. Koynov, C. Hiemke, F. Rösch, R. Zentel, „HPMA Based Amphiphilic Copolymers Mediate Central Nervous Effects of Domperidone“, *Macromolecular Rapid Communications* **2011**, *32*, 712–717.





## 2 Problemstellung

Im Rahmen dieser Dissertation wurde mehrere individuelle Projekte bearbeitet, welche für die Markierung von Polymer-basierten Drug Delivery-Systemen, aber auch etablierten Tracern mit Radiometallen von Bedeutung sind.

### **Aspekt Nr. 1:**

Maligne Tumore gehören zu den häufigsten Todesursachen weltweit und stellen eine erhebliche Einschränkung der Lebensqualität und der Lebensdauer für die Erkrankten dar. Für eine erfolgreiche Behandlung dieser bösartigen Geschwulste ist eine frühzeitige Diagnose, aber auch eine effektive und effiziente Therapie essentiell.

In diesem Zusammenhang sind Nanomaterialien in den Fokus der Arzneimittelentwicklung gerückt, welche, mit mehreren Funktionalitäten belegt, für Diagnostik und Therapie genutzt werden könnten. Diese Nanotheranostika sind in der Lage, die fenestrierte Gewebestruktur von Tumoren auszunutzen und dort, in Folge des EPR-Effekts, zu akkumulieren. Ergänzend zum passiven Targeting können die Partikel mit Targeting-Vektoren beladen werden, wodurch die Akkumulation im Zielgewebe weiter forciert wird. Eine Schlüsselrolle in der Entwicklung von Nanotheranostika übernehmen polymere Materialien. Diese eignen sich infolge ihrer hohen Biokompatibilität, biologischen Abbaubarkeit und strukturellen Vielfalt besonders für die Entwicklung von Theranostika.

Ein Ziel dieser Arbeit war die Darstellung von Polymer-Chelator-Konjugaten für die Anwendung als Theranostika im Sinne der Nuklearmedizin. Als Chelator wurde DOTA gewählt, welcher in der Lage ist, mit einer Vielzahl von Metallen stabile Komplexe zu bilden. Auf diese Weise wird durch den Einsatz verschiedener Radionuklide ein breites Spektrum an Anwendungsmöglichkeiten zugänglich. Als polymere Grundstruktur wurde poly(HPMA) gewählt. Wegen seiner Eigenschaften (wasserlöslich, nichttoxisch, biokompatibel) und der bereits etablierten Methodik zur Darstellung auch mehrfach funktionalisierter Polymere zählt es aktuell zu den aussichtsreichsten Polymersystemen für den Wirkstofftransport. Um die Einführung des Chelators in die Polymerstruktur zu erleichtern, wurden verschiedene Chelator-Linker-Systeme mit unterschiedlicher Linkerstruktur (Alkylketten bzw. Alkoxyketten) und -länge (1–12 C-Atome) synthetisiert und

in einer polymeranalogen Reaktion an HPMA-Homopolymere gekoppelt. Im Anschluss an die Synthese wurden die HPMA-DOTA-Konjugate mit  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{44}\text{Sc}$  und  $^{177}\text{Lu}$  markiert und *in vitro* evaluiert. Abschließend sollten die Konjugate mit der höchsten Stabilität *in vivo* evaluiert werden.

### **Aspekt Nr. 2:**

Für die Anwendung neuer Tracer in der klinischen Routine sind erfolgreiche *in vitro* und *in vivo* Evaluationen nicht ausreichend. Infolge der gesetzlichen Bestimmungen müssen Radiopharmaka weitere Kriterien erfüllen. Radiopharmaka werden definiert als „Arzneimittel, die in verwendungsfertiger Form ein oder mehrere Radionuklide zu medizinischen Zwecken enthalten“ [1], wobei es sich sowohl um Radiodiagnostika als auch um Radiotherapeutika handeln kann. Damit unterliegen sie, ebenso wie Markierungsbestecke, Generatoren oder radioaktive Vorstufen, dem Arzneimittelgesetz (AMG). Sie müssen die gleichen Qualitätskriterien wie herkömmliche Arzneistoffe erfüllen, welche durch physikalische (Nuklidreinheit, spezifische Aktivität, optische Reinheit), chemische (chemische und radiochemische Reinheit, Lösemittelfreiheit, Stabilität, pH-Wert) und biologische Tests (Sterilität, Pyrogenfreiheit) kontrolliert werden. Für Generator-basierte Nuklide, wie z. B.  $^{68}\text{Ga}$  oder  $^{44}\text{Sc}$ , bedeutet das, dass das Eluat bestimmte Spezifikationen (Elutionsausbeute, Durchbruch des Mutternuklids, Gehalt an Fremdionen, pH-Wert etc.) erfüllen muss, um für die Darstellung von Radiopharmaka verwendet werden zu können. Das eluierte Radionuklid muss im wesentlichen frei von metallischen Verunreinigungen sein, da diese sich negativ auf die radiochemische Ausbeute, aber auch auf die biomedizinischen Messinstrumente auswirken können.

Derzeit werden für  $^{68}\text{Ga}$  drei verschiedene Methoden angewendet, um den Gehalt an metallischen Verunreinigungen, den pH-Wert sowie das Volumen des Eluats zu minimieren. Eine davon ist das von Zheronkov et al. beschriebene Aceton-basierte Post-Processing mittels Kationenaustauscher [2], welches eine hohe Elutionsausbeute an  $^{68}\text{Ga}$  bei gleichzeitiger Minimierung der metallischen Verunreinigungen des pH-Wertes und des Volumens garantiert. Nach Aufreinigung des Eluats nach dieser Methode liegt  $^{68}\text{Ga}$  als  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  in 400  $\mu\text{L}$  einer Lösung aus 97,56 % Aceton und 0,05 M HCl vor, welche direkt für die Markierung von funktionalisierten Target-Vektoren genutzt werden kann [2, 3]. Für die Routineanwendung ist der Acetonanteil in der Markierungslösung jedoch von Nachteil. Zum einen ist eine zusätzliche Bestimmung des Acetongehalts im Produkt notwendig, zum anderen ist Aceton nicht geeignet, um die Radiolyse des Radiopharmakons zu verhindern.

Ein weiteres Teilprojekt dieser Arbeit beschäftigte sich daher mit der Substitution des Acetons durch ein geeigneteres Lösungsmittel sowie der Optimierung und Evaluierung der Methode in Hinsicht auf ihre Anwendbarkeit in der Routine. Als Lösungsmittel wurde Ethanol gewählt, welches bereits regulär in der Medizin eingesetzt wird, um z. B. die Löslichkeit von Medikamenten zu erhöhen. Ebenso wird es in der Radiopharmazie als Schutz vor Radiolyse durch Ionisation, aber auch zur Steigerung der Ausbeute bei Radiometallmarkierungen verwendet.

### **Aspekt Nr. 3:**

Ist die Synthese eines Radiopharmakons abgeschlossen, muss im Rahmen der Qualitätskontrolle die Radionuklidreinheit, also das Verhältnis der Aktivität des gewünschten Nuklids zur Gesamtaktivität, bestimmt werden. Für  $^{68}\text{Ga}$ -Radiopharmaka bedeutet das in erster Linie, dass der Gehalt des langlebigen Mutternuklids  $^{68}\text{Ge}$  quantifiziert werden muss. Aufgrund seiner Zerfallseigenschaften kann  $^{68}\text{Ge}$  radiochemisch ausschließlich indirekt über den Zerfall seines Tochternuklids  $^{68}\text{Ga}$  detektiert werden. Infolgedessen ist es nicht möglich, kleinste Mengen  $^{68}\text{Ge}$  in einem Überschuss  $^{68}\text{Ga}$   $\gamma$ -spektroskopisch nachzuweisen. Die Quantifizierung kann erst nach Abklingen der  $^{68}\text{Ga}$ -Aktivität (Dauer ca. 2 Tage) erfolgen. Im Hinblick auf die klinische Anwendung der Radiopharmaka ist genau das allerdings ein Problem, schließlich wird ein wichtiges Qualitätskriterium erst nach Freigabe bzw. Applikation des Medikaments geprüft.

Ein weiteres Teilprojekt befasste sich daher mit der Entwicklung und Evaluierung einer Methode, welche die Quantifizierung des  $^{68}\text{Ge}$ -Gehalts in  $^{68}\text{Ga}$ -Radiopharmaka ohne lange Abklingzeiten und folglich noch vor Applikation ermöglicht. Die Methode basiert auf der quantitativen Separation von  $^{68}\text{Ge}$  und  $^{68}\text{Ga}$ , welche durch Modifikation des von Zhernosekov et al. beschriebenen Kationenaustausch-basierten Post-Prozessings erfolgt [2]. Nach der Trennung liegt  $^{68}\text{Ge}$  frei von  $^{68}\text{Ga}$  in der Abfallfraktion vor und kann direkt auf verschiedenen Wegen bestimmt werden. Für die klinische Anwendung bedeutet das, dass bereits vor Freigabe/Applikation der maximal mögliche  $^{68}\text{Ge}$ -Gehalt des Radiopharmakons bestimmt werden kann.

### **Aspekt Nr. 4:**

$^{68}\text{Ga}$  hat in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung in der Forschung, aber auch in der klinischen Routine gewonnen. Neben seinen Nuklideigenschaften ( $t_{1/2} = 67,71 \text{ min}$ ;  $\beta^+$ -Anteil = 89,14 %;

$E_{\beta^+, \max} = 1,9 \text{ MeV}$ ) ist besonders seine Zyklotron-unabhängige Produktion über ein  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generatorsystem für seine stetig zunehmende Verbreitung verantwortlich. Die kurze physikalische Halbwertszeit von  $^{68}\text{Ga}$  ist jedoch nicht geeignet, um physiologische Prozesse mit langer biologischer Halbwertszeit zu verfolgen, wie sie durch die Entwicklung neuer Targeting-Vektoren (Peptide, Proteine, Antikörper, Nanopartikel) zugänglich werden. In diesem Zusammenhang ist das  $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ -Generatorsystem aufgrund der Halbwertszeit (3,97 h) und hohen Positronenausbeute (94,27 %) des Tochternuklids  $^{44}\text{Sc}$  von Interesse.

Bevor  $^{44}\text{Sc}$  jedoch für die Markierung neuer Radiopharmaka verwendet werden kann, ist es wichtig, zuerst das Potential des Nuklids für die PET an einer bereits etablierten Modellverbindung nachzuweisen. Der erste Schritt hierzu ist die Markierung der Modellverbindung mit  $^{44}\text{Sc}$  und deren Optimierung. Anschließend muss evaluiert werden, ob das  $^{44}\text{Sc}$ -Radiopharmakon hinsichtlich seiner Stabilität geeignet ist für *in vivo* Langzeitstudien. Mit dieser Fragestellung beschäftigte sich ein weiteres Teilprojekt der vorliegenden Arbeit. Als Modellverbindung wurde das Peptid DOTATOC verwendet. Dieses findet bereits Anwendung für die Diagnose ( $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC) und Therapie ( $^{90}\text{Y}$ -/ $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC) von Somatostatin-Rezeptor-positiven Tumoren in der Klinik.

Die hier beschriebenen Aufgaben wurden als individuelle Projekte bearbeitet, welche in Form von Publikationen abgeschlossen sind und im folgenden Kapitel behandelt werden.

## Referenzen

- [1] European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare, The European Pharmacopoeia, (Ed.: European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare), version 7.8, **2013**.
- [2] 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  $^{68}\text{Ga}$  for Medical Application“, *J. Nucl. Med.* **2007**, 48, 1741–1748.
- [3] M. Asti, G. d. 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  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC“, *Nucl. Med. Biol.* **2008**, 35, 721–724.

### 3 Manuskripte

Die vorliegende Arbeit basiert auf folgenden Manuskripten:

(I) Elisabeth Eppard, Mareli Allmeroth, Rudolf Zentel, Frank Rösch:

*Labeling of HPMA-based polymer-conjugates with metallic radionuclides for theranostic applications.* in Vorbereitung

(II) Elisabeth Eppard, Michael Wuttke, Philipp L. Nicodemus, Frank Rösch:

*Ethanol-based post-processing of generator derived  $^{68}\text{Ge}$  towards kit-type preparation of  $^{68}\text{Ga}$ -radiopharmaceuticals.* Journal of Nuclear Medicine, submitted

(III) Elisabeth Eppard, Natalia S. Loktionova, Frank Rösch:

*Quantitative online isolation of  $^{68}\text{Ge}$  from  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generator eluates for purification and immediate quality control of breakthrough.* Applied Radiation and Isotopes, 82 (2013) 45–49

(IV) Elisabeth Eppard, Natalia S. Loktionova, Frank Rösch:

*Quality control of  $^{68}\text{Ge}$  content in  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generator eluates and  $^{68}\text{Ga}$ -radiopharmaceuticals – a protocol for the determination the  $^{68}\text{Ge}$  content using thin-layer chromatography.* Applied Radiation and Isotopes, submitted

(V) Marek Pruszynski, Agnieszka Majakowska-Pilip, Natalia S. Loktionova, Elisabeth Eppard, Frank Rösch:

*Radiolabeling of DOTATOC with the long-lived positron emitter  $^{44}\text{Sc}$ .* Applied Radiation and Isotopes, 70 (2012) 974–979

### **3.1 Labeling of HPMA-based polymer-conjugates with metallic radionuclides for theranostic application**

# **Labeling of HPMA-based polymer-conjugates with metallic radionuclides for theranostic application**

**Elisabeth Eppard<sup>1</sup>, Mareli Allmeroth<sup>2</sup>, Rudolf Zentel<sup>2</sup>, Frank Rösch<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Institute of Nuclear Chemistry, Johannes Gutenberg-University of Mainz,  
Fritz-Strassmann-Weg 2, D-55 128 Mainz, Germany

<sup>2</sup>Institute of Organic Chemistry, Johannes Gutenberg-University of Mainz,  
Duesbergweg 10–14, D-55 128 Mainz, Germany

**Abstract**

Lack of selectivity, manifested as a narrow therapeutic index, is one of the major problems facing conventional anticancer agents currently used for chemotherapy. In this context nanomaterials have moved in the focus as anti-cancer agent carrier systems. The potential of nanomaterials arises from EPR effect, which is the ability of certain particle sizes (<100 nm) to invade and be retained within tumor tissue. Of further benefit, nanoparticles offer a means to combine diagnostic imaging agents and therapeutic agents within a single formulation. In contrast, nanotheranostics can combine several functionalities (targeting vector, therapeutic agent and diagnostic agent) in a single formulation. Theranostics in general has a number of advantages; most notably it minimizes invasive diagnosis and permits tailor-made treatment planning.

N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide (HPMA) was first investigated in the early 1970's as a drug delivery system, and has been successfully used for the delivery of a variety of drugs, including doxorubicin. The conjugation of several ligands to reactive ester functionalized HPMA leads to multifunctionalized co-polymers which can be used for theranostic applications.

A novel series of HPMA-linker-DOTA conjugates have been synthesized and characterized which show variation in the extent of DOTA incorporation and nature of the linker. Conjugates were labeled with  $^{68}\text{Ga}$  (using two different post-processing methods),  $^{44}\text{Sc}$  and  $^{177}\text{Lu}$  revealing a dependence of labeling efficiency on DOTA incorporation and nature of the linker (length and structure). Stability of the  $^{68}\text{Ga}$  labeled conjugates has been evaluated in the presence 0.9% NaCl, human serum, metal cations and chelators (DTPA, EDTA).

Keywords: HPMA-conjugates; theranostic;  $^{68}\text{Ga}$ ; EPR-effect; PET



## Introduction

Lack of selectivity, manifested as a narrow therapeutic index, is one of the major problems facing conventional anticancer agents currently used for chemotherapy. The majority of these agents, such as doxorubicin and cis-platin, are of low molecular weight ( $<800 \text{ g mol}^{-1}$ ). Cell proliferation (growth) is inhibited by affecting DNA duplication and cell division, and as a result cellular discrimination is based on the rate of cellular proliferation. As a result these agents are not selective for cancer cells, but rather have a higher affinity for cells which display a higher rate of cellular proliferation. In order to improve the therapeutic index of these agents increased accumulation at the target site is required.

In this context nanomaterials have moved in the focus as anti-cancer agent carrier systems. The potential of nanomaterials to improve selectivity arises from EPR (enhanced permeability and retention) effect, which is the ability of certain particle sizes ( $<100 \text{ nm}$ ) to invade and be retained within tumor tissue. The selectivity over healthy tissue arises from the fact that the nanoparticles are too large to enter the spaces between healthy tissue (typically  $2\text{--}4 \text{ nm}$ ) and the renal threshold ( $5\text{--}7 \text{ nm}$ ). The overall effect is to increase circulation time and bioavailability, whilst minimizing healthy tissue affection.

Of further benefit, nanoparticles offer a means to combine diagnostic imaging agents and therapeutic agents within a single formulation. In nuclear medicine, a bifunctional chelator may be used in theranostic applications provided that the chelator is able to stabilize both diagnostic ( $^{68}\text{Ga}$ ) and therapeutic ( $^{177}\text{Lu}$ ) radionuclides. Preferably theranostic radionuclides, or radionuclide pairs, are used such that alteration of pharmacokinetics is minimized. In contrast, nanotheranostics can combine several functionalities (targeting vector, therapeutic agent and diagnostic agent) in a single formulation. Theranostics in general has a number of advantages; most notably it minimizes invasive diagnosis and permits tailor-made treatment planning.

Various hydrophilic polymers have been investigated in anti-cancer application. They have been used to modify proteins, liposomes, the surfaces of biomaterials and acts as carrier systems for anti-cancer agents to improve the pharmacokinetics. N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide (HPMA) was first investigated in the early 1970's as a drug delivery system whose localization was mediated by the EPR effect. Numerous detailed studies have shown the relationship between structure and biocompatibility of hydrophilic polymers [1–7]. HPMA-based copolymers are favoured due to their hydrophilic nature, biocompatibility and non-immunogenicity [8, 9].

HPMA-copolymer-conjugates have been successfully used for the delivery of a variety of drugs, including doxorubicin [10], paclitaxel [11] and camptothecin [12]. Modification of HPMA can be achieved through the use of activated co-monomers leading to give biocompatible polymers possessing functionalities which allow for further polymer construction. This strategy has been employed in numerous studies and is favored as it permits flexibility in the choice of ligands, type of activation and occupancy rate [13]. The conjugation of several ligands to reactive ester functionalized polymers leads to multifunctionalized copolymers which can be used for theranostic applications.

$^{68}\text{Ga}$  is a positron emitter (89 %) with a half-life of 67.71 min and average positron energy of 1.899 MeV. Its half-life is adequate to allow the preparation and purification of  $^{68}\text{Ga}$ -labeled radiopharmaceuticals and subsequent imaging of biological processes with short half-life. The major advantage of  $^{68}\text{Ga}$  is its availability via  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generator system, which affords a cyclotron independent and cost-effective source of the isotope. The  $^{68}\text{Ga}$  is eluted with 5 mL 0.1 N HCl providing  $^{68}\text{GaCl}_3$  as labeling species. Another metallic radionuclide suitable for PET imaging is  $^{44}\text{Sc}$  (94 %), which can be produced via a cyclotron or a  $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ -generator system developed at JGU Mainz [14]. Due to its longer physical half-life of 3.92 h,  $^{44}\text{Sc}$  is suitable for tracking processes with longer biological half-lives which cannot be followed with  $^{68}\text{Ga}$  or even  $^{18}\text{F}$ . In this context  $^{44}\text{Sc}$  could be used for therapeutic planning, dosimetric calculations in endoradiotherapy and for direct matching of  $\beta^-$ -emitting  $^{47}\text{Sc}$  radiopharmaceuticals [15]. The  $^{44}\text{Sc}/^{47}\text{Sc}$  matched pair could permit coordinated dosimetric PET imaging and therapy similar to that described for the  $^{62}\text{Cu}/^{67}\text{Cu}$  and  $^{86}\text{Y}/^{90}\text{Y}$  matched pairs. In spite of these favorable characteristics the wider acceptance and application of the generator systems (for both  $^{68}\text{Ga}$  and  $^{44}\text{Sc}$ ) suffers from a number of limitations, including a high eluent volume, low pH, breakthrough of the long-living parent radionuclides and other metal based impurities. To overcome these problems several purification and preconcentration methods have been developed for the  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generator [16–20] and one analog to the cation-exchange based method for the  $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ -generator [21].  $^{177}\text{Lu}$  emits both  $\beta^-$  (average energy 133.1 keV) and gamma radiation (113.0 and 208.4 keV), and can therefore be used for therapy and SPECT imaging, but not PET imaging. It is receiving increasing attention for clinical applications for receptor targeted radionuclide therapy using peptide (PRRT) functionalized chelators such as DOTATOC.

In the present study, we aimed to synthesize theranostic HPMA-conjugated DOTA copolymers with alkyl- and alkoxy-linkers for cancer PET imaging and therapy following labeling with metallo-radionuclides.

Functionalization the HPMA based polymer with DOTA allows for the introduction of several imaging and therapeutic nuclides (Gd;  $^{44}\text{Sc}$ ;  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{111}\text{In}$ ;  $^{177}\text{Lu}$ ;  $^{90}\text{Y}$ ) and hence its utilization in several applications (MRI, PET, SPECT and therapy). The primary objective was to assess the influence that linker structure has on the labeling kinetics, and subsequent stability of the label. Of further interest was whether other radionuclides could be used to radiolabel the HPMA-based co-polymer. Initially the synthesized co-polymers were labeled with  $^{68}\text{Ga}$ , and the influence of labeling parameters (incubation time, amount of educt, temperature, solvent composition) evaluated. The stability of the  $^{68}\text{Ga}$ -labeled conjugates was evaluated in 0.9 % NaCl and human serum (HSA), and through challenge experiments using various metal cations and chelators (EDTA and DTPA).

## Experimental

### Chemicals and equipment

All chemicals were analytical or pure reagent grade and used as received unless otherwise stated. ( $^t\text{Bu}$ )<sub>3</sub>-DOTA was obtained from CheMatech (Dijon, Graz). All other organic and inorganic reagents were purchased from Sigma-Aldrich and Acros Organics. Deionized Milli-Q water (18.2 M $\Omega$  cm; Millipore) was used for all no radiochemical procedures. Dioxane was distilled over a sodium/potassium composition. Lauryl methacrylate was distilled to remove the stabilizer and stored at  $-18^\circ\text{C}$  prior to use. 2,2'-Azo-bis-(isobutyronitrile) (AIBN) was recrystallized from diethyl ether and stored at  $-18^\circ\text{C}$  prior to use.

$^1\text{H}$ -NMR spectra were obtained using a Bruker AC 300 spectrometer at 300 MHz,  $^{19}\text{F}$ -NMR analyses were carried out on a Bruker DRX-400 at 400 MHz. All measurements were performed at room temperature. The synthesized polymers were dried *in vacuo* overnight at  $40^\circ\text{C}$ , followed by Gel Permeation Chromatography (GPC). GPC was performed using tetrahydrofuran (THF) as solvent and the following equipment: PU 1580 peristaltic pump, AS 1555 autosampler, UV 1575 UV detector and Jasco RI 1530 RI detector and a Wyatt miniDAWN Tristar light scattering detector. The following MZ Analysentechnik columns (300 mm  $\times$  8.0 mm) were used for purification: MZ-Gel SDplus 106  $\text{\AA}$  5  $\mu\text{m}$ , MZ-Gel SDplus 104  $\text{\AA}$  5  $\mu\text{m}$  and MZ-Gel SDplus 102  $\text{\AA}$  5  $\mu\text{m}$ . A flow rate of 1 mL min $^{-1}$  and temperature of  $25^\circ\text{C}$  were used in all cases. GPC data was evaluated using the PSS WinGPC Unity software package (Polymer Standard Service Mainz, Germany).

Commercial 1.100 MBq generators, based on  $\text{TiO}_2$  stationary-phase on which  $^{68}\text{Ge}(\text{IV})$  absorbed, were

obtained from Cyclotron Co. Ltd (Obninsk, Russia). Typically, batch activities of 80–300 MBq were used.  $^{44}\text{Sc}$  was obtained from a  $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ -generator system developed and constructed at Institute of Nuclear Chemistry, JGU Mainz [14]. Batch activities of 165–180 MBq were used.  $^{177}\text{Lu}$  was obtained from ITG (Munich, Germany) and used without further purification. Batch activities of approximately 30 MBq were used. Activity counting was determined using a borehole counter (Nuklear-Medizintechnik Dresden GmbH, Germany).

Thin-layer chromatography (TLC) was performed using silica-gel (silica-gel 60 F254; MERCK, Darmstadt, Germany) coated aluminium TLC-sheets and analyzed using a flatbed instant imager (Instant Imager<sup>®</sup>, Packard Canberra, Schwadorf, Austria). The cation exchange resins AG 50W-X8 (–400 mesh), AG 50W-X4 (200–400 mesh) and AG 50W-X8 (200–400 mesh) were obtained from BioRad (Munich, Germany). Strata-X mini-C-18 cartridges were obtained from Phenomenex (Aschaffenburg, Germany). HiTrap<sup>™</sup> Desalting Columns were purchased from GE-Healthcare Europe GmbH (Freiburg, Germany). TraceSelect water (Sigma-Aldrich, Germany) was used for all aqueous radiolabeling solutions.

## Synthesis of HPMA-DOTA-conjugates

### Benzyl-phenyl-carbonate (6)

Phenylmethanol (0.64 mol, 69.21 g) and pyridine (0.79 mol, 64 mL) were added to dichloromethane (175 mL) and stirred at room temperature for 1 h, after which phenylchloroformate (0.64 mol, 100.21 g) was added dropwise. The reaction mixture was stirred for 3 h at 25 °C, and water (250 mL) added. The organic layer was removed and subsequently washed with aqueous sulfuric acid (2 M, 2x 250 mL) and then solvent removed under reduced pressure. The excess phenylmethanol was removed and the product dried *in vacuo* to afford a white solid.

yield = 98 %.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 300 MHz):  $\delta$  [ppm] 5.28 (s, 2H); 7.18–7.28 (m, 3H); 7.36–7.46 (m, 7H). MS (ESI)  $m/z$  (% rel. Int) = 229.30  $[\text{M-H}]^+$ , 251.35  $[\text{M-Na}]^+$ .

### General method for mono-Cbz-protection of unprotected alkanediamines

Benzyl-phenyl-carbonate (5 mmol, 1.141 g) in ethanol (5 mL) was added dropwise over a period of 1 h to a solution of the  $\alpha,\omega$ -diamine (5 mmol) in ethanol (25 mL) at 0 °C. The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 d, and the solvent removed under reduced pressure. The residue was re-

dissolved in water (25 mL) and the pH adjusted to 3 with 4 N HCl. This aqueous phase was washed with dichloromethane (3x 50 mL), and the pH adjusted to 11 using 2 N NaOH. The alkaline aqueous phase was extracted using dichloromethane (3x 80 mL). Organic phase were combined, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and the solvent removed under reduced pressure. The residue was dried *in vacuo* to afford the product as white solid.

#### **Benzyl-2-aminoethylcarbamate (7)**

yield = 85 %. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>; 300 MHz): δ [ppm] 1.43 (s, 2H); 2.75–2.79 (t, 2H); 3.17–3.21 (m, 2H); 5.08 (s, 2H); 5.44 (bs, 1H); 7.28–7.34 (m, 5H). MS (ESI) m/z (% rel. Int) = 195.11 [M-H]<sup>+</sup>, 217.10 [M-Na]<sup>+</sup>.

#### **Benzyl-6-aminoethylcarbamate (8)**

yield = 67 %. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>; 300 MHz): δ [ppm] 1.25 (s, 2H); 1.32–1.50 (m, 8H); 2.65–2.69 (t, 2H); 3.15–3.20 (m, 2H); 5.09 (s, 2H); 5.44 (bs, 1H); 7.32–7.37 (m, 5H). MS (ESI) m/z (% rel. Int) = 251.17 [M-H]<sup>+</sup>, 274.20 [M-Na]<sup>+</sup>.

#### **Benzyl-12-aminododecylcarbamate (9)**

yield = 50 %. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>; 300 MHz): δ [ppm] 1.25 (s, 16H); 1.40–1.50 (m, 4H); 2.67–2.72 (t, 2H); 3.15–3.22 (m, 2H); 5.09 (s, 2H); 5.44 (bs, 1H); 7.33–7.37 (m, 5H). MS (ESI) m/z (% rel. Int) = 335.26 [M-H]<sup>+</sup>, 357.26 [M-Na]<sup>+</sup>.

#### **General method for mono-Cbz-protection of unprotected alkoxydiamines**

α,ω-Alkoxydiamine (20 mmol) and Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (19 mmol, 2 g) were added to chloroform (50 mL), and cooled to 0 °C. To this solution Cbz-Cl (10 mmol, 1.612 g) was added dropwise over 2 h. The mixture was stirred for a further 2 h at 0 °C, and then 1 d at room temperature. The solvent was removed under reduced pressure, the residue re-dissolved in water (25 mL) and pH was adjusted to 3 using 4 N HCl. The mixture was washed with dichloromethane (3x 50 mL). The pH of the aqueous phase adjusted to 11 using 2 N NaOH, and extracted with dichloromethane (3x 80 mL). The organic fractions were combined, dried over Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and solvent removed under reduced pressure. The residue was dried *in vacuo* to afford the product as a white solid.

**Benzyl-2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethylcarbamate (10)**

yield = 47 %. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>; 300 MHz): δ [ppm] 1.53 (s, 2H); 2.78–2.81 (t, 2H); 3.32–3.37 (m, 2H); 3.43–3.49 (m, 6H); 3.50–3.59 (m, 6H); 5.06 (s, 2H); 7.28–7.32 (m, 5H). MS (ESI) m/z (% rel. Int) = 283.12 [M-H]<sup>+</sup>, 305.14 [M-Na]<sup>+</sup>.

**Benzyl-3-(4-(3-aminopropoxy)butoxy)propylcarbamate (11)**

yield = 36 %. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>; 300 MHz): δ [ppm] 1.56–1.67 (m, 8H); 2.74–2.76 (m, 2H); 3.22–3.29 (m, 2H); 3.36–3.45 (m, 10H); 5.05 (s, 2H); 7.27–7.32 (m, 5H). MS (ESI) m/z (% rel. Int) = 339.20 [M-H]<sup>+</sup>, 361.24 [M-Na]<sup>+</sup>.

**General method for coupling of mono-Cbz-protected spacers to (<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub>-DOTA**

(<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub>-DOTA (0.035 mmol, 20 mg), mono-Cbz-protected amine (0.052 mmol) and TMP (0.08 mmol, 9 mg) were dissolved in NMP (5 mL) and cooled to 0 °C. COMU (0.055 mmol; 23.5 mg) dissolved in NMP (2 mL), was added dropwise to the mixture and stirred 15 min at 0 °C, followed by 2 h at room temperature. The mixture was diluted with ethyl acetate (20 mL) and washed with hydrochloric acid (0.1 N, 20 mL), NaHCO<sub>3</sub> (conc, 20 mL) and brine (20 mL). The organic phase was dried over Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and solvent removed under reduced pressure. The residue was dried *in vacuo* to afford the product as colorless oil.

**<sup>t</sup>Butyl-2,2',2''-(10-(2-(2-(benzoyloxycarbonylamino)ethylamino)-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetate (12)**

yield = 75 %. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>; 300 MHz): δ [ppm] 1.45 (s, 27H); 1.63 (s, 8H); 2.50–3.50 (bm, 20H); 5.06 (s, 2H); 7.31–7.35 (m, 5H). MS (ESI) m/z (% rel. Int) = 749.48 [M-H]<sup>+</sup>, 771.36 [M-Na]<sup>+</sup>.

**<sup>t</sup>Butyl-2,2',2''-(10-(2-(6-(benzoyloxycarbonylamino)hexylamino)-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetate (13)**

yield = 72 %. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>; 300 MHz): δ [ppm] 1.15–1.30 (m, 10H); 1.33–1.53 (s, 27H); 1.98 (s, 2H); 2.32–3.24 (bm, 24H); 5.07 (s, 2H); 7.26–7.35 (m, 5H). MS (ESI) m/z (% rel. Int) = 805.58 [M-H]<sup>+</sup>, 827.44 [M-Na]<sup>+</sup>.

**<sup>t</sup>Butyl-2,2',2''-(10-(2-(12-(benzoyloxycarbonylamino)dodecylamino)-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetate (14)**

yield = 66 %. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>; 300 MHz): δ [ppm] 1.24–1.35 (m, 37H), 2.00–2.99 (s, 16H), 3.15–3.73 (bm, 10H), 5.05 (s, 2H), 7.28–7.39 (m, 5H). MS (ESI) m/z (% rel. Int) = 889.64 [M-H]<sup>+</sup>, 911.59 [M-Na]<sup>+</sup>.

**<sup>t</sup>Butyl-2,2',2''-(10-(3,14-dioxo-1-phenyl-2,8,10-trioxa-4,13-diazapentadecan-15-yl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetate (15)**

yield = 70 %. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>; 300 MHz): δ [ppm] 1.24–1.35 (m, 37H), 2.00–2.99 (s, 16H), 3.15–3.73 (bm, 10H), 5.05 (s, 2H), 7.28–7.39 (m, 5H). MS (ESI) m/z (% rel. Int) = 837.58 [M-H]<sup>+</sup>, 859.50 [M-Na]<sup>+</sup>.

**<sup>t</sup>Butyl-2,2',2''-(10-(3,18-dioxo-1-phenyl-2,8,13-trioxa-4,17-diazanondec-19-yl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetate (16)**

yield = 79 %. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>; 300 MHz): δ [ppm] 1.24–1.30 (m, 10H); 1.40–1.49 (s, 27H); 1.52–1.61 (m, 4H); 1.66–1.79 (m, 4H); 2.20–2.99 (s, 16H); 3.15–3.73 (bm, 20H); 5.05 (s, 2H); 7.28–7.39 (m, 5H). MS (ESI) m/z (% rel. Int) = 893.52 [M-H]<sup>+</sup>, 915.55 [M-Na]<sup>+</sup>.

**General method for hydrogenation**

Pd/C (30 mg) and the precursor **12–16** (0.06 mmol) added to THF:MeOH (1:1, 5 mL) and stirred for 4 h at room temperature under an H<sub>2</sub>-atmosphere. The mixture was filtered through Celite<sup>®</sup>, the solvent removed under reduced pressure and the residue dried *in vacuo* to afford the product as a colorless oil.

**<sup>t</sup>Butyl-2,2',2''-(10-(2-(2-ethylamino)-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetate (17)**

yield = 96 %. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>; 300 MHz): δ [ppm] 1.45 (s, 27H); 1.63 (s, 8H); 2.50–3.50 (bm, 20H).

**<sup>t</sup>Butyl-2,2',2''-(10-(2-(6-aminohexylamino)-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetate (18)**

yield = 97 %. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>; 300 MHz): δ [ppm] 1.15–1.30 (m, 10H); 1.33–1.53 (s, 27H); 1.98 (s,

2H); 2.32–3.24 (bm, 24H).

**<sup>t</sup>Butyl-2,2',2''-(10-(2-(12-aminododecylamino)-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetate (19)**

yield = 93 %. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>; 300 MHz): δ [ppm] 1.24–1.35 (m, 37H); 2.00–2.99 (s, 16H); 3.15–3.73 (bm, 10H).

**<sup>t</sup>Butyl-2,2',2''-(10-(2-(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethylamino)-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetate (20)**

yield = 96 %. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>; 300 MHz): δ [ppm] 1.24–1.35 (m, 37H); 2.00–2.99 (s, 16H); 3.15–3.73 (bm, 10H).

**<sup>t</sup>Butyl-2,2',2''-(10-(2-(3-(4-(3-aminopropoxy)butoxy)propylamino)-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetate (21)**

yield = 94 %. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>; 300 MHz): δ [ppm] 1.24–1.30 (m, 10H); 1.40–1.49 (s, 27H); 1.52–1.61 (m, 4H); 1.66–1.79 (m, 4H); 2.20–2.99 (s, 16H); 3.15–3.73 (bm, 20H).

**4-Cyano-4-((thiobenzoyl)sulfanyl)pentanoic acid (CTP) (22)**

CTP was used as chain transfer agent (CTA) and synthesized according to a literature procedure [22].

**Pentafluorophenyl methacrylate (PFPMA) (23)**

PFPMA was prepared according to a literature procedure [23].

**Synthesis of reactive ester homopolymers (macro-CTA) (24)**

RAFT polymerization of pentafluorophenyl methacrylate with 4-cyano-4-((thiobenzoyl)sulfanyl)pentanoic acid was carried out using Schlenk tube techniques [24, 25]. PFPMA (16 mmol, 4 g) was dissolved in absolute dioxane (5 mL), to which CTP and AIBN were added in molar ratio of 1:8. After three freeze–vacuum–thaw cycles, the mixture was heated to 65 °C using oil bath and stirred overnight. The polymeric solution was precipitated in hexane (3x), centrifuged and the combined solid dried *in vacuo* at 40 °C overnight to afford a light pink powder.



yield = 52 %.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 300 MHz):  $\delta$  [ppm] 1.20–1.75 (br); 2.00–2.75 (br s).  $^{19}\text{F-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz):  $\delta$  [ppm] –162.03 (br); –156.92 (br); –152–150 (br).

### **Cleavage of dithioester terminal groups (25)**

The dithiobenzoate endgroup was removed according to a literature procedure [26]. Briefly, a 25-fold molar excess of AIBN was added to the polymer dissolved in dioxane. The reaction progress was monitored for cleavage of the dithioester terminal groups using UV-Vis spectroscopy. After  $\sim 4$  h of heating at  $70^\circ\text{C}$ , the polymer was precipitated in hexane (2x) and the solid collected after centrifugation. The polymer was dried *in vacuo* overnight to afford a colorless powder.

yield = 75 %.

### **Polymeranalogous reaction of homopolymers**

Poly(PFPMA) (180 mg) homopolymer was dissolved in absolute dioxane (2 mL). The relevant DOTA-spacer **12–16** (0.11 mmol) and triethylamine (0.11 mmol, 11 mg) were dissolved in absolute DMSO and added to the vessel. The solution was stirred 36 h at  $45^\circ\text{C}$ , before 2-hydroxypropylamine (0.6 mmol, 45 mg) and  $\text{Et}_3\text{N}$  (0.6 mmol, 61 mg) were added, and the solution stirred for further 48 h. An additional batch of 2-hydroxypropylamine (0.6 mmol, 45 mg) was then added. The solution was finally prepared in a DMSO/water mixture for dialysis. After lyophilization a white, crystalline powder could be obtained.

yield = 51 %.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ ; 400 MHz):  $\delta$  [ppm] 0.60–1.40 (br); 1.35–1.45 (s); 1.45–2.20 (br); 2.75–3.10 (br); 3.50–3.80 (br); 4.60–4.80 (br).

### **General method for deprotection of homopolymers**

The polymer was dissolved in acetonitrile and TFA added (1:1). This solution was stirred 4 h at room temperature. For purification dialysis over 2 d was used. Lyophilization afforded the product as white powder.

yield = 89 %.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ ; 400 MHz):  $\delta$  [ppm] 0.60–1.40 (br); 1.45–2.20 (br); 2.75–3.10 (br); 3.50–3.80 (br); 4.60–4.80 (br). In the case of **32**, it was not possible to recover the product from the dialysis tube.

## Radiochemistry

### **$^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generator elution and post-processing**

The  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generator was eluted using 0.1 N HCl (5 mL) and the eluate passed through a microcolumn containing a cation exchange resin. The  $^{68}\text{Ga}$  was post-processed following a literature procedure [18, 20], and the resulting solutions used for further labeling studies.

### **$^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ -generator elution and post-processing**

$^{44}\text{Sc}$  was eluted with a 0.005 M  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4/0.07$  M HCl solution (20 mL). The eluate was directly post-processed following a literature procedure [21], and the resulting solution used for further labeling studies.

### **Labeling with $^{68}\text{Ga}$**

Labeling of DOTA-conjugated HPMA-homopolymers was performed by mixing aliquots of polymer stock-solution (1 mg/mL in water) with post-processed  $^{68}\text{Ga}$  eluate. The reaction time and amount of conjugate **31** added was varied to establish the optimal conditions, which were applied for the labeling reactions of other conjugates. Acetone post-processed eluate (400  $\mu\text{L}$ ) was added to water (4.6 mL) containing polymer conjugate, and the reaction mixture agitated in a heating block at 95  $^\circ\text{C}$ . To evaluate unspecific labeling of the conjugates HPMA homopolymer without DOTA-functionalization was performed under the same conditions. Labeling was also evaluated using ethanol-method post-processed eluate for conjugates **33–35**. Ethanol-method post-processed  $^{68}\text{Ga}$  (1 mL) was added to 1 M NaHEPES buffer (3 mL) containing polymer, and the reaction mixture was agitated in a heating block at 95  $^\circ\text{C}$ .

### **Labeling with $^{44}\text{Sc}$**

DOTA-conjugated HPMA-homopolymers (20 nmol) were labeled with post-processed  $^{44}\text{Sc}$  eluate (3 mL) following agitation in a heating block at 95  $^\circ\text{C}$  for 30 min.

### **Labeling with $^{177}\text{Lu}$**

$^{177}\text{Lu}$  (100  $\mu\text{L}$ ) was added to the relevant DOTA-conjugated HPMA-homopolymer (20 nmol) in 0.1 M sodium acetate buffer (250  $\mu\text{L}$ , pH 8), and the reaction mixture agitated on a heating block at 95  $^\circ\text{C}$  for 30 min. The ratio polymer to  $^{177}\text{Lu}$  was 10:1.

### **Purification of the labeled conjugates**

The radiolabeled polymeric systems were separated from un-complexed radiometal by Sephadex G-25 size exclusion chromatography (HiTrap™ Desalting Column, Sephadex G-25 Superfine; 0.9 % NaCl; flow rate: 0.5 mL/min) leading to a pure, labeled polymer solution ready for subsequent experiments.

### **Quality control**

Quality control of complex formation was performed by radio-thin-layer chromatography (radio-TLC). The silica TLC plates were developed with 0.1 M citric buffer (pH 4). Quantitative distribution of radioactivity on TLC plates was measured using a flatbed instant imager.

### **Stability studies**

Stability studies were performed with  $^{68}\text{Ga}$ -labeled polymers of radiochemical purity >98 %. Stability studies were performed by addition of the purified labeled polymer (50  $\mu\text{L}$ ) to pre-warmed NaCl (500  $\mu\text{L}$ , 0.9 %) or human serum (500  $\mu\text{L}$ ). Solutions were incubated for 2 h at 37 °C.

Stability of  $^{68}\text{Ga}$ -labeled polymers was also evaluated in the presence of different metal cations ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) at concentration levels of  $10^{-2}$  M each. Purified labeled polymers (50  $\mu\text{L}$ ) were added to an aqueous solution containing one of the metal cations (500  $\mu\text{L}$ ). Solutions were incubated for 2 h at 37 °C.

Studies in presence of ETDA or DTPA solutions were also performed to evaluate the stability of labeled polymers in presence of competing chelating ligands. Aliquots of purified product were added to DTPA or EDTA (both in a 100 fold excess with respect to the labeled polymer) solutions in 0.9 % NaCl, to give a final volume 550  $\mu\text{L}$ . Solutions were incubated for 2 h at 37 °C.

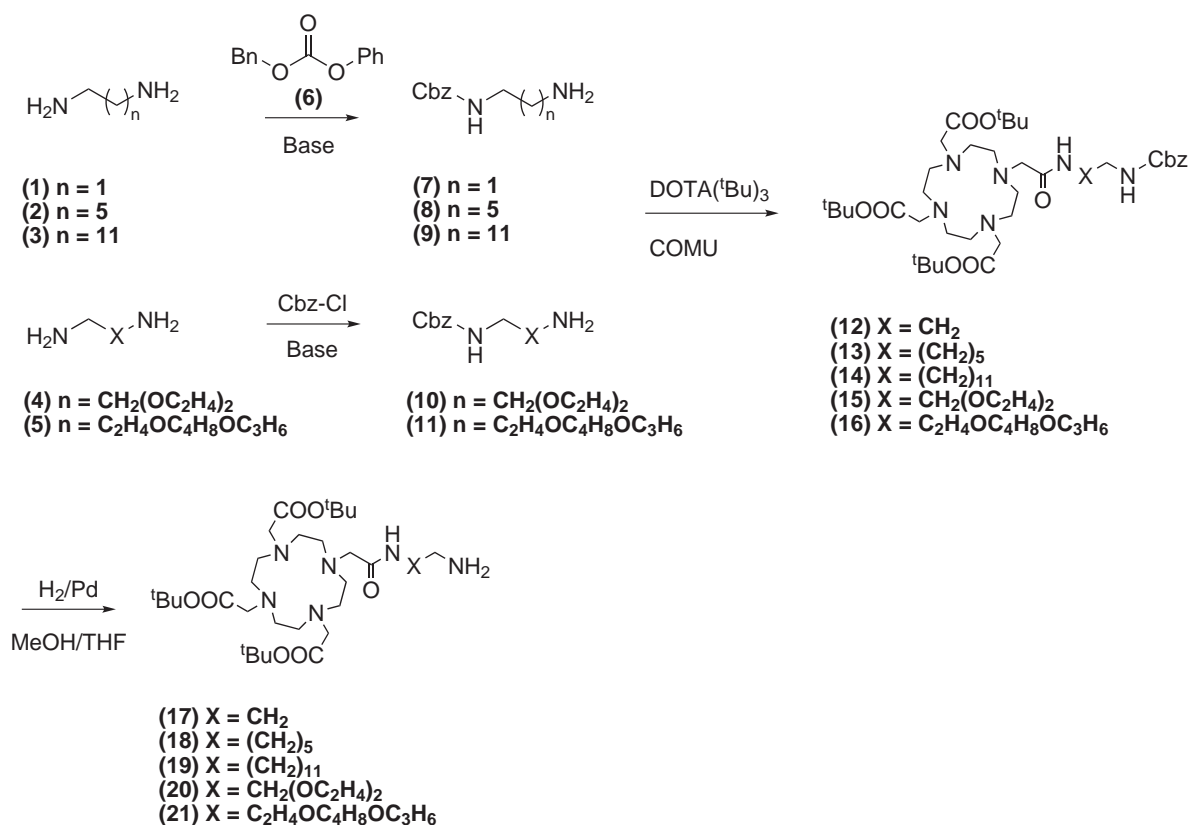
For analysis aliquots of the above solutions were taken at 1, 10, 25, 40, 60, 80 and 120 min and analyzed by TLC.

## Results and Discussion

### Organic Synthesis

#### Synthesis of DOTA-linker-systems

For the initial investigations the generator radionuclides  $^{68}\text{Ga}$  and  $^{44}\text{Sc}$  were selected. With respective half-lives of 67.71 min and 3.92 h, they are suitable to investigate processes with longer biological half-lives such as EPR mediated accumulation of nanoparticles in tumor tissue. Investigation of processes with long biological half-lives could also be achieved with other long-lived radionuclides (e. g.  $^{64}\text{Cu}$ ), or through the use of other imaging modalities (e. g. Gd(III) assisted MRI or  $^{111}\text{In}$ -SPECT). To ensure the stable and controlled incorporation of a metallic radionuclide, highly efficient chelators are required. DOTA was selected because it provides effective and stable complexation of a wide range of imaging and therapeutic radionuclides, which would consequently allow for a wide range of imaging techniques (MRI, SPECT, PET) to be applied. Conjugation of the DOTA chelator to the polymer backbone was achieved by orthogonal amidation chemistry.

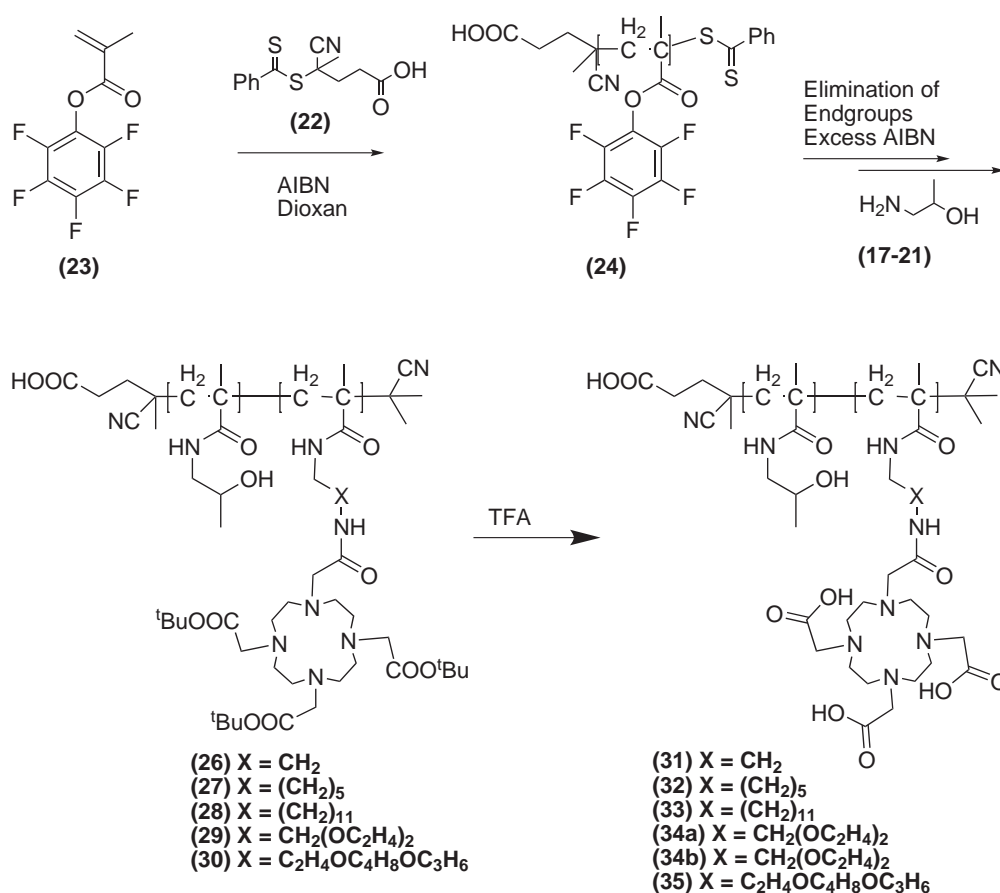


**Scheme 1:** Synthesis of the amine functionalized  $(^t\text{Bu})_3$ -DOTA ligands **17–21**.

The synthesis of amine functionalized DOTA **17–21** from commercially available  $(^t\text{Bu})_3\text{-DOTA}$  is shown in scheme 1. Commercially available  $\alpha,\omega$ -diamines **1–5** were mono-Cbz-protected using either benzyl-phenyl-carbonate **6** for **1–3** or benzyl-chloroformate for **4–5**. As reported by Christensen and co-workers the reactivity of the mono-Cbz-protection using **6** decreases with the length of the alkyl chain, but achieves good yields for **1–3** [27]. Mono-Cbz-protection with **6** was ineffective for the alkoxy diamines **4–5**, so instead benzyl-chloroformate was used and obtained good yields of the desired product. Amide bond formation between  $(^t\text{Bu})_3\text{-DOTA}$  and **7–11** afforded the Cbz-protected  $(^t\text{Bu})_3\text{-DOTA}$  ligands **12–16** in good yields (66–79%). Subsequent cleavage of the Cbz-protecting group was achieved in almost quantitative yields (93–97%) to afford the amine functionalized  $(^t\text{Bu})_3\text{-DOTA}$  ligands **17–21**.

### Synthesis of the HPMA-DOTA-conjugates

The synthetic route to the HPMA-DOTA conjugates is depicted in scheme 2.



**Scheme 2:** Synthesis of the HPMA-DOTA conjugates **31–35**.

Starting with the pentafluorophenyl methacrylate monomer **23**, the precursor homopolymer **24** was synthesized according to a literature procedure [23–25]. The dithioester endgroup was removed using an excess of 2,2'-azo-bis-(isobutyronitrile) as described in literature, [26] taking the advantage of circumventing side reactions during the next reaction steps. Functionalization of the polymeric precursor was achieved by aminolysis of the amine functionalized (<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub>-DOTA ligands **17–21**. DOTA incorporation was calculated to be between 0.6–11 % DOTA per conjugate. Subsequent addition of 2-hydroxylamine lead to the polymeric structures **26–30**. <sup>19</sup>F-NMR spectroscopy was used to confirm the absence of <sup>19</sup>F-signals on the polymeric backbone, indicating complete cleavage of the reactive ester functionalities. In the final step the tert-butyl esters were hydrolyzed using TFA to afford the final HPMA-DOTA conjugates, ready for labeling. With the exception of **32**, which could not be recovered after dialysis, HPMA conjugates were obtained in good yields (~89 %).

As intended, the polymer conjugates possess relatively low polydispersity indices (PDI) indicating that a narrow molecular weight distribution have been achieved by RAFT polymerization, and the polymers successfully functionalized in polymeranalogous reaction as delineated in table 1.

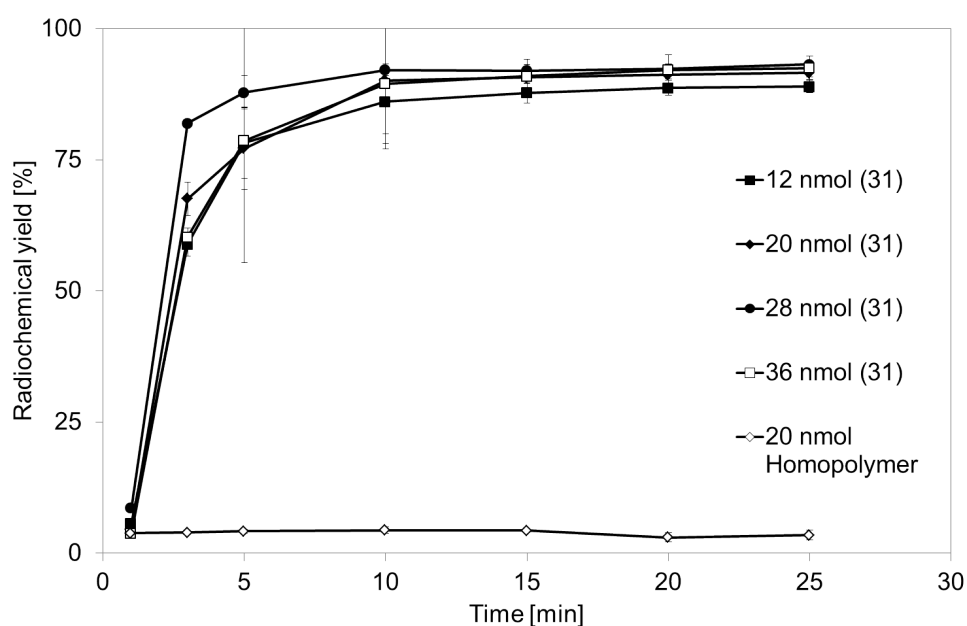
**Tab. 1:** Analytical data of the final HPMA-DOTA conjugates **31–35**.<sup>a</sup>Determination by GPC in THF as solvent.  
<sup>b</sup>Determined by <sup>1</sup>H-NMR after polymeranalogous reaction with 2-Hydroxypropylamine.

conjugates	M <sub>n</sub> [g/mol]	M <sub>w</sub> [g/mol]	PDI <sup>a</sup>	% DOTA <sup>b</sup>	linker	chain length
<b>(31)</b>	15 000	20 000	1.33	11	<b>(1)</b>	2
<b>(33)</b>	12 000	15 000	1.24	1.6	<b>(3)</b>	12
<b>(34a)</b>	12 000	15 000	1.24	0.6	<b>(4)</b>	8
<b>(34b)</b>	12 000	15 000	1.24	1.2	<b>(4)</b>	8
<b>(35)</b>	13 000	16 000	1.24	3.5	<b>(5)</b>	12

## Radiochemistry

### Radiolabeling with $^{68}\text{Ga}$

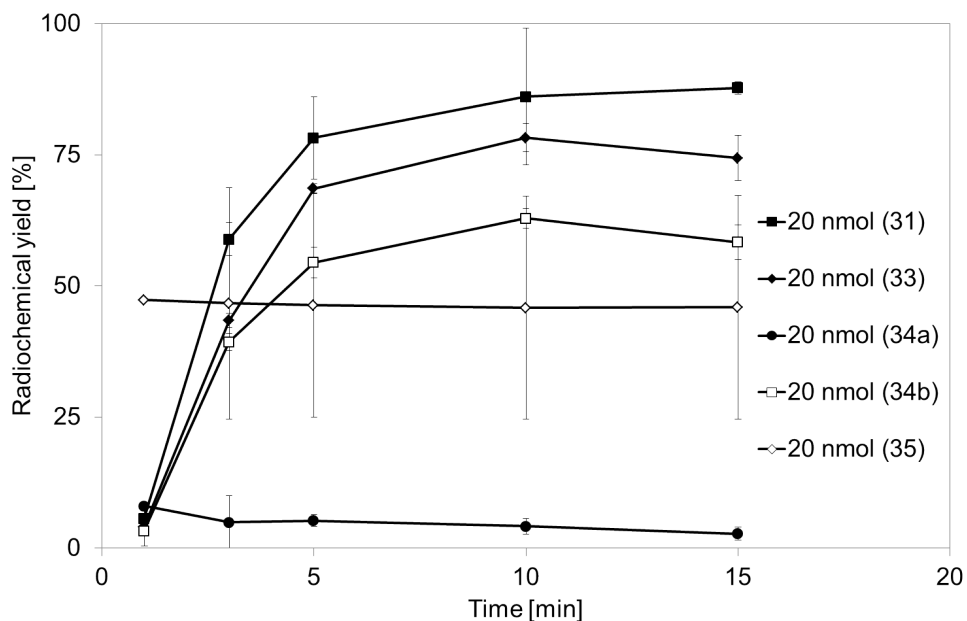
Macrocyclic chelators are preferred for the complexation of metallic radionuclides in radiopharmacy due to the typically very stable complexes they afford. However, DOTA derivatives require high temperatures (95 °C), compared to acyclic counterparts, in order for complexation of metallo-radionuclides (e. g.  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{44}\text{Sc}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ) to occur. Based on this, the labeling experiments of the HPMA-conjugates were only evaluated at 95 °C.



**Fig. 1:** Comparison of the time course of  $^{68}\text{Ga}$  complex formation with varying amount of HPMA-DOTA conjugate **31** and 20 nmol HPMA-homopolymer using acetone post-processed  $^{68}\text{Ga}$  ( $T = 95\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $n = 3$ ).

Figure 1 shows the complexation kinetics of generator derived and acetone post-processed  $^{68}\text{Ga}$  in water using varying amounts of the HPMA-conjugate **31**. The complex formation is fast and efficient, reaching a maximum yield of  $\sim 90\%$  within 15 min. The rate and extent of radiolabeling is not significantly effected with the concentration ranges evaluated, and therefore 20 nmol was used as the standard HPMA-conjugate concentration for further experiments. The extent of non-specific HPMA-conjugate labeling was assessed by attempting to label the homopolymeric structure (HPMA homopolymer), which does not carry DOTA-functionalization, using the optimized labeling protocol. The complexation kinetic curve is shown in figure 1. After 25 min of labeling less than 5% of the activity was associated with the HPMA-homopolymer, indicating that there is no significant non-specific binding of  $^{68}\text{Ga}$  in the absence

of DOTA-functionalization.

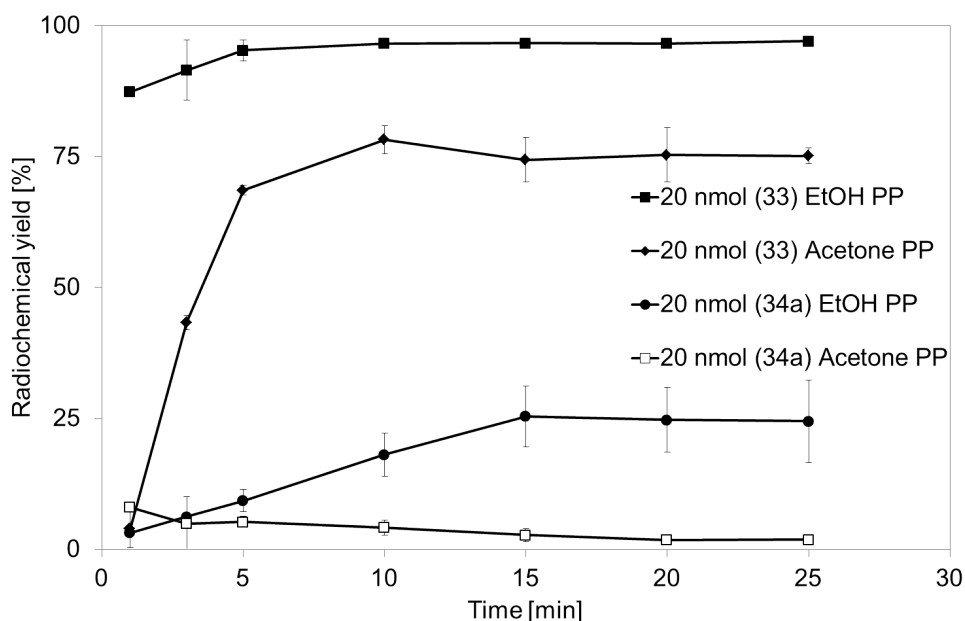


**Fig. 2:** Labeling yield of all conjugates utilizing acetone post-processed  $^{68}\text{Ga}$  (20 nmol, 15 min, 95 °C, n = 3).

Figure 2 shows the labeling kinetics of each HPMA-conjugate under the same conditions. In nearly all cases, moderate to good yields were obtained within 15 min. The trends suggest that the rate of labeling depends on the length of linker used and extent of DOTA functionalization on the homopolymer backbone. A comparison of conjugates **31** and **33** demonstrates this. Conjugate **31** has the shorter ethyl linker compared to that of the dodecyl linker of **33**, thus it would be expected that a greater radiolabeling yield would be expected for **33**. However, it is apparent that the effects of the shorter spacer are compensated for by the higher DOTA occupancy of **31** (11 %) compared to **33** (1.6 %). The influence of the extent of DOTA incorporation is more explicit if the radiolabeling kinetics of conjugates with the same spacer, **34a** and **34b** (both n = 8), are compared. Conjugate **34a** has half the DOTA functionalization compared **34b**, and accordingly shows 6-fold smaller radiolabeling yield after 15 min. It is evident that the labeling yield is influenced by the exact structure of the spacer. Conjugates **33** and **35** have the same spacer, expect that **33** is substituted with oxygen atoms at positions 4 and 9 in the chain. The structural change results in a decrease in the yield of 75 % for **33** to 45 % for **35**, even though **33** has a lower level of DOTA incorporation.



Recently, the use of organic solvents to facilitate more efficient radiolabeling has been reported [28] for use with ethanol-based post-processing [20]. It has been shown that the ethanol-based post-processing protocol significantly increases the radiochemical yield (even at lower temperature) compared to the standard procedure for DOTATOC [20]. To take advantage of this effect, the HPMA-conjugates **33–35** were labeled using the same protocol.



**Fig. 3:** Comparison of labeling yields of **33** and **34a** using ethanol and acetone post-processed  $^{68}\text{Ga}$  (20 nmol, 25 min, 95 °C,  $n = 3$ ).

Figure 3 compares the labeling kinetics of conjugates **33** and **34a** using the two post-processing methods. Labeling with the ethanol post-processed  $^{68}\text{Ga}$  in 1 M NaHEPES buffer leads to significantly increased yields of complex formation, with a  $\sim 20\%$  increase in labeling yield. A further advantage of this protocol is that the final volume (2.25 mL) is significantly smaller than that of the acetone-based method (5.25 mL), which produces greater specific activities. Table 2 summarizes the labeling results utilizing both post-processing methods.

**Tab. 2:** Labeling of HPMA-DOTA conjugates **31–35** using acetone and ethanol post-processed  $^{68}\text{Ga}$ -eluate (20 nmol, 20 min, 95 °C).

conjugates	linker	% DOTA	yield [%]	
			acetone post-processed $^{68}\text{Ga}$	ethanol post-processed $^{68}\text{Ga}$
<b>(31)</b>	<b>(1)</b>	11	91 ± 1	
<b>(33)</b>	<b>(3)</b>	1.6	75 ± 2	97 ± 1
<b>(34a)</b>	<b>(4)</b>	0.6	2 ± 1	25 ± 8
<b>(34b)</b>	<b>(4)</b>	1.2	55 ± 3	40 ± 8
<b>(35)</b>	<b>(5)</b>	3.5	45 ± 22	67 ± 6

### Purification of $^{68}\text{Ga}$ -labeled HPMA-DOTA-conjugates and quality control

The labeled polymeric systems could be purified quickly and easily using Sephadex G–25 size exclusion chromatography. Greater than 90 % of the radiolabeled product was retrieved in two fractions with a radiochemical purity of >98 %. The product was eluted from the column using 0.9 % NaCl, and as a result is suitable for *in vivo* studies without further modification.

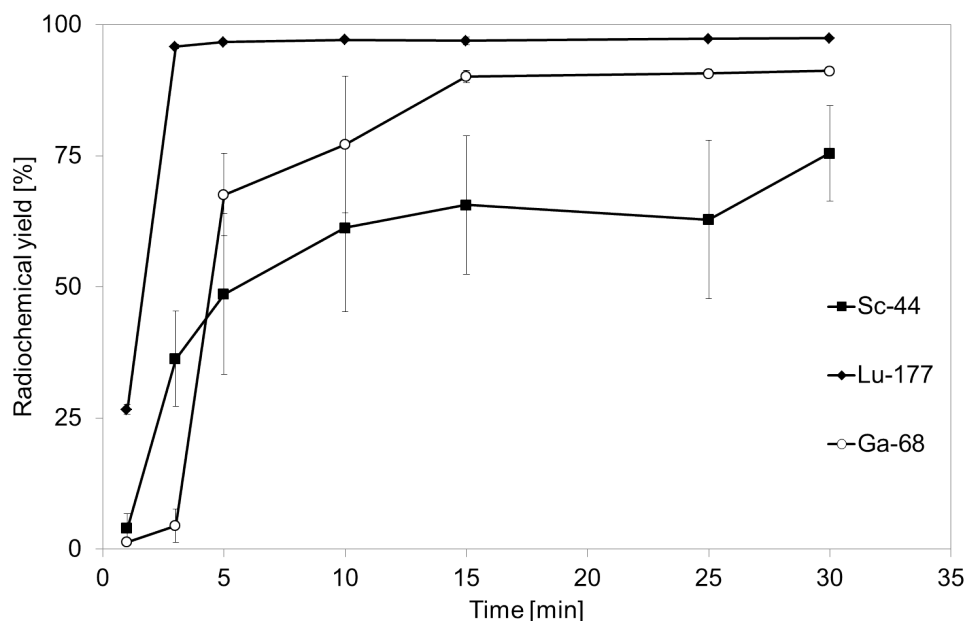
Complex formation could be assessed rapidly using radio-thin-layer chromatography (radioTLC) with 0.1 M citric buffer as the mobile phase. The  $R_f$  values for un-complexed  $^{68}\text{Ga}$  and labeled conjugates were as follows:  $R_f(^{68}\text{Ga}) = 0.9$  and  $R_f(^{68}\text{Ga-conjugate}) = 0$ . The  $R_f$  values for un-complexed  $^{44}\text{Sc}$  and  $^{177}\text{Lu}$  are the same as that of  $^{68}\text{Ga}$  ( $R_f = 0.9$ ) using the same TLC conditions.

### Radiolabeling with $^{44}\text{Sc}$

As a transition metal the complexation of scandium is heavily pH dependent, as has been previously shown for the formation of DOTATOC [29]. The highest complexation yields of  $^{44}\text{Sc}$ -DOTATOC were obtained when the labeling pH was between 3 and 4 [29]. Following the post-processing a final solution of  $^{44}\text{Sc}$  in ammonium acetate buffer (pH 4) is obtained, which is ideally suited for radiolabeling [21]. Interestingly,  $^{44}\text{Sc}$  labeling was found to be less efficient than that of  $^{68}\text{Ga}$ -HPMA-DOTA conjugates. Labeling of **31** with post-processed  $^{44}\text{Sc}$ , in ammonium acetate buffer (pH 4) affords yields of up to 75 % in 30 min which is significantly lower and slower than that achieved for  $^{68}\text{Ga}$  (90 % using the acetone-based post-processing) with the same conjugate.

### Radiolabeling with $^{177}\text{Lu}$

The radiolabeling kinetics of conjugate **31** with  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{44}\text{Sc}$  and  $^{177}\text{Lu}$  are shown in figure 4. Radiolabeling of conjugate **31** with  $^{177}\text{Lu}$  was fast and efficient, with yields of up 97 % regularly obtained within 3 min at 95 °C.

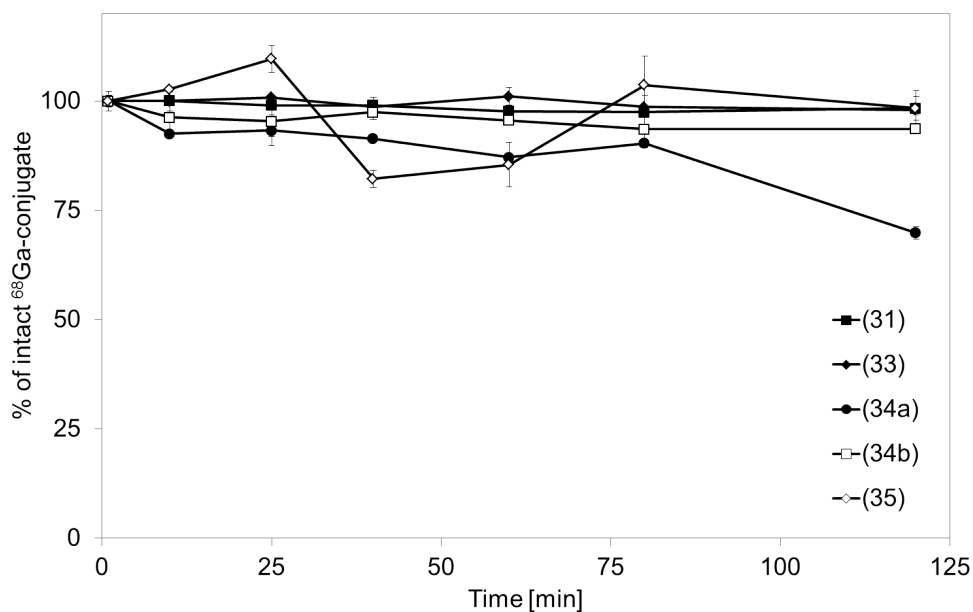


**Fig. 4:** Labeling yields for **31** with  $^{44}\text{Sc}$ ,  $^{68}\text{Ga}$  (acetone post-processed) and  $^{177}\text{Lu}$  (20 nmol, 30 min, 95 °C, n = 3).

### In vitro stability studies

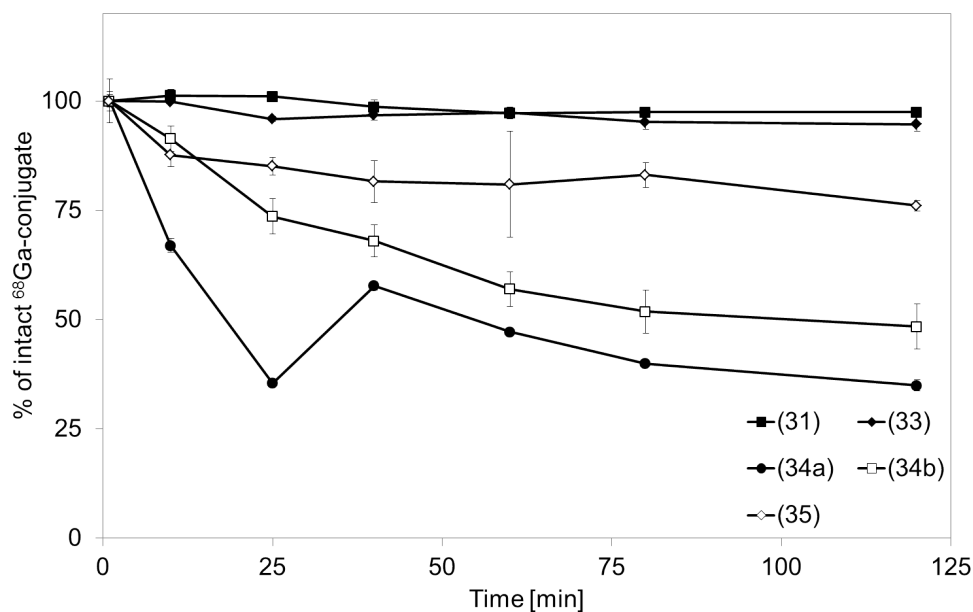
Stability of the formed complex is a crucial factor in the development of new radiopharmaceuticals. It is necessary to guarantee the stability of the complex for no less than two half-lives of the biological process on interest. Several experiments were carried out to assess the *in vivo* stability of the labeled conjugates, including in NaCl (used as final solvent), human serum, against transmetallation ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) and transchelation (EDTA, DTPA).

Stability was determined for the HPMA-DOTA conjugates initially in 0.9 % NaCl. The kinetic stability of all labeled conjugates is shown in figure 5 over the course of 120 min. The results indicate a high degree of stability even after 2 h incubation at 37 °C for nearly all labeled conjugates. Only labeled **34a** shows a gradual decomplexation, with 70 % of intact  $^{68}\text{Ga}$ -conjugate remaining after 120 min.



**Fig. 5:** Stability of  $^{68}\text{Ga}$ -labeled conjugates in 0.9 % NaCl over 120 min at 37 °C (n = 3).

The kinetic stability of all labeled conjugates in the presence of human serum (HA) is shown in figure 6 over the course of 120 min. A high degree of stability (>95 % after 120 min) was observed for conjugates featuring the alkyl spacers (i. e. **31** and **33**). In contrast conjugates featuring the alkoxy spacers (**34a**, **34b** and **35**) showed a higher decomposition rate, with between 30 and 75 % of the labeled conjugates remaining intact after 120 min incubation. The stability of labeled alkoxy spacer conjugates was also dependent on the length of the spacer incorporated. Labeled conjugate **35** (n = 12 spacer) showed a stability profile of 75 % after 120 min, whilst for **34** (n = 8) only 30–50 % of the labeled conjugate remained intact for the same time period. Interestingly the results also suggest that there is some variation in stability with variation in the extent of DOTA functionalization. Conjugate **34b** has double the DOTA incorporation compared to its structural analogue **34a**, and shows 20 % greater stability over the course of 120 min incubation. Presumably this effect is statistical based on the fact that there are a greater number of labeled DOTA in **34b** compared to **34a**.



**Fig. 6:** Stability of <sup>68</sup>Ga-labeled conjugates in human serum over 120 min at 37 °C (n = 3).

The presence metal cations (e.g. Fe<sup>3+</sup>) in the final solution, or in blood, can cause transmetallation of radiolabeled conjugate resulting in release of radionuclide into solution. Therefore it is necessary to determine, prior to *in vivo studies*, the stability of the labeled conjugates in presence of other chemically relevant metal cations.

**Tab. 3:** Stability of <sup>68</sup>Ga conjugates at 37 °C in presence of different metal cations at 10<sup>-2</sup> M concentrations (n = 3).

conjugate	linker	% DOTA	% of intact <sup>68</sup> Ga conjugate ± SD		
			Fe <sup>3+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>
(31)	(1)	11	94 ± 3	92 ± 1	82 ± 5
(33)	(3)	1.6	94 ± 9	69 ± 2	99 ± 2
(34a)	(4)	0.6	88 ± 2	80 ± 3	70 ± 1
(34b)	(4)	1.2	84 ± 2	86 ± 2	90 ± 1
(35)	(5)	3.5	74 ± 2	65 ± 1	83 ± 8

Table 3 shows the percentage of intact labeled conjugate after 120 min exposure to Fe(III), Mg(II) and Ca(II) separately (all 10<sup>-2</sup> M). These metal ions are prevalent *in vivo* and thus the labeled conjugates should be stable in their presence. The labeled conjugate **31** shows the highest overall stability, with some susceptibility to the presence Ca(II). Labeled conjugates **34** and **35** showed the greatest susceptibility to

HS, and according also show the lowest stability in the transmetallation evaluations ( $\sim 30\%$  decomplexation after 120 min). Whereas conjugate **31** was most susceptible to transmetallation by Ca(II) (82%), conjugate **35** was most susceptible to the presence of Mg(II) (65%) and least susceptible to Ca(II) (83%).

Similarly, transchelation of the radionuclide is also a common problem *in vivo* and was evaluated in the presence of EDTA and DTPA. The results are shown in table 4 after 120 min incubation at 37 °C.

**Tab. 4:** Stability of  $^{68}\text{Ga}$  conjugates at 37 °C in presence of EDTA or DTPA at molar ratio 100:1 of competing ligand to conjugate (n = 3).

conjugate	linker	% DOTA	% of intact $^{68}\text{Ga}$ conjugate $\pm$ SD	
			EDTA	DTPA
<b>(31)</b>	<b>(1)</b>	11	92 $\pm$ 5	83 $\pm$ 1
<b>(33)</b>	<b>(3)</b>	1.6	90 $\pm$ 2	87 $\pm$ 1
<b>(34a)</b>	<b>(4)</b>	0.6	77 $\pm$ 2	49 $\pm$ 1
<b>(34b)</b>	<b>(4)</b>	1.2	44 $\pm$ 3	31 $\pm$ 1
<b>(35)</b>	<b>(5)</b>	3.5	78 $\pm$ 5	93 $\pm$ 1

The results obtained for the transchelation experiments are similar to those observed for the HS and transmetallation stability evaluations. The highest stability was observed for labeled conjugates **31** and **33**, while the alkoxy derivatives (**34a** and **34b**) show significant signs of decomplexation. This is true with the exception of labeled **35**, which showed high stability in the presence of DTPA (93%), and to a lesser extent EDTA (78%). With the exception of **35**, DTPA proved to be a more effective transchelator of  $^{68}\text{Ga}$  from the HPMA-conjugates than EDTA.

## Conclusions

Polymers such as HPMA are of increasing interest as drug delivery systems due to their ability to localise in within tumors facilitated by the EPR effect. We have developed and optimized the synthesis of a novel series of polymer conjugates, featuring a HPMA backbone functionalized with DOTA chelator via linkers of varying structure and length. The DOTA chelators facilitate labeling with and stabilization of the metallic radionuclides which allow for diagnostic imaging and/or therapeutic action. Several

poly(HPMA)-linker-DOTA conjugates were synthesized with variations in the extent of DOTA incorporation and length of the linkers, which were either alkyl or alkoxy linear chains.

Evaluations of the radiolabeling efficiency, with generator derived  $^{68}\text{Ga}$ , revealed an important dependence on the extent of DOTA incorporation onto the HPMA backbone, but the structure and length of the linkers also play a role. The results highlight the balance which exists between the extent of DOTA incorporation and linker length for efficient and effective radiolabeling. A minimum of 1.2 % DOTA incorporation is required in order to obtain >50 % radiolabeling (chain length:  $n = 8$ ), with even higher percentages required for shorter linkers ( $n = 2$ ) to maintain high radiolabeling yields. Furthermore, conjugates featuring the alkoxy linkers generally displayed lower labeling yields than their alkyl analogues. Of particular interest, it was found that significantly better radiolabeling yields (20 % higher) were obtained when the eluted  $^{68}\text{Ga}$  was post-processed by the ethanol-based protocol [20].

The stability of the  $^{68}\text{Ga}$  labeled conjugates was assessed in the presence of 0.9 % NaCl, human serum (HS), metal cations (Fe(III), Mg(II), Ca(II)) and competing ligands (EDTA, DTPA). Only conjugates containing alkyl based linker groups (**31** and **33**) showed sufficient stability in all evaluations to warrant inclusion in future *in vivo* investigations. The other conjugates showed high susceptibility to transchelation in the presence of competing chelators and HS, with some instability to transmetallation in the presence of EDTA and DTPA.

Radiolabeling of the HPMA-conjugates with  $^{177}\text{Lu}$  (therapeutic nuclide) was highly efficient (97 %, <10 min). To a lesser extent this is also true for  $^{44}\text{Sc}$  (75 %, 30 min), which despite a lower yield is still of interest provided that an effective means for separation of the uncomplexed and complexed  $^{44}\text{Sc}$  is developed. Further work is required to establish whether these labeled conjugates are of sufficient stability for use *in vivo*.

This study confirms in principle the use of HPMA-conjugates for radiolabeling with different metallo radionuclides provided that a suitable chelator is used. Future work will focus on the use of HPMA-conjugates containing alkyl linkers which facilitate efficient radiolabeling and ensure high stability of the radiolabel. Suitable labeled conjugates will be evaluated using *in vivo* tumor models to assess pharmacokinetics of the conjugates.

---

## Referenzen

- [1] L. Sprincl, J. Vacik, J. Kopecek, D. Lim, „Biological tolerance of poly(N-substituted methacrylamides)“, *J. Biomed. Mater. Res.* **1971**, 5, 197–205.
- [2] J. Kopecek, L. Sprincl, H. Bazilova, J. Vacik, „Biological tolerance of poly(N-substituted acrylamides)“, *J. Biomed. Mater. Res.* **1973**, 7, 111–121.
- [3] L. Sprincl, J. Kopecek, D. Lim, „Effect of porosity of heterogeneous poly(glycol monomethacrylate) gels on the healing-in of test implants“, *J. Biomed. Mater. Res.* **1971**, 5, 447–458.
- [4] L. Sprincl, J. Vacik, J. Kopecek, „Biological tolerance of ionogenic hydrophilic gels“, *J. Biomed. Mater. Res.* **1973**, 7, 123–136.
- [5] K. Ulbrich, L. Sprincl, J. Kopecek, „Biocompatibility of poly(2,4-pentadiene-1-ol)“, *J. Biomed. Mater. Res.* **1974**, 8, 155–161.
- [6] J. Kopecek, I. Sprincl, D. Lim, „New types of synthetic infusion solutions. I. Investigation of the effect of solutions of some hydrophilic polymers on blood“, *J. Biomed. Mater. Res.* **1973**, 7, 179–191.
- [7] J. Kopecek, L. Sprincl, „Relationships between structure and biocompatibility“, *Polim. Med.* **1974**, 4, 109–117.
- [8] J. Kopecek, H. Bazilova, „Poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide]—I. Radical polymerization and copolymerization“, *Eur. Polym. J.* **1973**, 9, 7–14.
- [9] M. Bohdanecky, H. Bazilova, J. Kopecek, „Poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide]-II. Hydrodynamic properties of diluted polymer solutions“, *Eur. Polym. J.* **1974**, 10, 405–410.
- [10] P. A. Vasey, S. B. Kaye, R. Morrison, C. Twelves, P. Wilson, R. Duncan, A. H. Thomson, L. S. Murray, T. E. Hilditch, T. Murray, S. Burtles, D. Fraier, E. Frigerido, J. Cassidy, „Phase I Clinical and Pharmacokinetic Study of PK1 [N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide Copolymer Doxorubicin]: First Member of a New Class of Chemotherapeutic Agents - Drug-Polymer Conjugates“, *Clin. Cancer Res.* **1999**, 5, 83–94.



- [11] Meerum Terwogt J. M., W. W. t. Bokkel Huinink, J. H. M. Schellens, M. Schot, I. A. M. Mandjes, M. G. Zurlo, M. Rocchetti, H. Rosing, F. J. Koopman, J. H. Beijnen, „Phase I clinical and pharmacokinetic study of PNU166945, a novel water-soluble polymer-conjugated prodrug of paclitaxel“, *Anticancer Drugs* **2001**, *12*, 315–323.
- [12] N. E. Schoemaker, C. van Kesteren, H. Rosing, S. Jansen, M. Swart, J. Lieverst, D. Fraier, M. Breda, C. Pellizzoni, R. Spinelli, M. G. Porro, J. H. Beijnen, J. H. M. Schellens, W. W. t. Bokkel Huinink, „A phase I and pharmacokinetic study of MAG-CPT, a water-soluble polymer conjugate of camptothecin“, *Br. J. Cancer* **2002**, *87*, 608–614.
- [13] J. Kopecek, P. Kopecekova, T. Minko, Z.-R. Lu, „HPMA copolymer-anticancer drug conjugates: design, activity, and mechanism of action“, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2000**, *50*, 61–81.
- [14] D. V. Filosofov, N. S. Loktionova, F. Rösch, „A  $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$  radionuclide generator for potential application of  $^{44}\text{Sc}$ -based PET-radiopharmaceuticals“, *Radiochim. Acta* **2010**, *98*, 149–156.
- [15] L. F. Mausner, V. Joshi, K. L. Kolsky, G. E. Meinken, R. C. Mease, M. P. Sweet, S. C. Srivastava, „Evaluation of chelating agents for radioimmunotherapy with scandium-47“, *J. Nucl. Med.* **1995**, *36*, 104P.
- [16] W. A. P. Breeman, M. Jong, E. Blois, B. F. Bernard, M. Konijnenberg, E. P. Krenning, „Radio-labelling DOTA-peptides with  $^{68}\text{Ga}$ “, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2005**, *32*, 478–485.
- [17] G.-J. Meyer, H. Mäcke, J. Schuhmacher, W. H. Knapp, M. Hofmann, „ $^{68}\text{Ga}$ -labelled DOTA-derivatised peptide ligands“, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2004**, *31*, 1097–1104.
- [18] 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  $^{68}\text{Ga}$  for Medical Application“, *J. Nucl. Med.* **2007**, *48*, 1741–1748.
- [19] D. Mueller, I. Klette, R. P. Baum, M. Gottschaldt, M. K. Schultz, W. A. P. Breeman, „Simplified NaCl Based  $^{68}\text{Ga}$  Concentration and Labeling Procedure for Rapid Synthesis of  $^{68}\text{Ga}$  Radiopharmaceuticals in High Radiochemical Purity“, *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 1712–1717.
- [20] E. Eppard, M. Wuttke, P. L. Nicodemus, F. Rösch, „Ethanol-based post-processing of generator derived  $^{68}\text{Ga}$  towards kit-type preparation of  $^{68}\text{Ga}$ -radiopharmaceuticals“, submitted, *J. Nucl. Med.*

- 
- [21] M. Pruszyński, N. Loktionova, D. Filosofov, F. Rösch, „Post-elution processing of  $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$  generator-derived  $^{44}\text{Sc}$  for clinical application“, *Appl. Rad. Isot.* **2010**, *68*, 1636–1641.
- [22] G. Moad, E. Rizzardo, S. H. Thang, „Living Radical Polymerization by the RAFT Process“, *Australian Journal of Chemistry* **2005**, *58*, 379.
- [23] M. Eberhardt, R. Mruk, R. Zentel, P. Théato, „Synthesis of pentafluorophenyl(meth)acrylate polymers: New precursor polymers for the synthesis of multifunctional materials“, *Eur. Polym. J.* **2005**, *41*, 1569–1575.
- [24] P. Theato, „Synthesis of well-defined polymeric activated esters“, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2008**, *46*, 6677–6687.
- [25] M. Barz, R. Luxenhofer, R. Zentel, A. V. Kabanov, „The uptake of N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide based homo, random and block copolymers by human multi-drug resistant breast adenocarcinoma cells“, *Biomaterials* **2009**, *30*, 5682–5690.
- [26] S. Perrier, P. Takolpuckdee, C. A. Mars, „Reversible Addition–Fragmentation Chain Transfer Polymerization: End Group Modification for Functionalized Polymers and Chain Transfer Agent Recovery“, *Macromolecules* **2005**, *38*, 2033–2036.
- [27] M. Pittelkow, R. Lewinsky, J. B. Christensen, „Selective synthesis of carbamate protected polyamines using alkyl phenyl carbonates“, *Synthesis* **2002**, *15*, 2195–2202.
- [28] M. Perez-Malo Cruz, F. Rösch, „Improved efficacy of synthesis of  $^{68}\text{Ga}$ -radiopharmaceuticals in mixtures of aqueous solution and non-aqueous solvents“, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2012**, *39*.
- [29] M. Pruszyński, A. Majkowska-Pilip, N. S. Loktionova, E. Eppard, F. Rösch, „Radiolabeling of DOTATOC with the long-lived positron emitter  $^{44}\text{Sc}$ “, *Appl. Rad. Isot.* **2012**, *70*, 974–979.

## **3.2 Ethanol-based post-processing of generator derived $^{68}\text{Ga}$ towards kit-type preparation of $^{68}\text{Ga}$ -radiopharmaceuticals**

**Ethanol-based post-processing of generator derived  $^{68}\text{Ga}$   
towards kit-type preparation of  $^{68}\text{Ga}$ -radio-  
pharmaceuticals**

**Elisabeth Eppard, Michael Wuttke, Philipp L. Nicodemus, Frank Rösch**

Institute of Nuclear Chemistry, Johannes Gutenberg-University of Mainz,  
Fritz-Strassmann-Weg 2, D-55 128 Mainz, Germany

## Abstract

Post-processing using a cation-exchanger represents an efficient strategy for purification and concentration of generator derived  $^{68}\text{Ga}$  eluates. It ensures the removal of  $^{68}\text{Ge}$  prior to  $^{68}\text{Ga}$ -radiopharmaceutical preparation, and high labeling yields of injectable  $^{68}\text{Ga}$ -labeled radiopharmaceuticals for routine medical application.

In an effort to overcome the use of a hydrochloric acid/acetone solution we have investigated the feasibility of replacing acetone with ethanol in the generator post-processing protocol. The purification of  $^{68}\text{Ga}$  from co-eluted metallic impurities ( $^{68}\text{Ge(IV)}$ ,  $\text{Fe(III)}$ ,  $\text{Zn(II)}$ , and  $\text{Ti(IV)}$ ) on various cation-exchange columns has been investigated with different mobile phase compositions. As a proof-of-principle the purified  $^{68}\text{Ga}$  fraction was used to radiolabel DOTA-octreotate starting from a  $^{68}\text{Ga}$ -solution of type ethanol/HCl in pure aqueous solution and various buffer systems.

An effective protocol for the processing of generator-produced  $^{68}\text{Ga}$  on the basis of cation-exchange chromatography using hydrochloric acid/ethanol media is described. Up to 90 % of the initially eluted  $^{68}\text{Ga}$  activity can be collected in a 1 mL fraction of ethanol/0.9 N HCl (9:1), accompanied by quantitative removal of  $^{68}\text{Ge}$ -breakthrough. Following application of the novel post-processing method, near quantitative yields ( $\sim 99\%$ ) were achieved for labeling DOTA-octreotide derivatives utilizing buffer solutions already at  $80^\circ\text{C}$ .

The post-processing and labeling protocols guarantee almost quantitative preparation of injectable  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC (or other  $^{68}\text{Ga}$ -labeled radiopharmaceuticals) for routine applications, and can be incorporated into existing automated modules. Simultaneously, it improves radiolabeling efficacy and efficiency. It avoids subsequent quality control for organic solvents, and with radiochemical yields of e.g.  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC of  $>99\%$  it may make product purification unnecessary.

Keywords:  $^{68}\text{Ga}$ ; post-processing; ethanol; DOTATOC;  $^{68}\text{Ge}$

## Introduction

An enticing characteristic of the positron-emitting radionuclide  $^{68}\text{Ga}$  is its cyclotron-independent availability via  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  radionuclide generator systems. Generator production of  $^{68}\text{Ga}$  is made possible by the secular equilibrium of the long-lived  $^{68}\text{Ge}$  radionuclide (half-life  $t_{1/2} = 270.95$  d), that produces the comparatively short-lived  $^{68}\text{Ga}$  ( $t_{1/2} = 67.71$  min) with subsequent decay to the stable  $^{68}\text{Zn}$  nuclide. Also attractive is the high positron yield (89 % positron branching) and accompanying low photon emission (1.077 keV, 3.22 %) of  $^{68}\text{Ga}$ . As a result,  $^{68}\text{Ga}$  is considered to be one of the promising nuclides to carry PET into wider clinical application, with  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  radionuclide generators already being used extensively in research and to a lesser extent for clinical applications.

Wider acceptance of the  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  radionuclide generator requires development of the protocols used to make  $^{68}\text{Ga}$  available for radiolabeling, because the eluate obtained directly from these  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  radionuclide generators is not necessarily suitable for direct medical use. Firstly, the  $^{68}\text{Ga}$  eluate contains measurable activities of the long-living parent  $^{68}\text{Ge}$ , which is a critical parameter in the context of the routine clinical application of  $^{68}\text{Ga}$ -radiopharmaceuticals [1, 2]. Secondly, the rather large volume and relatively high concentration of hydrochloric acid of the eluate inhibit efficient radiolabeling and application *in vivo*. Furthermore, the presence of metal ion contaminants for many of the chelators used reduces labeling yields and specific activities. Several methods have been developed to decrease the content of metallic impurities and reduce the volume of the eluate, of which the cation-exchange (CEX) resin based post-processing has been particularly successful [3].

This method described by Zhernosekov et al. provides high recovery of  $^{68}\text{Ga}$ , complete removal of  $^{68}\text{Ge}$ , reduces contamination by other metallic impurities, and significantly lowers both the acidity and volume of the generator eluate [3]. After post-processing the  $^{68}\text{Ga}$  is available as the  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  species in 400  $\mu\text{L}$  of a 97.56 % acetone/0.05 N HCl solution, which is suitable for direct radiolabeling of DOTA-functionalized vectors [3, 4].

Of the cation-exchange resins tested BioRad AG 50W-X8 (<400 mesh) was found to provide best results in terms of separation of  $^{68}\text{Ga}$  from metallic impurities in the eluate for the acetone-based post-processing method [3]. Cation-exchange resins BioRad AG 50W-X4 (200–400 mesh) and Phenomenex STRATA-X-C tubes were also tested and found to be only marginally less effective [3]. Briefly, the protocol

involves the online adsorption of  $^{68}\text{Ga}$  (>97 %) onto the CEX, followed by a wash using 1 mL of an acetone/hydrochloric acid solution (N1: 80 % acetone/0.15 N HCl) to remove metal ion impurities. In the next step,  $^{68}\text{Ga}$  is eluted from the CEX using 400  $\mu\text{L}$  of a second acetone/hydrochloric acid solution (N2: 97.56 % acetone/0.05 N HCl). The procedure permits efficient production of  $^{68}\text{Ga}$ -labeled radiopharmaceuticals suitable for routine medical application, and is very successful having been incorporated into various commercial module systems which include generator elution, post-processing and synthesis. In some cases modifications are made to the original protocol, such as utilizing STRATA-X tubes and skipping the washing step using solution N1 (EZAG Berlin, Germany).

Following this protocol the acetone content of the final injectable  $^{68}\text{Ga}$ -radiopharmaceutical is estimated to be <0.5  $\mu\text{g}$  (<8.61 nmol) [3]. For a 300 g rat the median lethal dose (LD50) is >1.5 g (0.026 mol), which is significantly greater than the amount co-injected with a  $^{68}\text{Ga}$ -radiopharmaceutical. Acetone is a naturally occurring ketone in the body, and a product of normal metabolism undergoing several different pathways of metabolism and excretion [5]. Under specific requirements (diabetes mellitus, special diets, fasting) higher levels of acetone are present. The average blood concentration is 3.1  $\text{mg mL}^{-1}$  and the accepted range <10  $\text{mg mL}^{-1}$ . It is a class 3 solvent (class 3: solvents with low toxic potential, 50 mg per day or less are acceptable without justification) and as such, of low toxicity and associated with low risk to human health [6]. In the personal experience of the authors with colleagues in the field, it is evident that there are certain sectors which feel that an injected radiopharmaceutical should not contain acetone.

The aim of this work was to investigate the use of other, more accepted solvents, for the post-processing of the generator eluate such that acetone would no longer be required.

Ethanol is commonly used as additive and solvent in medical applications. For example, it is used to increase the solubility of pharmaceuticals and to act as a preservative. In radiopharmaceutical chemistry, ethanol is known to inhibit radiolysis induced by ionization. Ethanol, also a class 3 solvent, is not produced naturally by the human body. Its LD50 (i.v. rat of 300 g) is 0.22 g (0.005 mol) [7]. Despite the fact that the LD50 is lower, its presence is preferred over that of acetone.

Specifically, this work focuses on replacing acetone with the ethanol within the very successful and efficient cation exchanger post-processing method [3, 4] and its follow-up procedures such as e.g. combined cation/anion-exchange protocol [8] to provide a more widely accepted constitution of the final injectable solution. Interestingly, it has recently been reported that the presence of ethanol carries an

additional benefit that is to enhance the rate of radiolabeling with metallic radionuclides [9]. Indeed, the use of ethanol-based cation-exchanger post-processing may represent an important step towards wider clinical application of the  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  radionuclide generators and even kit-type formulations of  $^{68}\text{Ga}$ -radiopharmaceuticals.

## Materials and Methods

### $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ radionuclide generator

A commercial 1.100 MBq generator with  $^{68}\text{Ge}(\text{IV})$  adsorbed on a  $\text{TiO}_2$  support were obtained from Cyclotron Co. Ltd. (Obninsk, Russian Federation).

### Metals used for ion-exchange distribution measurements

85 MBq of  $^{68}\text{Ga}$  in 5 mL of 0.1 N HCl was obtained from an 18 month old 1.100 MBq generator, which had been eluted more than 200 times previously. The activity of  $^{68}\text{Ge}$ -breakthrough in the eluted  $^{68}\text{Ga}$  fraction was  $\sim 7$  kBq.

$^{59}\text{Fe}$  was produced by a neutron-capture nuclear reaction on naturally occurring metallic iron. Iron (200 mg) was irradiated for 21 d at the Hahn-Meitner-Institute (HMI) Berlin neutron source at  $1.6 \times 10^{-14} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$  yielding 456 MBq  $^{59}\text{Fe}$ . The iron was dissolved in conc. HCl solution, and then diluted to give a solution of 0.1 N HCl.

$\text{TiCl}_4$  was obtained from Sigma-Aldrich as 0.09 M Ti solution in 20 % HCl. It was diluted to give a solution of 0.1 N HCL prior to use.

### Chemicals and equipment

Analytical reagent grade chemicals and Milli-Q water (18.2 M $\Omega$  cm, Millipore) were used unless otherwise stated. All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich. BioRad AG 50W-X8 (–400 mesh), BioRad AG 50W-X4 (200–400 mesh), Phenomenex STRATA-X-C, Varian Bond Elut SCX and MERCK KGG LiChrolut SCX CEX resins were used to prepare micro-chromatography columns (50 mg resin, 2 mm inner diameter, 5 mm length). Labeling reactions were carried out in 11 mL glass vials (Mallinckrodt) using a blockthermostat (TK13, Ditabis) for temperature control and agitation. Purification of the  $^{68}\text{Ga}$ -labeled DOTATOC was performed with 30 mg C-18 cartridges (Phenomenex Strata-X Tubes), with subse-



quent sterile filtration performed using a 0.22  $\mu\text{g}$  membrane filter (Millex GV). Activity measurements of  $^{68}\text{Ga}(\text{III})$  and  $^{59}\text{Fe}(\text{III})$  were performed using a Curie-Meter (ISOMED 2010, Nuklear-Medizintechnik Dresden GmbH).  $^{68}\text{Ge}$  activity was determined with a  $\gamma$ -spectrometer with a  $^{68}\text{Ge}$ -detection limit of 12 Bq. The Ti(IV) content in the different fractions was determined using ICP-MS (Agilent, 7500ce). TLC analysis was performed using a flat-bed scanner (Instant Imager<sup>®</sup>, Packard Canberra, Schwadorf, Austria).

#### **Separation of $^{68}\text{Ga}$ from $^{68}\text{Ge}(\text{IV})$ , $^{59}\text{Fe}(\text{III})$ and Ti(IV)**

The micro-chromatography columns were prepared using 50 mg of each CEX resin. In all experiments  $^{68}\text{Ga}$  was eluted from the generator with 0.1 N HCl (5 mL) and transferred online to the micro-chromatography CEX column. The column was then washed with 1 mL of a washing solution comprising ethanol (70–90 %) and HCl (concentrations of 0.1, 0.15 or 0.2 mol/L), and the washing fraction collected. Remaining traces of the eluent mixture were removed by passing air through the CEX resin using a syringe. This washing step is designed to eliminate the unwanted chemical and radiochemical impurities, without eluting the  $^{68}\text{Ga}$  from the CEX. In the final step, the column is filled (dead volume  $\sim 200 \mu\text{L}$ ) with a second solution of varying ethanol/HCl composition and allowed to stand for 2 min. Subsequently the column was eluted with varying amounts (250–850  $\mu\text{L}$ ) of the same solution, and collected in an Eppendorf<sup>®</sup> vial (2 mL). The protocol is designed such that this eluent fraction should contain the purified and concentrated  $^{68}\text{Ga}(\text{III})$ . The column was reconditioned with 4 N HCl (1 mL) followed by  $\text{H}_2\text{O}$  (1 mL). In each experimental set-up (i. e. each combination of CEX, washing solution and eluting solution) 5 fractions were analyzed for their  $^{68}\text{Ga}$  and  $^{68}\text{Ge}$  contents: (i) 0.1 N HCl; (ii) washing solution (80 % ethanol/0.1–0.2 N HCl); (iii) elution mixture (ethanol/HCl); (iv) 4 N HCl; (v)  $\text{H}_2\text{O}$ . The distributions of  $^{68}\text{Ga}(\text{III})$  and  $^{68}\text{Ge}(\text{IV})$  in the different fractions was investigated to determine which set-up was the most suitable. To analyze the behavior of the relevant impurities, the distributions of  $^{59}\text{Fe}(\text{III})$  and Ti(IV), diluted in 0.1 N HCl solution, were determined using the described protocol.

#### **$^{68}\text{Ga}$ -Radiolabeling**

The  $^{68}\text{Ga}(\text{III})$  eluate obtained after elution with 1 mL 90 % ethanol/0.9 N HCl ( $9 \times 10^{-4}$  mol HCl) was used for radiolabeling. Labeling was performed in water (4.5 mL) or suitably prepared buffer solutions (sodium acetate (NaOAc), ammonium acetate AmAc), HEPES) in open standard reagent vials contain-

ing DOTATOC (21 nmol). The volume and concentrations of the buffers used was varied. Solutions were preheated to the desired temperature (80–90 °C depending on the setup used). In all cases labeling reactions were heated for either 10 and 15 min. For comparison, the labeling kinetics of DOTATOC was determined using  $^{68}\text{Ga}$  purified by the standard acetone post-processing method. In this case labeling was carried out in water (4.6 mL) at 80 and 95 °C for 15 minutes.

### **Quality control**

Thin-layer chromatography (TLC) was used to analyze the reaction yields. The reaction solution (2  $\mu\text{L}$ ) was spotted on aluminum-backed silica gel 60 (Merck), and eluted with 0.1 M  $\text{Na}_3\text{citrate}$  water solution (pH = 4). The activity was recorded using a flat-bed scanner (Instant Imager, Packard Canberra).

### **Purification of $^{68}\text{Ga}$ -labeled peptide**

$^{68}\text{Ga}$ -labeled DOTATOC was separated from unreacted  $^{68}\text{Ga}$  species by reverse-phase chromatography. The reaction mixture was cooled to  $\sim 50$  °C and passed through a C-18 cartridge (Phenomenex Strata-X tubes, 30 mg). The peptide was quantitatively retained on the reverse phase. After washing the cartridge with  $\text{H}_2\text{O}$  (1 mL), the  $^{68}\text{Ga}$ -labeled peptide was eluted using ethanol (0.4 mL).

## **Results**

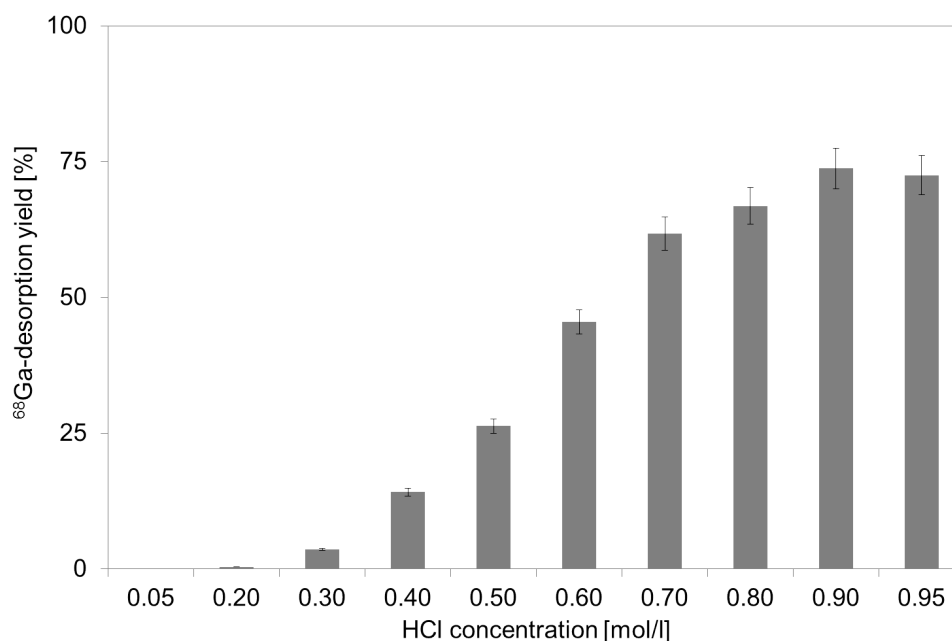
### **Distribution of $^{68}\text{Ga}$**

The initial  $^{68}\text{Ga}$ -adsorption from the generator eluate on the examined CEX resins was nearly quantitative. With the 80 % ethanol/0.15 N HCl solution as the washing solution, <1 % of  $^{68}\text{Ga}$  was removed from the each CEX and lost to the washing fraction. In fact, with the exception of AG 50W-X4, this percentage remains constant for varying constitution (70–90 % ethanol and 0.2–0.1 N HCl) of the washing solution. The  $^{68}\text{Ga}(\text{III})$  was eluted from the CEX with a 90 % ethanol/0.9 N HCl solution with desorption yields which varied depending on the CEX used. For the BioRad (AG 50W-X8, AG 50W-X4), Strata-X-C tubes and columns (Bond Elut and LiChrolut) desorption efficiencies of >77(2) (mean),  $\sim 23$  (maximum) and <1 % (maximum) were observed, respectively. The distribution of  $^{68}\text{Ga}(\text{III})$  between the different fractions is shown in Table 1 for each CEX investigated, 80 % ethanol/0.15 N HCl as the washing solution and 90 % ethanol/0.9 N HCl as the CEX eluting solution.

**Tab. 1:** Relative distribution (%) of  $^{68}\text{Ga}(\text{III})$  using 0.4 mL 90 % ethanol/0.9 N hydrochloric acid media on all investigated CEX microchromatographic columns (SCX 1 = AG 50W–X8, SCX 2 = AG 50W–X4, SCX 3 = STRATA–X–C, SCX 4 = Varian SCX, SCX 5 = MerckKGG SCX).

Volume	Fraction	Eluent	SCX 1	SCX 2	SCX 3	SCX 4	SCX 5
5 mL	i	0.1 N HCl	0.37	2.32	5.44	0.02	0.04
1 mL	ii	80 % EtOH/0.15 N HCl	0.55	2.38	0.05	0.00	0.01
0.4 mL	iii	90 % EtOH/0.9 N HCl	75.72	78.16	23.90	0.00	0.01
1 mL	iv	4 N HCl	17.21	5.48	8.34	98.32	95.94
1 mL	v	H <sub>2</sub> O	1.65	3.17	5.53	4.48	5.28

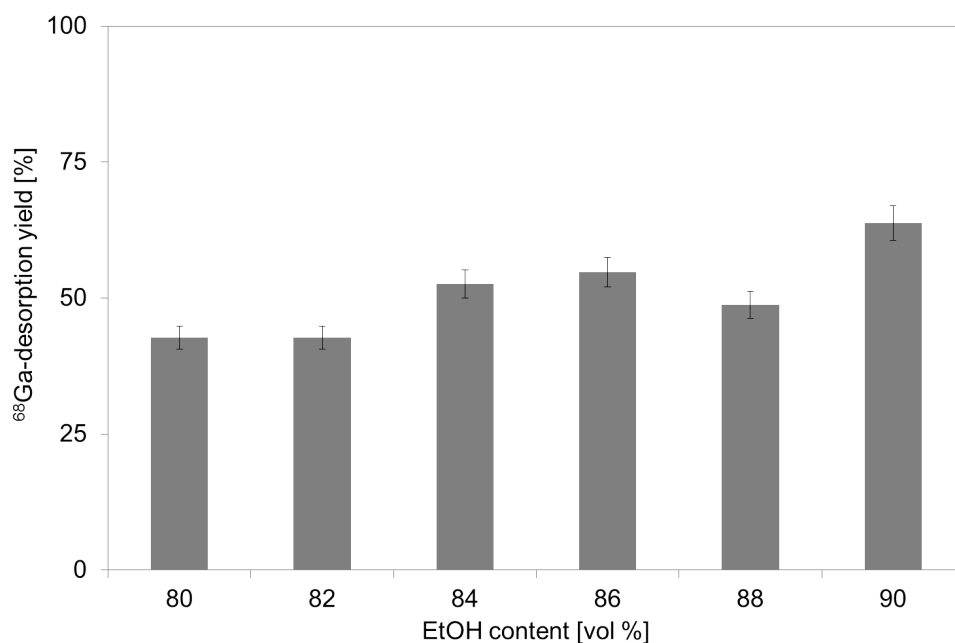
It was found that the desorption yield was affected by the overall concentration of HCl, ethanol content and volume of the elution mixture. This was extensively investigated for the BioRad resins (AG 50W–X8, AG 50W–X4), as they had proved most suitable. For a given ethanol content and volume of the elution mixture, the desorption yield increases with increasing acidity (Fig. 1).



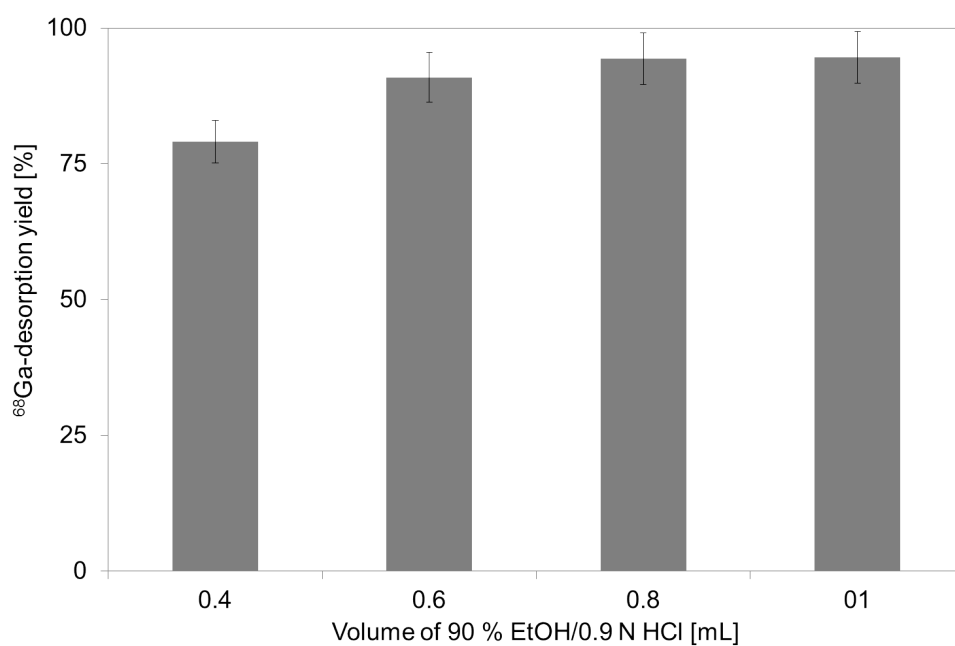
**Fig. 1:** Dependence of  $^{68}\text{Ga}$ -desorption yield on HCl concentration for the AG 50W–X8 resin eluted with 0.4 mL of 90 % ethanol/0.05–0.95 N HCl solutions.

Furthermore, increasing desorption was observed with increasing ethanol content (Fig. 2) and larger volumes of the solution (Fig. 3). Only the BioRad CEX resins are suitable for the adsorption and subsequent elution of  $^{68}\text{Ga}(\text{III})$ . Taking into the consideration the critical importance of a high  $^{68}\text{Ga}$

recovery, the BioRad CEX resins were appropriate for further consideration in terms of the distribution of  $^{68}\text{Ge}$ ,  $^{59}\text{Fe}$  and Ti.



**Fig. 2:** Dependence of  $^{68}\text{Ga}$ -desorption yield on ethanol content for the AG 50W-X8 resin eluted with 0.4 mL of an 80–90 % ethanol/0.9 N HCl solution.



**Fig. 3:** Dependence of the  $^{68}\text{Ga}$ -desorption yield on the total volume of the elution mixture for the AG 50W-X8 resin eluted with 90 % ethanol/0.9 N HCl.

### **Distribution of $^{68}\text{Ga}$ for 1 mL mixtures of 90 % ethanol/0.9 N HCl**

To investigate the influence of increasing the amount of CEX eluting solution has on the  $^{68}\text{Ga}$ -desorption, the BioRad CEX columns were eluted with 1 mL of 90 % EtOH/0.9 N HCl. This represents a 2.5-fold increase in the amount of desorption used in table 1. The desorptions for AG 50W–X8 and AG 50W–X4 increased by  $\sim 4$  and  $\sim 9$  % to values of  $\sim 81$  and  $\sim 88$  % respectively under this setup. The relative distributions of  $^{68}\text{Ga(III)}$ ,  $^{68}\text{Ge(IV)}$ , Fe(III) and Ti(IV) on the CEX columns AG 50W–X8, –400 mesh and AG 50W–X4, 200–400 mesh (50 mg, BioRad) when using 1 mL of the 90 % EtOH/0.9 N HCl mixture are summarized in table 2. In a setup which does not include the washing step, such as those used within automated modular systems, the elution with the 90 % ethanol/0.9 N HCl solution would produce  $^{68}\text{Ga}$  desorption yields of  $\sim 90$  %.

### **Distribution of $^{68}\text{Ge}$**

For both CEX resins 97 % of  $^{68}\text{Ge(IV)}$  passes the column with the initial 0.1 N HCl generator eluate solution. The remaining traces are further reduced by the washing step with 80 % ethanol/0.15 N HCl solution. After the final elution (i. e. the water fraction) the CEX contains  $< 0.25$  % of  $^{68}\text{Ge}$  initially eluted. There was no detectable  $^{68}\text{Ge}$  in the purified  $^{68}\text{Ga}$ , 4 N HCl and water fractions within 8 h of measurement. Since the  $^{68}\text{Ge}$  detection limit for the  $\gamma$ -spectrometer was 12 Bq, a decontamination factor of  $> 10^{-4}$  % for  $^{68}\text{Ge}$  was achieved.

### **Distribution of $^{59}\text{Fe}$**

The relative distribution of Fe(III) differs depending on the BioRad CEX column used. The amount of Fe(III) in the final  $^{68}\text{Ga}$  fraction could be reduced to  $\sim 14$  % and  $\sim 33$  %, of the initial content, with AG 50W–X8 and AG 50W–X4 respectively. Purification factors for the respective CEX columns are therefore  $\sim 7$  and  $\sim 3$ .

### **Distribution of Ti**

Ti(IV) is almost entirely adsorbed on the CEX columns directly from the initial 0.1 N HCl solution. Up to 10 % of the initial Ti(IV) content is removed with the  $^{68}\text{Ga(III)}$  in the eluting fraction (90 % ethanol/0.9 N HCl), with the AG 50W–X8 CEX performing slightly better in this regard ( $\sim 7$  % in purified  $^{68}\text{Ga}$  fraction).

The largest content is observed for the regeneration steps (4 N HCl followed by water), indicating that the column regeneration procedure is effective.

**Tab. 2:** Relative distribution (%) of  $^{68}\text{Ga(III)}$ ,  $^{68}\text{Ge(IV)}$ ,  $^{59}\text{Fe(III)}$  and  $\text{Ti(IV)}$  using 1.0 mL 90 % ethanol/0.9 N HCl media on two of the microchromatographic columns (50 mg AG 50W–X8, –400 mesh; AG 50W–X4, 200–400 mesh).

Fraction	Volume	Eluent	Ga(III)	Ge(IV)	Fe(III)	Ti(IV)
<b>AG 50W–X8</b>						
i	5 mL	0.1 N HCl	0.13	97.17	11.12	2.85
ii	1 mL	80 % EtOH/0.15 N HCl	0.57	2.83	1.99	0.76
iii	1 mL	90 % EtOH/0.9 N HCl	80.47	<0.25	14.09	6.83
iv	1 mL	4 N HCl	15.71	<0.25	42.28	58.73
v	1 mL	H <sub>2</sub> O	0.84	<0.25	16.96	30.83
<b>AG 50W–X4</b>						
i	5 mL	0.1 N HCl	1.79	97.11	39.83	5.23
ii	1 mL	80 % EtOH/0.15 N HCl	2.65	2.89	23.08	6.35
iii	1 mL	90 % EtOH/0.9 N HCl	87.38	<0.25	32.56	10.86
iv	1 mL	4 N HCl	2.63	<0.25	3.17	63.88
v	1 mL	H <sub>2</sub> O	1.29	<0.25	0.28	13.68

### Labeling

Prior to labeling the generator eluate was post-processed using the protocol outlined by table 2. The purified  $^{68}\text{Ga}$  eluate was therefore available in 1 mL of 90 % ethanol/0.9 N HCl.

The acidic content of the solution ( $\text{HCl} \equiv 9 \times 10^{-4} \text{ mol/L H}^+$ ) produced a pH of  $1.60 \pm 0.05$  when diluted to 5 mL using H<sub>2</sub>O. Under these conditions <10 % DOTATOC labeling is observed in 10 min at 95 °C. Poor radiolabeling under these conditions is not surprising. In acidic environments some of the ligand donor atoms become protonated, which hinders approach of the metal ion and creates an energy barrier to complexation of the metal ion. Labeling was repeated with different buffer solutions of varying molarity, pH and volume. Table 3 summarizes the results of labeling reactions at 95 °C. Ammonium acetate and HEPES buffer were evaluated at pH 5. In these buffers radiolabeling yields were up to 99 % within 10 min. For ammonium acetate, yields of  $(98 \pm 1) \%$  are obtained for all buffer concentrations

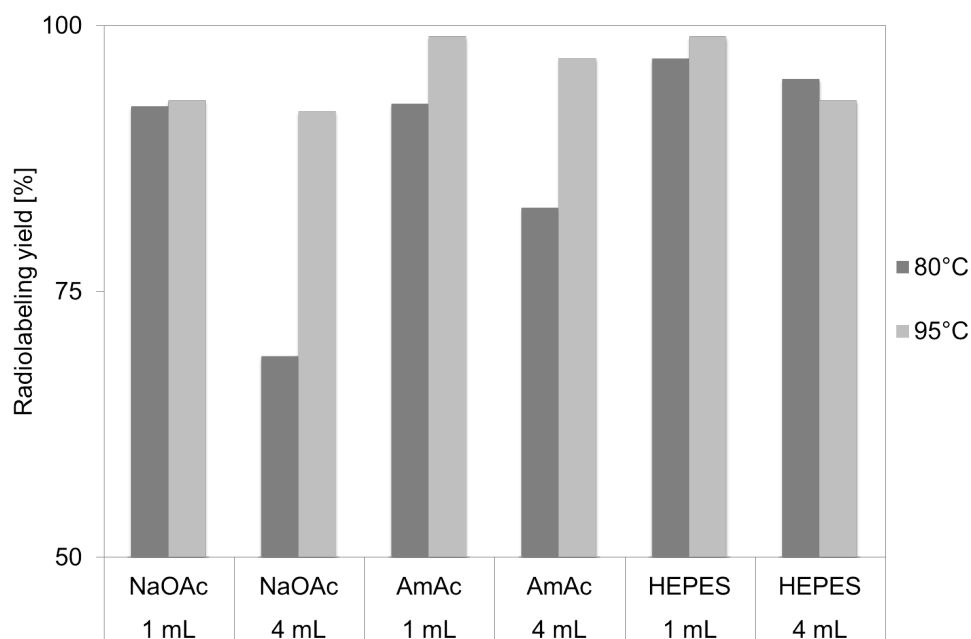
evaluated. In the case of HEPES buffer, concentrations of 1, 0.5 and 0.25 M produced radiolabeling yields of  $\sim 99\%$ , whilst a further decrease to 0.1 M resulted in decreasing yields.

**Tab. 3:**  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC radiolabeling yield for various buffer solutions (at pH 4 and 5), with 1 and 4 mL of 90 % ethanol/0.9 N HCl fractions, at 95 °C for 10 min.

Volume [mL]	Molarity [mol/L]	Yield [%]		
		NaOAc	NH <sub>4</sub> OAc	HEPES
pH 4				
1	1	50 ± 2	84 ± 1	38 ± 2
	0.5	46 ± 3	71 ± 3	19 ± 1
	0.25	43 ± 2	96 ± 6	10 ± 2
	0.1	41 ± 2	71 ± 2	8 ± 1
4	1	74 ± 2	89 ± 2	99 ± 1
	0.5	90 ± 2	85 ± 3	96 ± 2
	0.25	65 ± 8	99 ± 2	99 ± 1
	0.1	91 ± 2	99 ± 1	60 ± 6
pH 5				
1	1	91 ± 2	97 ± 1	99 ± 1
	0.5	93 ± 1	99 ± 1	99 ± 1
	0.25	84 ± 3	98 ± 1	99 ± 1
	0.1	61 ± 8	99 ± 1	89 ± 3
4	1	84 ± 2	91 ± 1	90 ± 1
	0.5	92 ± 2	97 ± 1	93 ± 2
	0.25	81 ± 4	98 ± 2	95 ± 1
	0.1	87 ± 2	92 ± 2	84 ± 5

Labeling was repeated with the 0.5 M acetate buffer solutions (pH 5) at 80 °C for 10 min instead of 95 °C. Also under these conditions, labeling yields of up to 99 % were obtained. For comparison, the kinetics at 80 and 95 °C are shown graphically in figure 4 for 0.5 M buffer (pH 5) solutions. When 1 mL of buffer is used (total volume = 2 mL) the differences between labeling at 80 and 95 °C is marginal. However, when the volume of the buffer is increased to 4 mL there is an up to 20 % improvement in labeling at 95 °C. Labeling with 1.0 M HEPES buffer solution was repeated at 80 °C for comparison with the kinetics of the standard procedure (acetone post-processed  $^{68}\text{Ga}$  eluate N2, 4.6 mL water, 80 and 95 °C, 15 min). For the ethanol protocol with labeling at 80 °C yields of up to  $97.00 \pm 0.25$  and  $98.00 \pm 0.20\%$  were

achieved within 5 and 15 min, respectively.



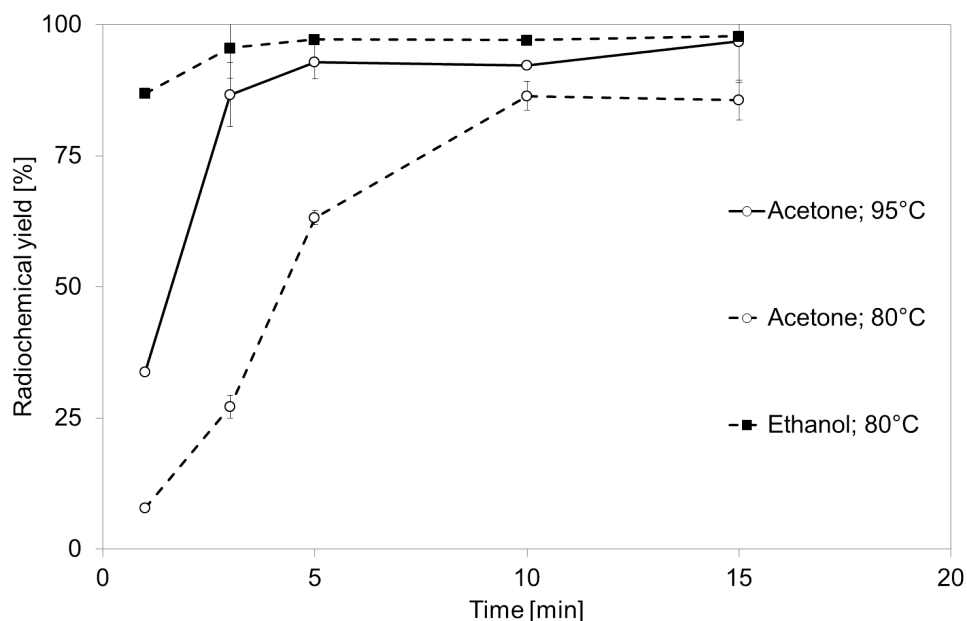
**Fig. 4:** Comparison of  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC radiolabeling yield obtained at 80 and 95 °C for three different buffer solutions (NaOAc, AmAc and HEPES all at  $0.5\text{ mol L}^{-1}$ ) at pH 5, using 1 and 4 mL of the buffer solution.

Compared to those of the labeling reaction at 80 and 95 °C following the standard post-processing procedure, it is evident that there is a significant increase in the rate of labeling with the ethanol-based method (Fig. 5). The difference between both procedures at 80 °C is 34 and 12 % at 5 and 15 min, respectively, in favor of the ethanol-based method. The difference between the 1.0 M HEPES buffered reaction at 80 °C and the standard procedure at 95 °C is 4 and 1 % at 5 and 15 min respectively, also in favor of the ethanol method.

#### Purification of $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC and quality control

After labeling, the product ( $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC) was purified using an RP18 cartridge. Though in the case of initial labeling yields over 99 %, this step contributes not to significantly improved radiochemical purity. Quality control is performed by TLC or HPLC.





**Fig. 5:** Radiolabeling kinetics (0–15 min) of  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC obtained in: 1 M HEPES buffer (80 °C, 2 mL) after ethanol-based post-processing, and in pure water (5 mL, 80 and 95 °C) after acetone-based post-processing (80 and 95 °C).

## Discussion

Commercially available  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  radionuclide generators provide high and stable elution yields of  $^{68}\text{Ga}$ , but the eluates are not optimally designed for direct medical use. The content of  $^{68}\text{Ge}$  in the eluate, other impurities, acidity and high volume inhibit the direct use of the initial  $^{68}\text{Ga}$  fraction for medical applications.

As described by Zhernosekov et al. it is possible to reduce the volume and acidity of the eluate, as well as the content of chemical impurities, by using cation-exchangers and acetone/hydrochloric acid mixtures [3]. Although the overall content of acetone in the final injectable solution was determined to be  $<8.61$  nmol (i. e. below the LD50) and no cases of adverse effects resulting from the use acetone (in the acetone-based post-processing) have been reported, it appears that the substitution of acetone for ethanol is desirable. Post-processing of the generator eluate by the ethanol-based method outlined here provides an efficient means for volume reduction and purification.

Purification of the generator eluate can be performed on cation-exchangers by using ethanol/hydrochloric acid media. The optimal protocol retains  $>90\%$  of the initial eluted  $^{68}\text{Ga}$  in 1 mL 90 % ethanol/0.9 N

HCl. The best combination of CEX resin and washing solution were identified as BioRad AG 50W–X4 and 1 mL of 80 % EtOH/0.15 N HCl. Subsequent desorption is achieved using 1 mL of 90 % EtOH/0.9 N HCl. The steps involved are very similar to those used in the standard acetone-based protocol, which has been previously incorporated into the very successful EZAG modules. Therefore, it is feasible that this new ethanol-based protocol could be easily implemented with the same module and others. The  $^{68}\text{Ga}$  is desorbed from the resin with significantly reduced  $^{68}\text{Ge(IV)}$ ,  $\text{Ti(IV)}$  and  $\text{Fe(III)}$  content. Compared to the acetone-based method a 3-fold greater reduction of  $\text{Fe(III)}$  and  $^{68}\text{Ge}$  content in the purified  $^{68}\text{Ga}$ -fraction was achieved.  $\text{Fe(III)}$  has very similar coordination chemistry to that of  $\text{Ga(III)}$ , and is known to form stable complexes with DOTA derivatives. A reduction in the  $\text{Fe(III)}$  content of the purified  $^{68}\text{Ga}$  fraction is an important improvement with regard to labeling yield and specific activities of labeled compound. The  $^{68}\text{Ge}$  content of the purified  $^{68}\text{Ga}$ -eluate is below the detection limit of  $\gamma$ -spectroscopy and adds a decontamination factor of  $>10\,000$  compared to the generator breakthrough. Significantly, the reduction of the initial  $^{68}\text{Ge}$ -breakthrough on the cation-exchangers using the ethanol-based protocol fulfills requirements related to legal considerations relevant to the routine use of the  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generator in nuclear medicine. It is also possible to envision further applications such as the possibility to use two or more  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generators connected in one line eluting onto a single CEX resin.

The processed  $^{68}\text{Ga}$  eluate allows high labeling yields of DOTATOC because of the increased chemical and radiochemical purity. In contrast to the acetone-based protocol, the purified eluate resulting from the ethanol method is more acidic and of little practical use for direct radiolabeling following simple dilution. However, we have shown through the inclusion of a very simple buffer formulation it is possible to produce nearly quantitative yields of  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC within 10 min. The use of ethanol would also preclude the need for quality control of the acetone content.

It also benefits from the presence of ethanol in the labeling solution to act as a stabilizer for radiolytic decomposition of the labeled product. Certain commercial synthesis modules routinely added 1 vol% ethanol to act as a radiolytic stabilizing agent. Using the ethanol-based procedure described the addition of ethanol is already incorporated, thus reducing the number of overall steps to the final injectable solution. Depending on the volume of the labeling solution used, ethanol makes up for between 18 and 45 vol% of the total (based on 1 and 4 mL of the eluting solution respectively).

Further advantages associated with the use of ethanol are the possibilities of facilitate increased rates of radiolabeling [9]. Recently, significant increases in radiochemical yields of trivalent radiometal-ligand complex formation were reported in the presence of ethanol (and other non-aqueous solvents) in the aqueous labeling solutions [9]. In the case of 20–40 vol% ethanol/water mixture,  $^{68}\text{Ga}$  labeling is facilitated at lower temperature, lower precursor concentration and in shorter reaction times.

## Conclusion

An appropriate and efficient protocol for the post-processing of generator-produced  $^{68}\text{Ga}$ , based on cation-exchange chromatography with ethanol/hydrochloric acid media, has been developed. Like that of the acetone-based protocol, this protocol allows for concentration of  $^{68}\text{Ga}$ -generator eluate with only small losses of eluted  $^{68}\text{Ga}$  (~90 % recovery). Quantitative removal of  $^{68}\text{Ge}$ -breakthrough is routinely possible, which ensures that the final injectable radiopharmaceutical fulfills legal requirements relating to the  $^{68}\text{Ge}$  content of the injectable solution relevant to routine medical application of the  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generator. A significant reduction in the Ti(IV) and Fe(III) content was also demonstrated, which promotes the synthesis of radiopharmaceuticals with higher specific activities. Of additional benefit, the use of ethanol facilitates more efficient radiolabeling and enhances the radiolytic stability of the radiolabeled compound. The entire post-processing protocol, including generator elution, can be completed within 5 min and may be easily incorporated into commercially available automated modules. It has been shown that it is possible to prepare  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC, suitable for medical application, with a >99 % radiochemical yield at a lower temperature (80 °C) than that of the standard procedure (95 °C). Because the formulation is free of  $^{68}\text{Ge}$  and final product purification is not necessary, the ethanol-based post-processing is a step towards the kit-type synthesis of  $^{68}\text{Ga}$ -radiopharmaceuticals.

## Referenzen

- [1] W. A. P. Breeman, A. M. Verbruggen, „The  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  generator has high potential, but when can we use  $^{68}\text{Ga}$ -labelled tracers in clinical routine?“, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2007**, *34*, 978–981.

- 
- [2] W. A. P. Breeman, E. d. Blois, H. Sze Chan, M. Konijnenberg, D. J. Kwekkeboom, E. P. Krenning, „ $^{68}\text{Ga}$ -labeled DOTA-Peptides and  $^{68}\text{Ga}$ -labeled Radiopharmaceuticals for Positron Emission Tomography: Current Status of Research, Clinical Applications, and Future Perspectives“, *Sem. Nucl. Med.* **2011**, *41*, 314–321.
- [3] 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  $^{68}\text{Ga}$  for Medical Application“, *J. Nucl. Med.* **2007**, *48*, 1741–1748.
- [4] M. Asti, G. d. 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  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC“, *Nucl. Med. Biol.* **2008**, *35*, 721–724.
- [5] U.S. Environmental Protection Agency, EPA/635/R-03/004, **2003**.
- [6] European Medicines Agency Committee for medicinal products for human use, EMA/CHMP/-ICH/82260/2006, **2011**.
- [7] U.S. Food and Drug Administration, Appendix 6. Toxicological Data For Class 3 Solvents, U.S. Food and Drug Administration.
- [8] N. S. Loktionova, A. N. Belozub, D. V. Filosofov, K. P. Zhernosekov, T. Wagner, A. Türler, F. Rösch, „Improved column-based radiochemical processing of the generator produced  $^{68}\text{Ga}$ “, *Appl. Rad. Isot.* **2011**, *69*, 942–946.
- [9] M. Perez-Malo Cruz, F. Rösch, „Improved efficacy of synthesis of  $^{68}\text{Ga}$ -radiopharmaceuticals in mixtures of aqueous solution and non-aqueous solvents“, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2012**, *39*.

### **3.3 Quantitative online isolation of $^{68}\text{Ge}$ from $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generator eluates for purification and immediate quality control of breakthrough**

**Quantitative online isolation of  $^{68}\text{Ge}$  from  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -  
generator eluates for immediate quality control of  
breakthrough**

**Elisabeth Eppard, Natalia S. Laktionova, Frank Rösch**

Institute of Nuclear Chemistry, Johannes Gutenberg-University of Mainz,  
Fritz-Strassmann-Weg 2, D-55 128 Mainz, Germany

## **Abstract**

The breakthrough of  $^{68}\text{Ge}$  from a  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generator is one of the most sensitive parameters in the context of the clinical application of  $^{68}\text{Ga}$ -radiopharmaceuticals. The difficulty in its determination lies in the “spectroscopic invisibility” of  $^{68}\text{Ge}$  within an excess of  $^{68}\text{Ga}$ .

The introduced method for determining the  $^{68}\text{Ge}$  content of the  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generator eluate involves the quantitative separation of  $^{68}\text{Ga}$  from  $^{68}\text{Ge}$ , using a cation-exchanger.

The eluate contains  $^{68}\text{Ga}$  free of  $^{68}\text{Ge}$ , which can be determined immediately, i. e. prior to the application of the  $^{68}\text{Ga}$ -radiopharmaceutical.

Keywords:  $^{68}\text{Ga}$ ;  $^{68}\text{Ge}$ ; generator; breakthrough; separation

## Introduction

Representative commercially available  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generators provide initial activities of 20 mCi (0.74 GBq), 30 mCi (1.11 GBq), 50 mCi (1.85 GBq) or more of  $^{68}\text{Ge}$  and  $^{68}\text{Ga}$ . In the first weeks of use, elution produces  $^{68}\text{Ga}$ -yields of 60–90 %, accompanied by  $^{68}\text{Ge}$ -breakthrough between  $10^{-2}$  and  $10^{-4}$  % of the respective initial activities [1, 2]. This breakthrough of  $^{68}\text{Ge}$  from a  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generator is a critical parameter in the context of the routine clinical application of  $^{68}\text{Ga}$ -radiopharmaceuticals [3, 4]. Breakthrough refers to the actual  $^{68}\text{Ge}$  load of the generator, and is reported as the activity of  $^{68}\text{Ge}$  in the eluate relative to that on the generator column. This is the preferred definition, but can also be expressed as the activity of  $^{68}\text{Ge}$  co-eluted relative to the  $^{68}\text{Ga}$  present in the eluate fraction [4].

$^{68}\text{Ge}$  decays exclusively by electron capture and therefore can only be radiochemically detected indirectly through the photon emission of its daughter nuclide,  $^{68}\text{Ga}$ . Therefore it is not possible to detect  $^{68}\text{Ge}$  within an excess of  $^{68}\text{Ga}$  using  $\gamma$ -spectroscopy. For a “fresh” 30 mCi generator,  $^{68}\text{Ge}$  activities in the eluate are 3  $\mu\text{Ci}$ –30 nCi (for breakthrough levels of  $10^{-2}$  and  $10^{-4}$  %), within 18–27 mCi of  $^{68}\text{Ga}$  corresponding to 60–90 % initial  $^{68}\text{Ga}$  elution yield. The decay of the eluted  $^{68}\text{Ga}$ , according to its half-life ( $t = 67.71$  min) follows equation 2:

$$A_{\text{Ga}}^t = A_{\text{Ga}}^o \exp(-\lambda t) \quad (1)$$

$$\ln(A_{\text{Ga}}^t) = \ln(A_{\text{Ga}}^o) - \frac{\ln 2}{t_{1/2}} t \approx \ln(A_{\text{Ga}}^o) - 0.01t \quad (2)$$

$A_{\text{Ga}}^o = ^{68}\text{Ga}$  activity immediately after elution;  $A_{\text{Ga}}^t = ^{68}\text{Ga}$  activity at time points  $t$  after elution.

The total activity of  $^{68}\text{Ga}$  in the generator eluate, originates from both by the decay of eluted  $^{68}\text{Ga}$  and  $^{68}\text{Ga}$  generated from the  $^{68}\text{Ge}$  co-eluted. Thus, equation 3 applies:

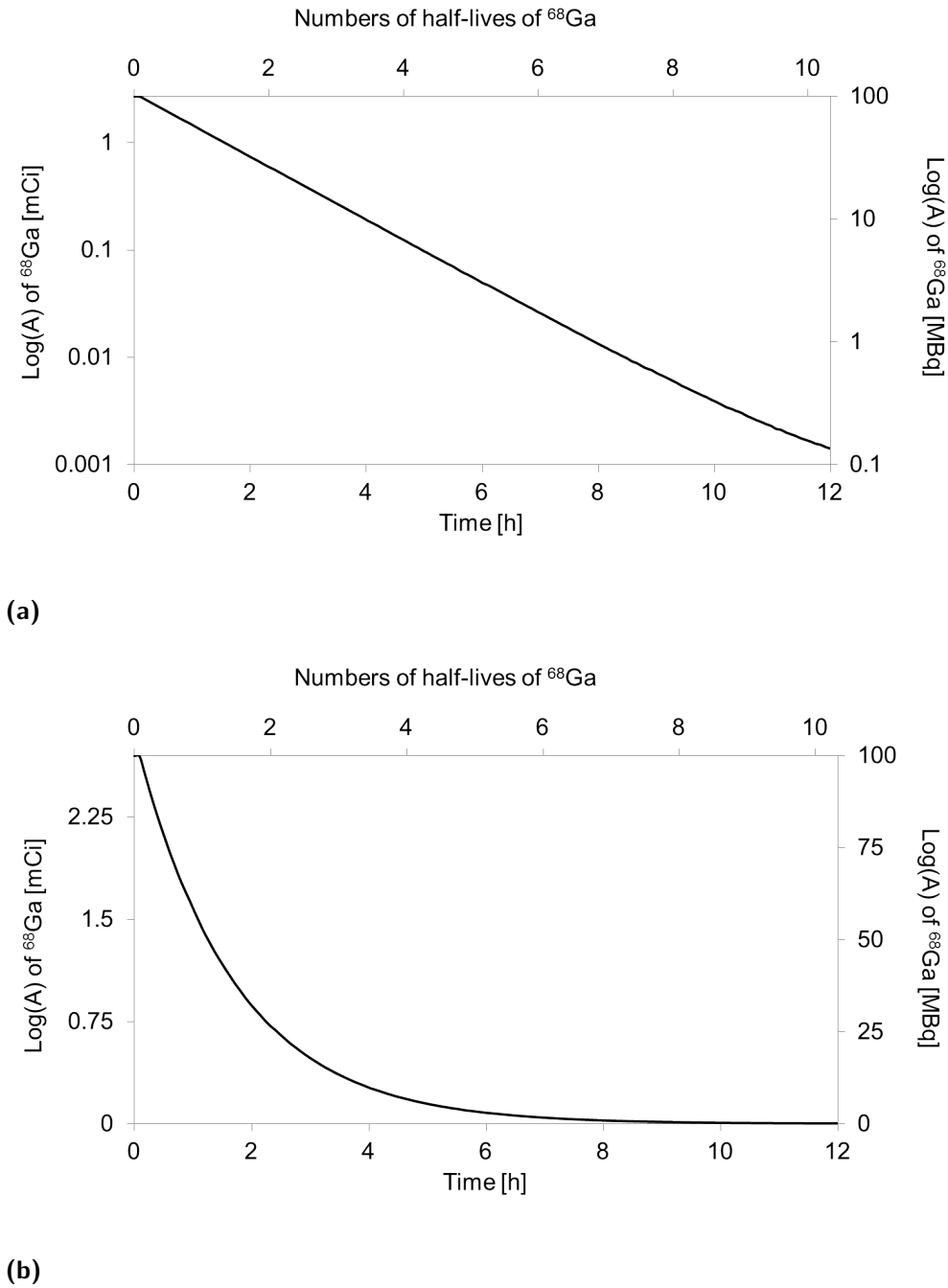
$$A_{\text{Ga}}^t = A_{\text{Ga}}^o \exp(-\lambda_{\text{Ga}} t) + \frac{\lambda_{\text{Ga}}}{\lambda_{\text{Ga}} - \lambda_{\text{Ge}}} A_{\text{Ge}}^o (\exp(-\lambda_{\text{Ge}} t) - \exp(-\lambda_{\text{Ga}} t)) \quad (3)$$

$A_{\text{Ge}}^o = ^{68}\text{Ge}$  activity co-eluted (= breakthrough);  $A_{\text{Ga}}^t = ^{68}\text{Ga}$  activity at time points  $t$  after elution;  
 $\lambda = \frac{\ln 2}{t_{1/2}}$ .

Figure 1 shows the decay of eluted  $^{68}\text{Ga}$  with time (shown in hours, and as the number of  $^{68}\text{Ga}$  half-lives) in linear and logarithmic forms. The  $^{68}\text{Ga}$  activity eluted is reduced to  $10^{-2}$  and  $10^{-3}$  % of the initial activity present in the eluate at 7.5 and 12.0 h post elution, respectively. At these two time points, the



$^{68}\text{Ga}$  activity in the generator eluate equals the  $^{68}\text{Ga}$  activity generated by decay of  $^{68}\text{Ge}$ -breakthrough levels of  $10^{-2}$  and  $10^{-3}$  %, respectively. That is, the measured activity is constant because the rate of  $^{68}\text{Ga}$  decay is equal to rate  $^{68}\text{Ga}$  generation (from  $^{68}\text{Ge}$  decay).



**Fig. 1:** Decay of initially eluted 27 mCi of  $^{68}\text{Ga}$  in terms of real time after elution (lower x-axis) and multiples of half-life of  $^{68}\text{Ga}$  (upper x-axis), with logarithmic (a) or linear scale (b) of activity.

Current methods for the  $\gamma$ -spectroscopic determination of  $^{68}\text{Ge}$  involve storing the generator eluate solutions for long periods, to allow for the complete decay of the excess eluted  $^{68}\text{Ga}$  down to the  $^{68}\text{Ge}$  levels. However, legal regulations governing radiopharmaceutical production require that quality control be completed prior to the clinical application of the radiopharmaceutical. Given the significantly shorter half-life of  $^{68}\text{Ga}$  compared to the time taken for the  $^{68}\text{Ge}$  determination by this method, such a determination is not feasible in clinical application. Obviously then, this method of determination does not fit with the standard protocols for the preparation, application and quality control of  $^{68}\text{Ga}$ -radiopharmaceuticals.

If the level of  $^{68}\text{Ga}$  co-eluted with the  $^{68}\text{Ge}$ -breakthrough was zero, then increasing activities of  $^{68}\text{Ga}$  would be measured. This would occur according to the secular radionuclide generator equilibrium, [5], equation 4 and simplifies to equation 5 when  $A_{\text{Ga}}^0 = 0$ .

$$A_{\text{Ga}}^t = A_{\text{Ge}}^0 \left(1 - \exp\left(-\frac{\ln 2}{t_{1/2}} t\right)\right) \quad (4)$$

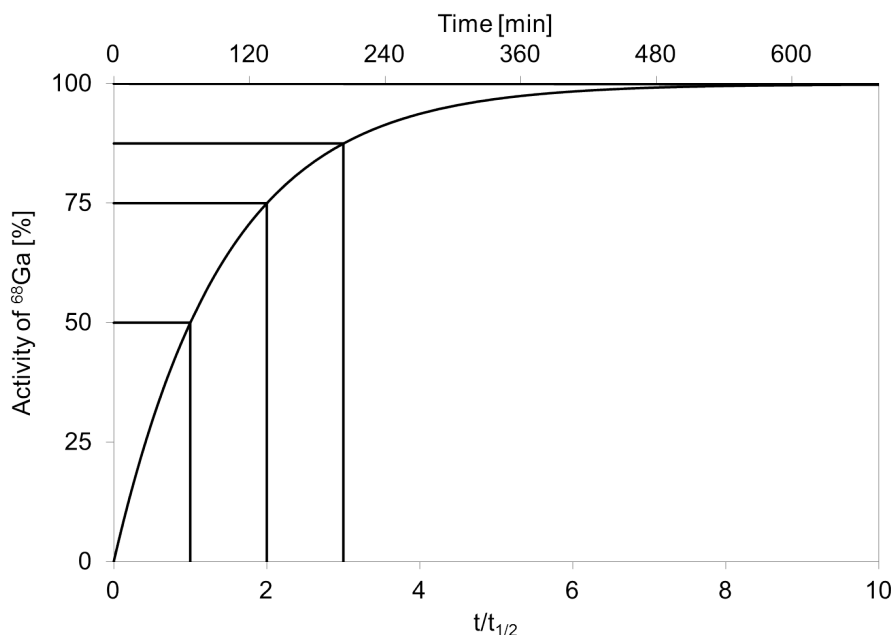
Saturation or equilibrium is obtained when

$$A_{\text{Ga}}^{\text{equ}} = A_{\text{Ge}}^{\text{equ}} \quad (5)$$

Equation 5 is illustrated graphically in Figure 2 over a period of 10 half-lives, where  $^{68}\text{Ge}$  generates  $^{68}\text{Ga}$  from a generator eluate with no initial  $^{68}\text{Ga}$  present. The activity of  $^{68}\text{Ga}$  in an initially pure  $^{68}\text{Ge}$  sample registered at 28.10 and 67.71 min will represent  $\frac{1}{4}$  and  $\frac{1}{2}$  of the total  $^{68}\text{Ge}$  activity initially present. Therefore, under these conditions, it is possible to determine the amount of  $^{68}\text{Ge}$  present by multiplying the  $^{68}\text{Ga}$  activity measured at 28.10 and 67.71 min by a factor of 4 and 2 respectively.

Currently used methods do not permit determination of the  $^{68}\text{Ge}$  level in  $^{68}\text{Ga}$  eluates, prior to the application of  $^{68}\text{Ga}$ -radiopharmaceuticals.

The procedure described in this paper involves the removal of  $^{68}\text{Ga}$  online from the initial generator eluate to obtain a solution completely free of  $^{68}\text{Ga}$ , ( $A_{\text{Ga}}^0 = 0$ ), but containing all of the  $^{68}\text{Ge}$ -breakthrough. This allows the  $^{68}\text{Ge}$  content to be determined free of any activity of eluted  $^{68}\text{Ga}$  immediately after the elution by measuring the growing  $^{68}\text{Ga}$  activity as generated from  $^{68}\text{Ge}$  *in situ*.



**Fig. 2:** Kinetics of the secular equilibrium of the  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  radionuclide generator. 25 and 50 % of the saturation (equilibrium) activity of  $^{68}\text{Ga}$  are being generated after 28.10 and 67.71 min.

Thus, the experimental concept relies on the quantitative separation of  $^{68}\text{Ga}$  from  $^{68}\text{Ge}$  and vice versa. Complete separation is achieved by the quantitative online adsorption of  $^{68}\text{Ga}$  using strong cation-exchangers (CEXs). The use of CEX adsorbers is derived from the well-established concept used for the post-processing commercial “ionic”  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  radionuclide generators to separate  $^{68}\text{Ga}(\text{III})$  and  $^{68}\text{Ge}(\text{IV})$ . Zhernosekov et al. described  $\sim 96\%$  online adsorption of available  $^{68}\text{Ga}$  from 0.1 N HCl eluate solutions onto 53 mg of AG 50W-X8 ( $-400$  mesh, BioRad), whereas  $^{68}\text{Ge}$  was not retained [6]. This is also true for 0.05 N HCl eluting solution as used with organic resin based  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generators, as well as 0.6 N HCl eluting solution as used with  $\text{SnO}_2$ -based inorganic resin generators [1, 2]. The aim of this work was to increase the adsorption potential of the cation-exchange resin from  $\sim 96\%$  to  $100\%$  by increasing the amount of resin and/or altering its constitution.

## Methods

### $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ radionuclide generator

A two years old  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generator (EZAG, Obninsk) with a yield of  $\sim 100$  MBq  $^{68}\text{Ga}$  and a  $^{68}\text{Ge}$ -breakthrough of  $\sim 85$  kBq was used. The generator was eluted with 5 mL of 0.1 N HCl in all cases.

### $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ separation

Two strong acidic CEXs AG 50W–X8 (–400 mesh, BioRad) and SCX (Phenomenex), (cf. Table 1) were investigated for the online separation for  $^{68}\text{Ga}$  and  $^{68}\text{Ge}$ . The CEXs were used separately in different amounts, and in various combinations. In the case of combined resin columns, the generator was eluted first through the AG 50W–X8 and subsequently the SCX column. Table 1 shows a list of the different CEX systems investigated. In order to determine the time required to reach equilibrium of  $A_{\text{Ga}} = A_{\text{Ge}}$ , the elution was performed without a CEX.

$^{68}\text{Ga}$  was adsorbed online by the CEX, whilst  $^{68}\text{Ge}$  was not retained and passed through the CEX into a measuring vial. The radioactivity of the CEX eluate was determined in a Curie-Meter (ISOMED 2010, Nuklear-Medizintechnik Dresden GmbH) every 5 min (automated mode) over the course of at least 20 h. Used CEX were regenerated with 1 mL 4 N HCl followed by 1 mL water.

**Tab. 1:** Amount and combination of the used resins for complete partition of  $^{68}\text{Ge}$  and  $^{68}\text{Ga}$ .

Nr.	AG 50W–X8	SCX
iii	50 mg	–
iv	50 mg	30 mg
v	50 mg	120 mg
vi	220 mg	–
	220 mg	120 mg

## Results and Discussion

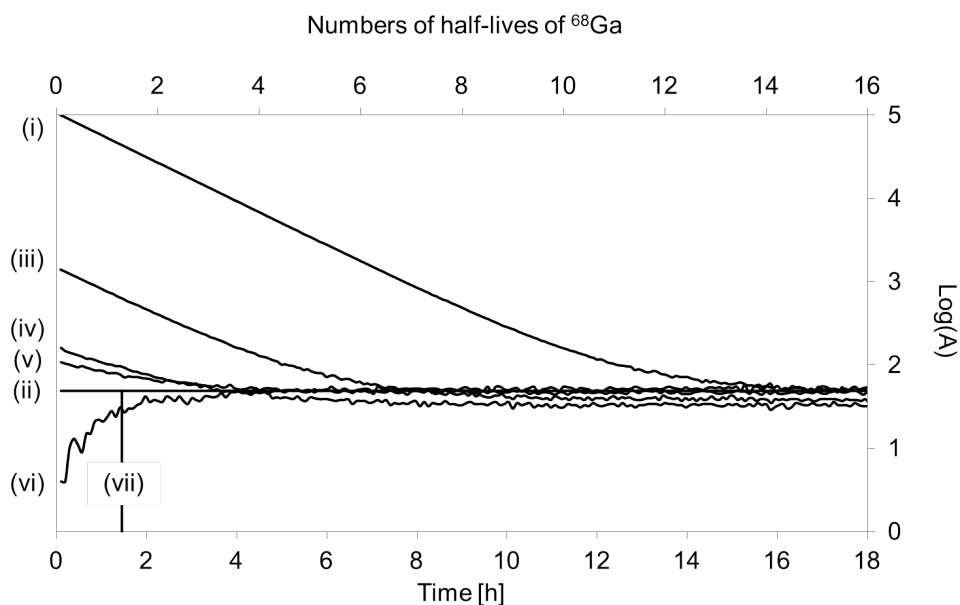
Figure 3 shows the variation of the  $^{68}\text{Ga}$  activity measured using a Curie-Meter over a period of 20 h post generator elution without and with (ii–v) and without (i) online separation via CEXs.

Plot (i) represents the decay of the complete, non-processed, generator eluate. The downward curve represents the overall decreasing fraction of  $^{68}\text{Ga}$  in the waste vial. Line (ii) indicates the level of  $^{68}\text{Ga}$  at  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -equilibrium, i. e. generated by the  $^{68}\text{Ge}$ -breakthrough. A constant level of activity (or count rate) is indicative of a  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -equilibrium. The equilibrium activity depends on concentration of  $^{68}\text{Ge}$  eluted (equation 4) are reached after approximately 18 h.

Plots (iii)–(vi) illustrate the effect increasing adsorption of  $^{68}\text{Ga}$  online has on the activity profile for the various CEX resins and their mass and/or combination used. Plot (iii) reflects the activity profile of the

CEX eluate after using 50 mg of AG 50W–X8 resin to adsorb  $^{68}\text{Ga}$ . Separation efficacy of almost 2 orders of magnitude for  $^{68}\text{Ga}$  was achieved, which is in excellent agreement with the findings of Zhernosekov et al., indicating  $\sim 96\%$  of online  $^{68}\text{Ga}$  adsorption.

The use of 30 (iv) and 120 mg (v) SCX cartridges in combination with 50 mg of AG 50W–X8 further increased the amount of  $^{68}\text{Ga}$  removed from the eluate – note the logarithmic scale used for the activity-axis of Figure 3. Constant absolute activities of  $^{68}\text{Ga}$  are obtained  $\sim 4$  h after elution for CEX systems (iv) and (v), which is a considerable improvement on  $\sim 8$  h required for system (iii). Nevertheless, the initial decrease in activity indicates that there is still an excess of  $^{68}\text{Ga}$  present compared to that generated by  $^{68}\text{Ge}$ .



**Fig. 3:** Results of separation  $^{68}\text{Ga}$  from  $^{68}\text{Ge}$ -breakthrough for selected cation exchange resins.  $^{68}\text{Ga}$  activities measured in kBq. Plot (i) initial, non-processed  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  radionuclide generator eluate over time, with region (ii) equilibrium reflecting the level of  $^{68}\text{Ge}$  activity achieved after about 18 h without purification. Plots (iii), (iv), (v) and (vi) for  $^{68}\text{Ge}$  solutions after application of 50 mg AG 50W–X8, 50 mg AG 50W–X8 + 30 mg SCX, 50 mg AG 50W–X8 + 120 mg SCX and 220 mg AG 50W–X8 + 120 mg SCX, respectively. Line (vii) indicates half of the  $^{68}\text{Ga}$  equilibrium activity measured after 67.7 min post elution representing 50% of the  $^{68}\text{Ge}$  activity present in the case of complete adsorption of  $^{68}\text{Ga}$ .

When 220 mg of AG 50W–X8 (vi) CEX was used, an increasing activity was observed for the purified generator eluate. This increasing activity is indicative of  $^{68}\text{Ga}$  generation by the decay of  $^{68}\text{Ge}$ -breakthrough. Under these conditions the number of  $^{68}\text{Ga}$  atoms present in the processed eluate is lowered by more than one order of magnitude compared to the number of  $^{68}\text{Ge}$  atoms reflecting the breakthrough level.

Therefore, the activity measured, directly represents the activity of  $^{68}\text{Ga}$  generated by  $^{68}\text{Ge}$  in the eluate. It was found that the addition of a 120 mg SCX cartridge to the 220 mg AG 50W–X8 CEX does not further enhance the  $^{68}\text{Ga}$  absorption. Therefore, the using 220 mg AG 50W–X8 alone (or in combination with 120 mg SCX) produces almost quantitative adsorption.

The activity (or count rate) increases for plot (v) according to the secular characteristics of the  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  radionuclide generator equilibrium (equation 4). A plateau is reached at about 4 half-lives ( $\sim 5$  h post elution), which is  $\sim 95$  % of equilibrium. However,  $^{68}\text{Ge}$  activities are quantifiable within 1 h of generator elution. For example, the activity (or count rate) measured at 67.7 min post elution of the generator (after Curie-Meter background subtraction) can be doubled to give the real  $^{68}\text{Ge}$  activity, as at this time point  $^{68}\text{Ga}$  is generated to a 50 % level of equilibrium. This is indicated by line (vii) in Figure 3.

## Conclusions

A simple method for the determination of  $^{68}\text{Ge}$  content in  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generator eluates immediately following generator elution has been described. Importantly, the protocol is suitable for use as a quality control procedure because it can be carried out in a time-frame which allows for subsequent application of the  $^{68}\text{Ga}$ -radiopharmaceutical.

The approach involves quantitative separation  $^{68}\text{Ga}$  from co-eluted  $^{68}\text{Ge}$ , and vice versa.  $^{68}\text{Ga}$  is quantitatively separated from  $^{68}\text{Ge}$  using AG 50W–X8 CEX resin on its own, or in combination with SCX CEX resin. The  $^{68}\text{Ge}$  content in the generator eluate can be quantified directly after the generator elution, by allowing the  $^{68}\text{Ga}$  to “grow” for one (or  $\frac{1}{2}$ ) of its half-lives in the CEX purified  $^{68}\text{Ge}$  fraction.

The protocol described provides instantaneous information on the level of  $^{68}\text{Ge}$  present in  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generator eluates without the use of  $\gamma$ -spectroscopy. In addition to the quality control of radiopharmaceuticals, this protocol may also be used to monitor the  $^{68}\text{Ge}$ -breakthrough levels of generator on a daily/weekly/monthly basis. For example, a Curie-Meter might be calibrated to a certain activity of  $^{68}\text{Ga}$  defining a “critical”  $^{68}\text{Ge}$ -breakthrough. Provided that the activity measured is below the critical level for that time point (e. g. 67.71 min), the processed eluate is within the maximum allowed  $^{68}\text{Ge}$ -content. The European Pharmacopoeia defines a maximum  $^{68}\text{Ge}$ -content of  $10^{-3}$  % [7]. For a new 30 mCi generator, this corresponds to 50 kBq (or less) at 67.71 min (one half-life of  $^{68}\text{Ga}$ ) post elution.

In practice, quality control of  $^{68}\text{Ge}$ -breakthrough would simply involve validating, that the  $^{68}\text{Ga}$  activity in a processed generator eluate (free of eluted  $^{68}\text{Ga}$ ) at 67.71 min post elution remains below that level.

This “preparative” protocol could be, for example, established on a weekly basis to monitor the  $^{68}\text{Ge}$  content of a given  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generator. It could also be useful to follow the long-term performance of a routinely and/or clinically used generator, as it would indicate when the  $^{68}\text{Ge}$ -breakthrough level is no longer acceptable.

The protocol described can be easily implemented with existing methods and modules used for  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generator post-processing. Furthermore, the technology is applicable to all the commercial  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generators, because the CEX resins used are equally effective with a wide range of HCl concentration (0.05–0.6 N).

## Referenzen

- [1] F. Rösch, P. J. Riss, „The Renaissance of the  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  Radionuclide Generator Initiates New Developments in  $^{68}\text{Ga}$  Radiopharmaceutical Chemistry“, *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10*, 1633–1668.
- [2] N. S. Loktionova, A. N. Belozub, D. V. Filosofov, K. P. Zhernosekov, T. Wagner, A. Türler, F. Rösch, „Improved column-based radiochemical processing of the generator produced  $^{68}\text{Ga}$ “, *Appl. Rad. Isot.* **2011**, *69*, 942–946.
- [3] W. A. P. Breeman, A. M. Verbruggen, „The  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  generator has high potential, but when can we use  $^{68}\text{Ga}$ -labelled tracers in clinical routine?“, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2007**, *34*, 978–981.
- [4] W. A. P. Breeman, E. d. Blois, H. Sze Chan, M. Konijnenberg, D. J. Kwekkeboom, E. P. Krenning, „ $^{68}\text{Ga}$ -labeled DOTA-Peptides and  $^{68}\text{Ga}$ -labeled Radiopharmaceuticals for Positron Emission Tomography: Current Status of Research, Clinical Applications, and Future Perspectives“, *Sem. Nucl. Med.* **2011**, *41*, 314–321.
- [5] F. Rösch, F. F. Knapp, *Radionuclide generators: Radiochemistry and Radiopharmaceutical Chemistry in Life Sciences*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, **2003**.

- [6] 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  $^{68}\text{Ga}$  for Medical Application“, *J. Nucl. Med.* **2007**, *48*, 1741–1748.
- [7] European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare, The European Pharmacopoeia, (Ed.: European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare), version 7.8, **2013**.



**3.4 Quality control of  $^{68}\text{Ge}$  content in  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generator eluates and  $^{68}\text{Ga}$  radiopharmaceuticals – a protocol for the determination of the  $^{68}\text{Ge}$  content using thin-layer chromatography**

**Quality control of  $^{68}\text{Ge}$  content in  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generator eluates and  $^{68}\text{Ga}$  radiopharmaceuticals – a protocol for the determination of the  $^{68}\text{Ge}$  content using thin-layer chromatography**

**Elisabeth Eppard, Natalia S. Laktionova, Frank Rösch**

Institute of Nuclear Chemistry, Johannes Gutenberg-University of Mainz,  
Fritz-Strassmann-Weg 2, D-55 128 Mainz, Germany

## **Abstract**

The breakthrough of  $^{68}\text{Ge}$  from a  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generator presently appears to be one of the most critical parameters in the context of the routine clinical application of  $^{68}\text{Ga}$ -radiopharmaceuticals. The developed protocol analytically discriminates  $^{68}\text{Ga}$  and  $^{68}\text{Ge}$  using a suitable thin-layer chromatography (TLC) system. It is applied to the determination of the  $^{68}\text{Ge}$ -breakthrough within ca. 1 h post elution. Through suitable modifications to the TLC system this protocol can also be used to quantify the content of  $^{68}\text{Ge}$  in  $^{68}\text{Ga}$ -radiopharmaceutical preparation prior to their application.

Keywords:  $^{68}\text{Ga}$ ;  $^{68}\text{Ge}$ ; generator; breakthrough; separation; TLC;  $^{68}\text{Ga}$ -radiopharmaceutical;  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC

## Introduction

Commercially available  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generators offer initial activities of 20 (0.74 GBq), 30 (1.11 GBq), 50 (1.85 GBq) or more mCi of  $^{68}\text{Ge}$ . In the first weeks of use, elution yields of  $^{68}\text{Ga}$  reach levels of 60–90 %, including  $^{68}\text{Ge}$  breakthrough levels between  $10^{-2}$  and  $10^{-4}$  % [1, 2]. Breakthrough refers to the actual  $^{68}\text{Ge}$  content in the eluate and is reported as the activity of  $^{68}\text{Ge}$  in the eluate relative to that on the generator column. (Other values express the activity of  $^{68}\text{Ge}$  co-eluted relative to the  $^{68}\text{Ga}$  in the eluate fraction [3].) The issue of  $^{68}\text{Ge}$ -breakthrough is considered by many to be one of the more significant challenges to wider clinical acceptance and application of the promising  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generator. This breakthrough of  $^{68}\text{Ge}$  from a  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generator is a sensitive parameter in the context of the routine clinical application of  $^{68}\text{Ga}$ -radiopharmaceuticals, taking into consideration the quality control requirements of radiopharmaceuticals [3, 4]. A recent report by Velikyan et al. has proposed that the  $^{68}\text{Ge}$  content (resulting from generator breakthrough) in a prepared  $^{68}\text{Ga}$ -radiopharmaceutical is below the toxic level for humans [5]. The current European Pharmacopeia Standards stipulate that the  $^{68}\text{Ge}$  content in generator eluates should not exceed 0.001 % and quality control be conducted on each radiopharmaceutical prior to administration [6].

$^{68}\text{Ge}$  decays exclusively by electron capture, and is therefore only detectable (by radiochemical means) through the positron emission of its daughter nuclide  $^{68}\text{Ga}$ .  $^{68}\text{Ge}$ , even present in small amounts, cannot be detected within an excess of  $^{68}\text{Ga}$ . Recently, we reported a protocol utilized strong cation-exchanger resins to isolate the  $^{68}\text{Ge}$  online, which was then quantified via the decay of its daughter radionuclide  $^{68}\text{Ga}$ , [7]. The  $^{68}\text{Ge}$  content in the generator eluate can be quantified within one (or  $\frac{1}{2}$ ) half-life of  $^{68}\text{Ga}$  after the initial elution, by allowing  $^{68}\text{Ga}$  formed in the purified  $^{68}\text{Ge}$  fraction to decay.

For a “fresh” 30 mCi generator,  $^{68}\text{Ge}$  activities in the eluate are 3  $\mu\text{Ci}$ –30 nCi (for breakthrough levels of  $10^{-2}$  and  $10^{-4}$  %), within 18–27 mCi of  $^{68}\text{Ga}$  corresponding to 60–90 % initial  $^{68}\text{Ga}$  elution. The decay of the eluted  $^{68}\text{Ga}$ , according to its half-life  $t_{1/2}$  of  $^{68}\text{Ga} = 67.71$  min follows equation 2:

$$A_{\text{Ga}}^t = A_{\text{Ga}}^o \exp(-\lambda t) \quad (1)$$

$$\ln(A_{\text{Ga}}^t) = \ln(A_{\text{Ga}}^o) - \frac{\ln 2}{t_{1/2}} t \approx \ln(A_{\text{Ga}}^o) - 0.01 t \quad (2)$$

$A_{Ga}^o$  =  $^{68}Ga$  activity immediately after elution;  $A_{Ga}^t$  =  $^{68}Ga$  activity at time points  $t$  after elution.

The total activity of  $^{68}Ga$  in the generator eluate, is represented both by the decay of  $^{68}Ga$  eluted and the generation of  $^{68}Ga$  from the  $^{68}Ge$  co-eluted. Thus, equation 3 applies:

$$A_{Ga}^t = A_{Ga}^o \exp(-\lambda_{Ga} t) + \frac{\lambda_{Ga}}{\lambda_{Ga} - \lambda_{Ge}} A_{Ge}^o \exp(-\lambda_{Ge} t) - \exp(-\lambda_{Ga} t) \quad (3)$$

$A_{Ge}^o$  =  $^{68}Ge$  activity co-eluted (= breakthrough);  $A_{Ga}^t$  =  $^{68}Ga$  activity at time points  $t$  after elution;  
 $\lambda = \frac{\ln 2}{t_{1/2}}$ .

This equation simplifies, supposed the level of  $^{68}Ga$ , co-eluted with the  $^{68}Ge$ -breakthrough, would be zero. In this case increasing activities of  $^{68}Ga$  will be measured due to the  $^{68}Ge$ -breakthrough according to the secular radionuclide generator equilibrium [8], equation 3 and simplifies to equation 4 with  $A_{Ga}^o = 0$ .

$$A_{Ga}^t = A_{Ge}^o (1 - \exp(-\frac{\ln 2}{t_{1/2}} t)) \quad (4)$$

Saturation or equilibrium is obtained when

$$A_{Ga}^{equ} = A_{Ge}^{equ} \quad (5)$$

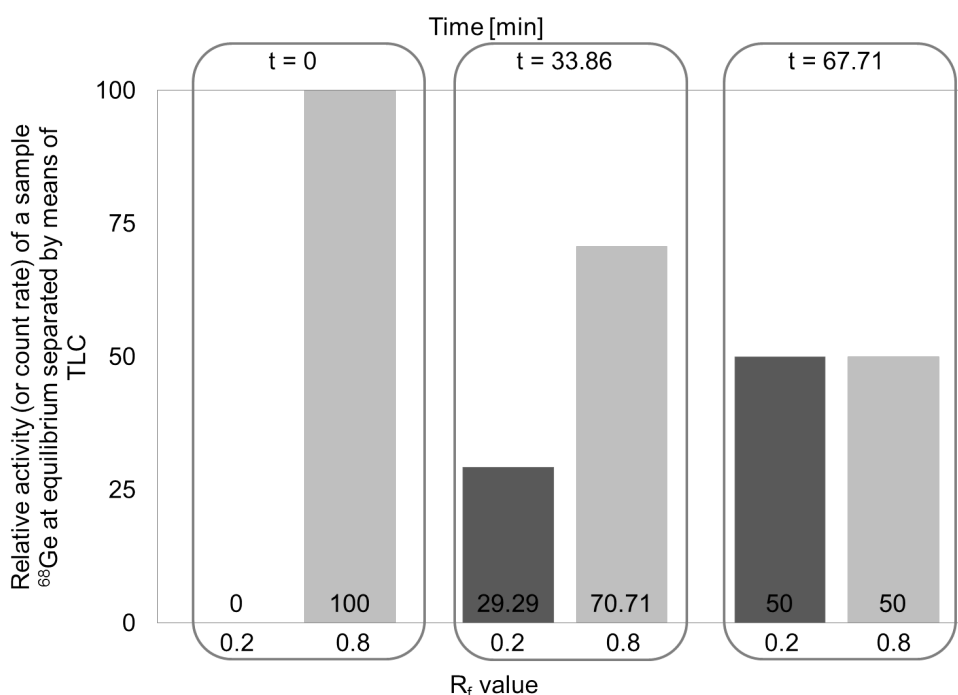
The activity of  $^{68}Ga$  in a pure  $^{68}Ge$  sample registered at 28.10 and 67.71 min will represent  $\frac{1}{4}$  and  $\frac{1}{2}$  of the total  $^{68}Ge$  activity present respectively. Therefore, it becomes possible to determine the amount of  $^{68}Ge$  present by multiplying the  $^{68}Ga$  activity measured at 28.10 and 67.71 min by a factor of 4 and 2, respectively.

Within framework of quality control of  $^{68}Ga$ -radiopharmaceuticals, TLC is commonly used to analyze the labeling yield and product purity of  $^{68}Ga$  species using the different  $R_f$  values of the individual  $^{68}Ga$  species. Similarly, Ge(IV) and Ga(III) species may behave differently depending on the nature of the chosen stationary and mobile phases [9]. In principle, when the resolution between the different species is sufficient it becomes possible to determine the  $^{68}Ge$  content easily and quickly. Of course, the  $^{68}Ge$  species would not be visible directly after TLC development. It requires time to decay to its daughter

---

radionuclide by electron capture, which is followed by the detectable positron emission of  $^{68}\text{Ga}$ . Thus the  $^{68}\text{Ge}$  TLC “spot” is allowed to decay for a known amount of time ( $\frac{1}{4}$  or  $\frac{1}{2}$  of one half-life of  $^{68}\text{Ga}$ ) to generate  $^{68}\text{Ga}$  before the TLC plate is analyzed. “Spots” pertaining to the different metallo-radionuclides are easily identified since those of the  $^{68}\text{Ga}$  species shows decreasing radioactivity, in contrast to an increase for the TLC spot of  $^{68}\text{Ge}$  (assuming perfect separation of the different species).

Figure 1 shows a hypothetical profile of a  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  sample analyzed by TLC, which has equal activities of  $^{68}\text{Ga}$  and  $^{68}\text{Ge}$ . The  $^{68}\text{Ge}$  and  $^{68}\text{Ga}$  species have been assigned arbitrary  $R_f$  values of 0.2 and 0.8 respectively. The theoretical activities of each spot are shown at  $t = 0$ , 33.86 ( $\frac{1}{2}$  of one half-life of  $^{68}\text{Ga}$ ) and 67.71 min (one half-life of  $^{68}\text{Ga}$ ) post generator elution. There is a relationship between rate at which  $^{68}\text{Ge}$  decay is observed for the  $^{68}\text{Ge}$  spot, and the amount of  $^{68}\text{Ge}$  initially present.



**Fig. 1:** Hypothetical profile of a  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  sample at equilibrium when analyzed by TLC. The  $^{68}\text{Ge}$  and the  $^{68}\text{Ga}$  species have been assigned arbitrary  $R_f$  values 0.2 and 0.8, respectively. At  $t = 0$  there will be zero activity for the  $^{68}\text{Ge}$  spot and maximum activity for the  $^{68}\text{Ga}$  spot (= 100 %). [Note: this neglects the nuclear transformations which occur during the time required for TLC development and scan to be performed ( $\sim 10$  min)]. Approximately 33.9 min later, a second scan would detect  $^{68}\text{Ga}$  activity at the spot of the  $^{68}\text{Ge}$  species equal to 29 % of saturation (equation 3), whilst the activity originating from the spot of the initial  $^{68}\text{Ga}$  activity ( $R_f = 0.8$ ) decreased to 71 % of the initial value. A final scan at  $t = 67.71$  min of that TLC plate would represent equal activities, i. e. the  $^{68}\text{Ga}$  activity detected at the position of the  $^{68}\text{Ge}$  spot equals  $\frac{1}{2}$  of the  $^{68}\text{Ge}$  initially present.

This approach can be applied also to investigate the presence of  $^{68}\text{Ge}$  in a  $^{68}\text{Ga}$ -labeled product such as  $^{68}\text{Ga}$ -labeled peptides, for detecting traces of  $^{68}\text{Ge}$  remaining in final injectable solution. It requires an appropriate TLC system, able to discriminate between the  $^{68}\text{Ge}$  and two  $^{68}\text{Ga}$  species, the  $^{68}\text{Ga}$ -radiopharmaceutical and un-complexed  $^{68}\text{Ga}$ . To make this feasible, different radiopharmaceuticals may require tailor-made TLC systems. In this report  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC, which is used in the imaging of neuroendocrine tumors through its binding to overexpressed somatostatin receptors, was selected as for a proof-of-principle study.

## Methods

### $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ radionuclide generator

A two year old  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generator (EZAG, Obninsk) with a yield of  $\sim 100$  MBq  $^{68}\text{Ga}$  and a  $^{68}\text{Ge}$ -breakthrough of about 85 kBq was used. The generator was eluted with 5 mL of 0.1 N in all cases. Another generator was used to extract its  $^{68}\text{Ge}$  activity in order to obtain a stock solution of  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  in equilibrium (1.35 MBq  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  in 5 mL of 0.1 N).

### $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC

DOTATOC (21 nmol) was labeled using 0.4 mL of the  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generator eluate (not post-processed) and 0.6 mL 0.2 M  $\text{CH}_3\text{COONa}$  buffer (pH = 4) in 10 min at 95 °C. The  $R_f$  value of  $^{68}\text{Ga}$ -labeled DOTATOC was determined for solvents a)–e).

### Thin-layer chromatography

Table 1 shows five mobile phases investigated for the separation of  $^{68}\text{Ge}$  and  $^{68}\text{Ga}$  via TLC (65 mm, Silica Gel 60 TLC strips, MERCK). Four mobile phases according to Mirzadeh and Lambrecht [9], and the widely used 0.1 M citrate buffer (pH = 4) were studied. In all cases only freshly prepared solutions were used, which is especially important for mobile phases c) and e). In both cases, self-condensation of the organic solvent takes place and the  $R_f$  values of the species in the mobile phase changes.

For TLC analytics, 2  $\mu\text{L}$  aliquot samples from either the generator eluate or the solution containing  $^{68}\text{Ga}$ -labeled product were spotted on the TLC plates. Following TLC development, the distribution of  $^{68}\text{Ge}$  and  $^{68}\text{Ga}$  was detected using an instant-imager (Instant Imager<sup>®</sup>, Packard Canberra) at 0, 1, 2, 3, 4, 5,

10, 15, 20, 25 and 30 h after TLC development.

**Tab. 1:** TLC mobile phases and the  $R_f$ -values for  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ge}$  and  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC

	Mobile phase	$R_f$ values		
		$^{68}\text{Ga(III)}$	$^{68}\text{Ge(IV)}$	$^{68}\text{Ga-DOTATOC}$
a	0.1 M citric buffer (pH = 4)	1	1	0.1–0.2
b	5 % NaCl:MeOH:25 % $\text{NH}_3$ (3:1:1)	0	0.4–0.6	0.1–0.2
c	2 M HCl:acetone (1:1)	1	0.1	0.4
d	0.01 M $\text{NaC}_4\text{H}_5\text{O}_6$ :MeOH (3:1)	0	0.4	0.1–0.2
e	cyclohexanone:2 M HCl (20:1)	0.4–0.5	0.1–0.2	0

### Measurement of radioactivity

Quantitative analysis of low activities of  $^{68}\text{Ge}$  sensitive detection systems in short acquisition times is mandatory. In this context, the detection limits for two different instant imagers (Instant Imager<sup>®</sup>, Packard Canberra and Rita Star<sup>®</sup>, Raytest-Isotopenmessgeräte GmbH) were investigated. The stock solution contained 0.118 MBq  $^{68}\text{Ge}$  in 5 mL from which ten dilutions were made (cf. Table 2). Aliquots (4  $\mu\text{L}$ ) were removed from each and spotted on a single cellulose strip (150 mm  $\times$  10 mm). The assessment was carried out by spotting known amounts of activities onto a cellulose strip and recording the activity present, in both imagers, after 10 and 30 min measurement of  $^{68}\text{Ge}$ . The cellulose strip was not developed.

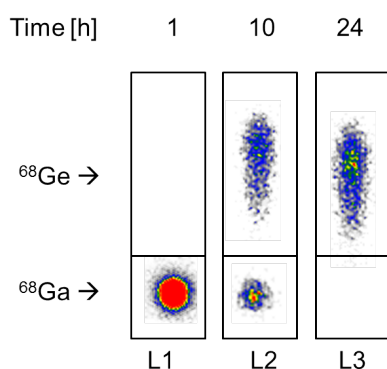
**Tab. 2:** Dilutions made from  $^{68}\text{Ge}$  stock solution. An aliquot represents 4  $\mu\text{L}$  of the overall 400  $\mu\text{L}$   $^{68}\text{Ga}$  (= 1 %).

No.	Aliquot [Bq]	Aliquot [mol]
1	47.200	$2.647 \times 10^{-15}$
2	23.600	$1.324 \times 10^{-15}$
3	11.800	$6.617 \times 10^{-16}$
4	5.900	$3.309 \times 10^{-16}$
5	2.950	$1.655 \times 10^{-16}$
6	1.475	$8.272 \times 10^{-17}$
7	0.738	$4.136 \times 10^{-17}$
8	0.369	$2.068 \times 10^{-17}$
9	0.184	$1.034 \times 10^{-17}$
10	0.092	$5.170 \times 10^{-18}$



## Results and Discussion

A TLC system is required which can be used to differentiate between  $^{68}\text{Ga}$  (30–50 kBq for this set up) and the relative small amount of  $^{68}\text{Ge}$  ( $\sim 34$  Bq Bq for this set up) present in the generator eluate. With the exception of the 0.1 M citrate buffer, all of the investigated mobile phases proved useful for discriminating  $^{68}\text{Ge}$  from  $^{68}\text{Ga}$  under these conditions. Only in the case of the 0.1 M citrate buffer mobile phase, the separation of the species on the TLC was insufficient. The observed  $R_f$  values of the different species for each mobile phase are summarized in Table 1. Figure 2 shows a TLC plate with  $^{68}\text{Ge}$  and  $^{68}\text{Ga}$ , developed using mobile phase b). As expected, the measurement taken directly after the development of the TLC plate almost exclusively represents the initial  $^{68}\text{Ga}$  activity (not shown). In order to detect  $^{68}\text{Ge}$ , follow-up scans are required at later time points. The follow-up scans were recorded at 1 (L1), 10 (L2) and 24 (L3) h post TLC development.

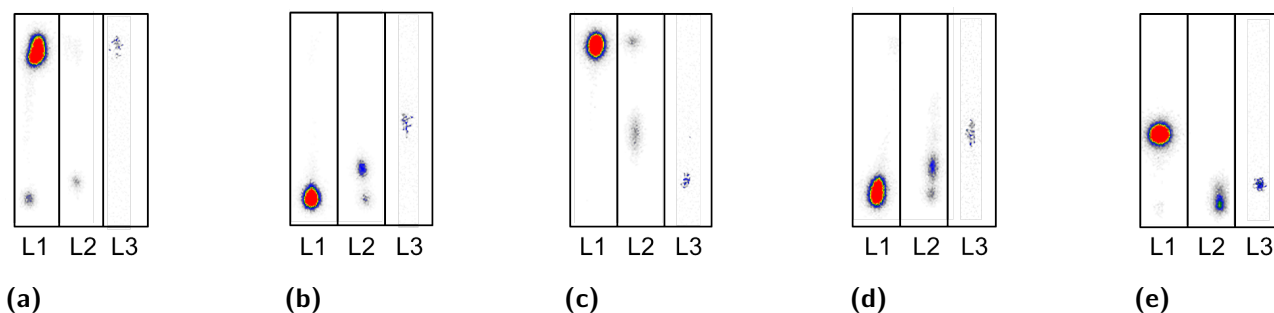


**Fig. 2:** Same TLC plate of  $^{68}\text{Ge}$  and  $^{68}\text{Ga}$  developed with mobile phase c) measured at 1, 10 and 24 h after TLC development.

While the activity of the  $^{68}\text{Ga}$  spot decreases, the  $^{68}\text{Ge}$  spot shows an increasing count rate consistent with the generation of its daughter radionuclide. The determination of the count rate at 67.71 min after the development of the TLC plates represents half of the total activity of  $^{68}\text{Ge}$  present. Using the calibration between the observed count rate and absolute activity, the breakthrough of  $^{68}\text{Ge}$  can be quantified quickly, i. e. approximately one hour after generator elution or labeling.

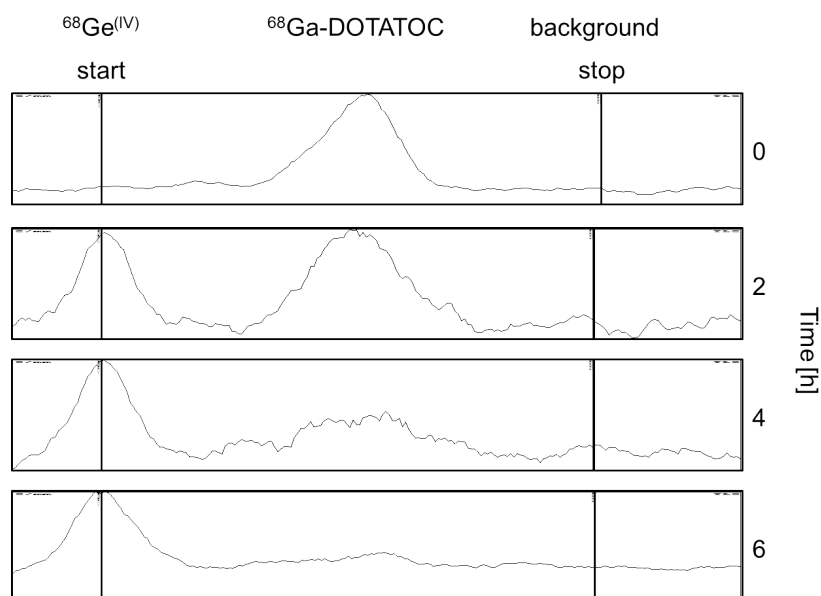
When this approach is used to determine the  $^{68}\text{Ge}$  content of a radiopharmaceutical, the mobile phases should be suitable for discriminating  $^{68}\text{Ge}$  species, un-complexed  $^{68}\text{Ga}$  and labeled  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC in activity ratios of 1:100 and 10 000 respectively (assuming a 99 % radiochemical yield for  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC). As depicted in Figure 3, the solvent mixtures b), c) and d) are most suitable for the separation of free

$^{68}\text{Ga}$  (L1),  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC (L2) and  $^{68}\text{Ge}$  (L3).



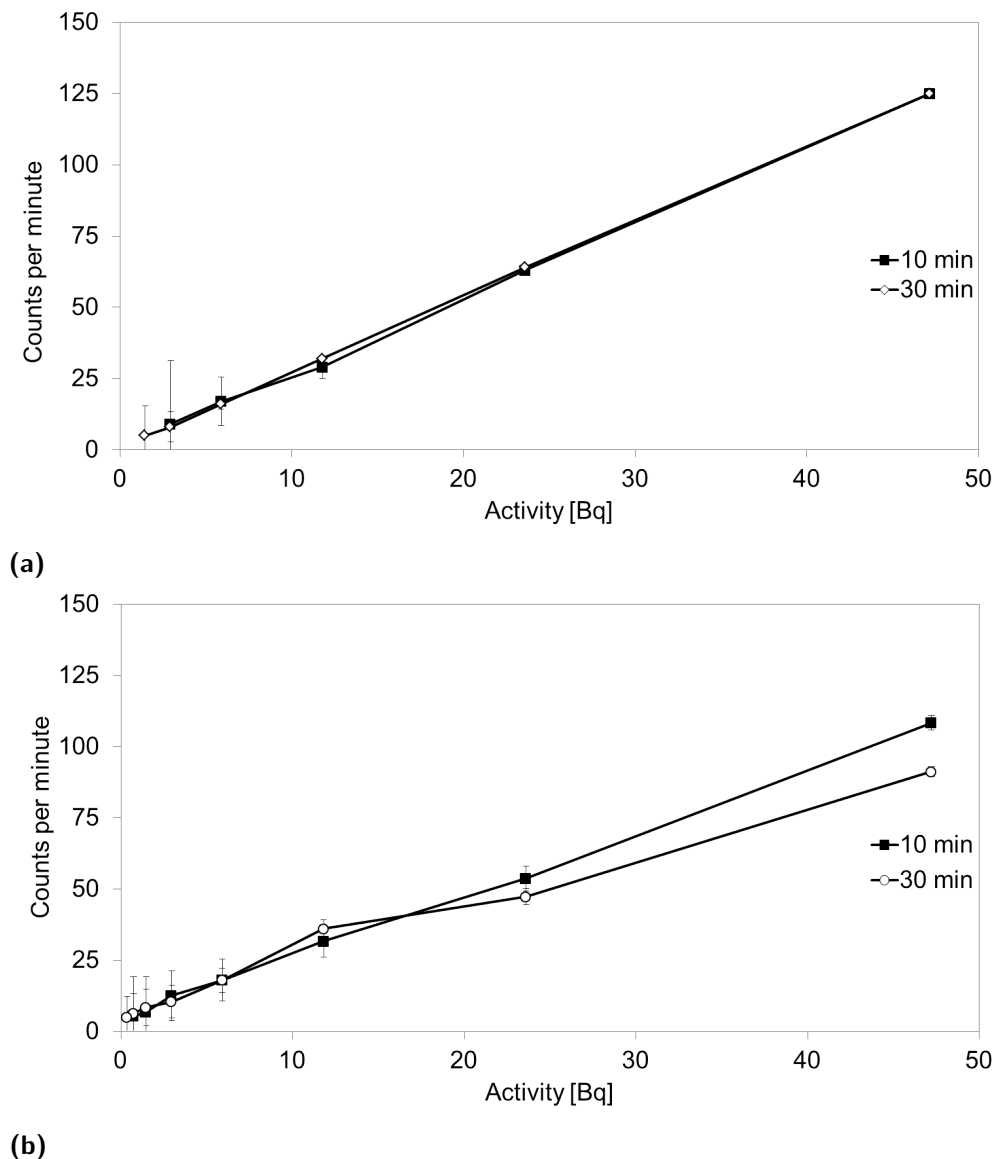
**Fig. 3:** TLC plates developed with mobile phases (a)–(e) (Tab. 2). Lanes: L1 =  $^{68}\text{Ga}$ ; L2 =  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC and unlabeled free  $^{68}\text{Ga}$ ; L3 =  $^{68}\text{Ge}$ .

A population distribution map of a TLC plate spotted with a sample of  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC containing 0.5 mL  $^{68}\text{Ge}$  from  $^{68}\text{Ge}$  stock solution and developed with mobile phase c) is shown in Figure 4 at 0, 2, 4 and 6 h after TLC development. The activity of the  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC spot ( $R_f = 0.4$ ) decreases corresponding to the half-life of  $^{68}\text{Ga}$ . In parallel, the  $^{68}\text{Ge}$  spot ( $R_f = 0.1$ ) shows an increasing count rate, also corresponding to the half-life of  $^{68}\text{Ga}$  being generated *in situ*. Utilizing a calibration between count rate and absolute activity, the content of  $^{68}\text{Ge}$  in a  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC sample can be quantified one hour after labeling.



**Fig. 4:** TLC analysis of a  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC preparation developed in TLC solvent mixture c), 2 M HCl/acetone (1:1) and measured at 0, 2, 4 and 6 h after TLC development. The y-axis represents maximum relative count-rates.

Using the Instant Imager<sup>®</sup> (Packard Canberra) <sup>68</sup>Ge could be detected as low as 5.90–2.95 Bq ( $10^{-16}$  mol) levels at 10 and 30 min respectively. Rita Star<sup>®</sup> (Raytest-Isotopenmessgeräte GmbH) was considerably more sensitive, detecting activities of 0.74–0.18 Bq ( $10^{-17}$  mol) at 10 and 30 min respectively. Using a calibration for both systems enables fast quantification of <sup>68</sup>Ge content in aliquots of a sample solution. Linear regression of the obtained results, leads to a linear equation which is depending on the used detector system.



**Fig. 5:** Calibration for <sup>68</sup>Ge-breakthrough quantification for (a) Instant Imager<sup>®</sup> (Packard Canberra) and (b) Rita Star<sup>®</sup> (Raytest-Isotopenmessgeräte GmbH) for 10 and 30 min of measurement.

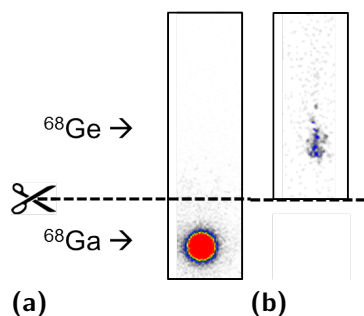
The linear regression for the calibration of the Instant Imager<sup>®</sup> (Packard Canberra), 10 min measurement, leads to equation 6:

$$y = 2.6344x + 0.4167 \quad (6)$$

$$x = \frac{(y - 0.4167)}{2.6344} \quad (7)$$

$y$  = counts per minute measured within 10 min;  $x$  = activity in Bq spotted on TLC.

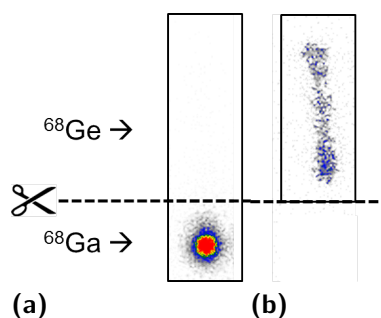
From initial  $^{68}\text{Ga}$  eluate, 4  $\mu\text{L}$  were spotted on a TLC and developed with mobile phase b). Figure 6a shows the TLC measured directly after development without cutting.  $^{68}\text{Ga}$  remains at the starting point with  $R_f = 0$ . After that, the TLC is cut at  $R_f = 0.3$  and measured for 10 min (Fig. 6b). Now the  $^{68}\text{Ge}$  spot can be analyzed. The measured value for counts per minute is inserted in equation 7, which leads to an amount of 12.75 Bq  $^{68}\text{Ge}$  in the 4  $\mu\text{L}$  aliquot and correspondingly 15.93 kBq in initial  $^{68}\text{Ge}$  eluate. To determine the absolute  $^{68}\text{Ge}$  activity in the initial eluate the value of 15.93 kBq is inserted in equation 4, which leads to an absolute  $^{68}\text{Ge}$ -breakthrough of 147.83 kBq.



**Fig. 6:** TLC analysis of initial eluate developed in mobile phase b), 5 % NaCl:MeOH:25 %  $\text{NH}_3$  (3:1:1), measured (a) directly after TLC development and (b) directly after cutting the TLC at  $R_f = 0.3$

To a solution of 1 mL  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC were 0.4 mL out of the  $^{68}\text{Ge}$  stock solution (35.84 kBq  $^{68}\text{Ge}$ ) were added, and a 4  $\mu\text{L}$  aliquot spotted on a TLC and developed with mobile phase d). Due to regular fluctuations in  $^{68}\text{Ge}$ -breakthrough and dilution effects it was decided to add a known amount of  $^{68}\text{Ge}$  to the  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC solution. Figure 7a shows the TLC plate measured directly after TLC development without cutting.  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC remains near the starting point at  $R_f = 0.1$ . After that, the TLC is cut at  $R_f = 0.3$ – $0.35$  and measured for 10 min (Fig. 7b). Now the  $^{68}\text{Ge}$  spot can be analyzed. The measured value for counts per minute is inserted in equation 7 which leads to an amount of 106.42 Bq  $^{68}\text{Ge}$  in the

4  $\mu\text{L}$  aliquot and correspondingly 37.25 kBq in the  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC solution. Minus the added amount of  $^{68}\text{Ge}$  (35.84 kBq) 1.41 kBq  $^{68}\text{Ge}$  are present in the  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC solution. To determine the absolute  $^{68}\text{Ge}$  activity in the solution the value of 1.41 kBq is inserted in equation 4, which leads to an absolute  $^{68}\text{Ge}$  content of 13.01 kBq.



**Fig. 7:** TLC analysis of  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC preparation developed in mobile phase d), 0.01 M  $\text{NaC}_4\text{H}_5\text{O}_6$ :MeOH (3:1), measured (a) directly after TLC development and (b) directly after cutting the TLC at  $R_f = 0.3-0.35$ .

It is demonstrated that  $^{68}\text{Ge}$ -breakthrough can be determined in initial generator eluate and  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC solutions under usual conditions. The overall process of development and measurement of the TLC takes less than 30 min. Therefore it is possible to quantify the amount of  $^{68}\text{Ge}$  in generator eluate and finished radiopharmaceuticals prior to its application.

## Conclusions

A TLC system was identified which allows for the discrimination of  $^{68}\text{Ge}$  and  $^{68}\text{Ga}$  eluted from the generator. The TLC plates as analyzed (either by scans or instant imagers) one hour post TLC-development allows the relative and initial levels of  $^{68}\text{Ge}$  present in the initial generator eluate to be determined. The novel protocol allows for quick and reliable determination of  $^{68}\text{Ge}$  activity levels in  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generator eluate, without the use of  $\gamma$ -spectroscopy.

An extension of this analytical method may be applied to the quality control of individual batches of a  $^{68}\text{Ga}$ -labeled radiopharmaceutical. As demonstrated for  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC, it permits quality control prior to injection of  $^{68}\text{Ga}$ -radiopharmaceuticals. Therefore, a novel technology has been described which provides analytical determination on the level of  $^{68}\text{Ge}$  present in  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generator eluates and  $^{68}\text{Ga}$ -radiopharmaceuticals in a time frame useful for their further application.

---

## Referenzen

- [1] F. Rösch, P. J. Riss, „The Renaissance of the  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  Radionuclide Generator Initiates New Developments in  $^{68}\text{Ga}$  Radiopharmaceutical Chemistry“, *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10*, 1633–1668.
- [2] N. S. Loktionova, A. N. Belozub, D. V. Filosofov, K. P. Zhernosekov, T. Wagner, A. Türler, F. Rösch, „Improved column-based radiochemical processing of the generator produced  $^{68}\text{Ga}$ “, *Appl. Rad. Isot.* **2011**, *69*, 942–946.
- [3] W. A. P. Breeman, E. d. Blois, H. Sze Chan, M. Konijnenberg, D. J. Kwekkeboom, E. P. Krenning, „ $^{68}\text{Ga}$ -labeled DOTA-Peptides and  $^{68}\text{Ga}$ -labeled Radiopharmaceuticals for Positron Emission Tomography: Current Status of Research, Clinical Applications, and Future Perspectives“, *Sem. Nucl. Med.* **2011**, *41*, 314–321.
- [4] W. A. P. Breeman, A. M. Verbruggen, „The  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  generator has high potential, but when can we use  $^{68}\text{Ga}$ -labelled tracers in clinical routine?“, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2007**, *34*, 978–981.
- [5] I. Velikyan, G. Antoni, J. Sörensen, S. Estrada, „Organ biodistribution of Germanium-68 in rat in the presence and absence of [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTA-TOC for the extrapolation to the human organ and whole-body radiation dosimetry“, *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2013**, *3*, 154–165.
- [6] European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare, The European Pharmacopoeia, (Ed.: European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare), version 7.8, **2013**.
- [7] E. Eppard, N. S. Loktionova, F. Rösch, „Quantitative online isolation of  $^{68}\text{Ge}$  from  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  generator eluates for purification and immediate quality control of breakthrough“, *Appl. Rad. Isot.* **2013**, *82*, 45–48.
- [8] F. Rösch, F. F. Knapp, *Radionuclide generators: Radiochemistry and Radiopharmaceutical Chemistry in Life Sciences*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, **2003**.
- [9] S. Mirzadeh, R. M. Lambrecht, „Radiochemistry of germanium“, *J. Radioanalyt. Nucl. Chem.* **1996**, *202*, 7–102.

### **3.5 Radiolabeling of DOTATOC with the long-lived positron emitter $^{44}\text{Sc}$**

# **Radiolabeling of DOTATOC with the long-lived positron emitter $^{44}\text{Sc}$**

**Marek Pruszynski<sup>1</sup>, Agnieszka Majakowska-Pilip<sup>1</sup>, Natalia S. Laktionova<sup>2</sup>,  
Elisabeth Eppard<sup>2</sup>, Frank Rösch<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Centre of Radiochemistry and Nuclear Chemistry, Institute of Nuclear Chemistry and Technology,  
Dorodna 16, 3-195 Warszawa, Poland

<sup>2</sup>Institute of Nuclear Chemistry, Johannes Gutenberg-University of Mainz,  
Fritz-Strassmann-Weg 2, D-55 128 Mainz, Germany



## Abstract

The positron-emitting radionuclide  $^{44}\text{Sc}$  with a half-life of 3.97 h and a  $\beta^+$  branching of 94.3% is of potential interest for clinical PET. As so far it is available from a  $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ -generator in Mainz, where long-lived  $^{44}\text{Ti}$  decays to no-carrier-added (nca)  $^{44}\text{Sc}$ . The  $^{44}\text{Sc}$  is a trivalent metal cation and should be suitable for complexation with many well established bifunctional chelators conjugated to peptides or other molecular targeting vectors. Thus, the aim of this work was to investigate the potential of  $^{44}\text{Sc}$  for labeling of DOTA-conjugated peptides. DOTA-D-Phe<sup>1</sup>-Tyr<sup>3</sup>-octreotide (DOTATOC) was used as a model molecule to study and optimize labeling procedure. Reaction parameters such as buffer conditions, concentration of peptide, pH range, reaction temperature and time were optimized. Addition of 21 nmol of DOTATOC to  $^{44}\text{Sc}$  in ammonium acetate buffer pH 4.0 provided labeling yields >98% within 25 min of heating in an oil-bath at 95 °C. This time can be reduced to 3 min only by applying microwave supported heating.  $^{44}\text{Sc}$ -DOTATOC was found to be stable in 0.9% NaCl, PBS (pH 7.4), fetal calf and human serums, and also in the presence of competing metal cations ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ), as well as other ligand competitors, like EDTA and DTPA, even after almost 25 h incubation at 37 °C. Present study shows that nca  $^{44}\text{Sc}$  forms stable complexes with the macrocyclic ligand DOTA and that  $^{44}\text{Sc}$ -DOTATOC and analog targeting vectors may be synthesized for further preclinical and clinical investigations.

Keywords:  $^{44}\text{Sc}$ ;  $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ -radionuclide generator; positron emitter; DOTATOC; molecular imaging; PET/CT

## Introduction

Positron emission tomography has become a powerful and widely used imaging technology in the last decade. While the basic principles of PET are similar to those of SPECT, PET systems are generally more sensitive than SPECT, have better spatial resolution and provide the possibility of more accurate attenuation correction [1, 2]. In fact, recent PET imaging is dominated by the use of short-lived radionuclides such as  $^{18}\text{F}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$  and  $^{15}\text{O}$  produced in on-site accelerators and mostly applied in the same medical centers. However, PET could expand beyond the large medical centers and become a truly routine clinical tool in the case additional sources of long-lived positron-emitting radionuclides are available. One possibility is to supply hospitals with “non-standard/unconventional” PET radionuclides directly produced at cyclotrons, e. g.  $^{76}\text{Br}$  (16.1 h),  $^{124}\text{I}$  (4.2 d),  $^{89}\text{Zr}$  (78.4 h),  $^{64}\text{Cu}$  (12.7 h) or  $^{86}\text{Y}$  (14.7 h) [3–5].

Another source of positron-emitting radionuclides is a radionuclide generator system, similar to the  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ -generator commonly used in SPECT. For PET, such a generator should consist of a long-lived parent radionuclide absorbed on a column from which a shorter-lived, positron-emitting decay product is eluted by passing a suitable solvent through the column. The interest on application of metallic radionuclides, especially generator-based, for PET diagnosis is increasing during the recent years. An excellent example of this trend is a  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generator which provides high (85 %)  $\beta^+$  branching  $^{68}\text{Ga}$  ( $t_{1/2} = 67.7$  min) from long-lived  $^{68}\text{Ge}$  ( $t_{1/2} = 270.8$  d) [6]. This generator is turning into an important source of new  $^{68}\text{Ga}$ -labeled radiopharmaceuticals for routine use in clinical PET/CT. However, PET imaging with  $^{68}\text{Ga}$  may be restricted by its rather short physical half-life, especially when proteins with long biological half-lives, like monoclonal antibodies or their fragments, are used. Therefore, intense studies focused on development of generators providing radionuclides with longer physical half-life, such as  $^{72}\text{As}$  ( $t_{1/2} = 26$  h) from the  $^{72}\text{Se}/^{72}\text{As}$ -generator, or  $^{44}\text{Sc}$  ( $t_{1/2} = 3.97$  h) from the  $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ -generator [7]. Especially, the latter radionuclide with its convenient physicochemical properties can find an application in PET.  $^{44}\text{Sc}$  has almost 4-times longer half-life and higher  $\beta^+$  branching than commonly used  $^{68}\text{Ga}$ . Its decay product nuclide,  $^{44}\text{Ca}$ , is stable and non-toxic.  $^{44}\text{Sc}$  can be obtained from a  $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ -generator.  $^{44}\text{Ti}$  is obtained in reaction  $^{45}\text{Sc}(p, 2n)^{44}\text{Ti}$  and decays by electron capture into  $^{44}\text{Sc}$ . The  $^{44}\text{Ti}$ , with its long half-life of  $59.27 \pm 0.60$  years, could provide a cyclotron-independent source of  $^{44}\text{Sc}$  for several decades [8–10]. Several approaches have been investigated in the past to develop the chem-

istry of  $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ -generators [11–14]. Recently, Filosofov et al. (2010) described a 185 MBq (5 mCi) generator system with the relevant radiochemical parameters, such as >97 % elution efficacy for  $^{44}\text{Sc}$  and very low breakthrough of  $<5 \times 10^{-5}$  % of  $^{44}\text{Ti}$ . This generator was further studied in the terms of post-processing of the eluate in order to provide high radiochemical purity and radionuclide concentration batches of  $^{44}\text{Sc}$  in an aqueous system applicable to subsequent labeling reactions [15].

Direct production of  $^{44}\text{Sc}$  consists in bombarding enriched with  $^{44}\text{Ca}$  target with proton beam [3, 16]. The production of this radionuclide by ARRONAX group is considered as a “great interest at short term” together with other PET radionuclides like  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{82}\text{Rb}$  or  $^{124}\text{I}$ , and even before other positron emitters such as  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{89}\text{Zr}$  or  $^{52}\text{Fe}$  (8.3 h) [3].

The  $^{44}\text{Sc}$  with its physicochemical properties of a trivalent rare earth metal appears to be appropriate candidate in PET/CT diagnosis. It may be used to synthesize radiopharmaceuticals based on bifunctional chelators (DOTA, DTPA, NOTA, etc. ) established to coordinate currently used trivalent radionuclides in diagnosis and therapy, such as  $^{68}\text{Ga}$  and  $^{111}\text{In}$  or  $^{90}\text{Y}$  and  $^{177}\text{Lu}$ , as well as non-radioactive Gd(III). As a relatively longer-lived  $\beta^+$  emitter, it could be used for more accurate planning and dosimetric calculations in endoradiotherapy based on the radionuclides mentioned above, but also for direct matching  $\beta^-$  emitting  $^{47}\text{Sc}$  radiopharmaceuticals [17]. Thus,  $^{44}\text{Sc}/^{47}\text{Sc}$  can join the other matched pairs of  $\beta^+/\beta^-$  radionuclides, which would permit coordinated dosimetric PET imaging and therapy.

Macrocyclic chelators are well known to form stable complexes with metal cations and are of great interest for radiopharmaceutical design. DOTA-conjugated peptides, such as octreotide and octreotate derivatives or substance P, as well as some small proteins, e. g. affibodies or nanobodies, are readily labeled with metal radionuclides e. g.  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{177}\text{Lu}$  or  $^{213}\text{Bi}$  [18–21].

The aim of this work was to determine optimal conditions for radiolabeling DOTA-conjugated octreotides using DOTATOC as a model molecule. Parameters that influence reaction kinetics, like incubation time and temperature, amount of chelate-peptide and pH of the reaction were investigated. Influence of microwave supported heating on time and completeness of complexation reaction was compared with the conventional heating method in an oil-bath. Stability of the formed conjugate was checked in 0.9 % NaCl, phosphate buffered-saline (PBS, pH 7.4), fetal calf and human serums, and in the presence of different metal cations as well as other competing chelators, like EDTA and DTPA.

---

## Materials and Methods

### Chemicals and reagents

DOTA-D-Phe<sup>1</sup>-Tyr<sup>3</sup>-octreotide (DOTATOC) was obtained as GMP-grade from piChem R&D (Graz, Austria) and an aqueous stock solution of 1 mg/mL was prepared. All chemicals were analytical or pure reagent grade and used as received unless otherwise specified. Deionized Milli-Q water (18.2 MΩ cm; Millipore) was used in all reactions. Fetal Calf Serum (FCS) and Human Serum Albumin (HSA) were purchased from Sigma-Aldrich (USA).

### <sup>44</sup>Sc and the <sup>44</sup>Ti/<sup>44</sup>Sc radionuclide generator

<sup>44</sup>Sc was available from <sup>44</sup>Ti/<sup>44</sup>Sc-generator system developed in Mainz with <sup>44</sup>Ti adsorbed onto column filled with anion-exchange resin BioRad AG 1-X8 (200–400 mesh, Cl<sup>-</sup>-form). <sup>44</sup>Sc was eluted with 20 mL of 0.005 M H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/0.07 M HCl mixture [10]. The eluate was directly post-processed on miniaturized column filled with cation-exchange resin AG 50W-X8 (200–400 mesh, H<sup>+</sup>-form, 53 mg) where <sup>44</sup>Sc was quantitatively adsorbed online and successively eluted using 2–3 mL of 0.25 M ammonium acetate buffer (pH 4.0) [15]. This <sup>44</sup>Sc solution of small volume and free of competing oxalates was used for further labeling studies.

Measurement of <sup>44</sup>Sc radioactivity was accomplished using a dose calibrator Aktivitätsmessgerät M 2316 (Messelektronik, Dresden GmbH). The absolute radioactivity and purity of <sup>44</sup>Sc was measured by γ-ray spectrometry with a high-purity germanium (HPGe) well counter detector using both 1157.2 and 1499.4 keV γ-lines.

### Labeling of DOTATOC with <sup>44</sup>Sc

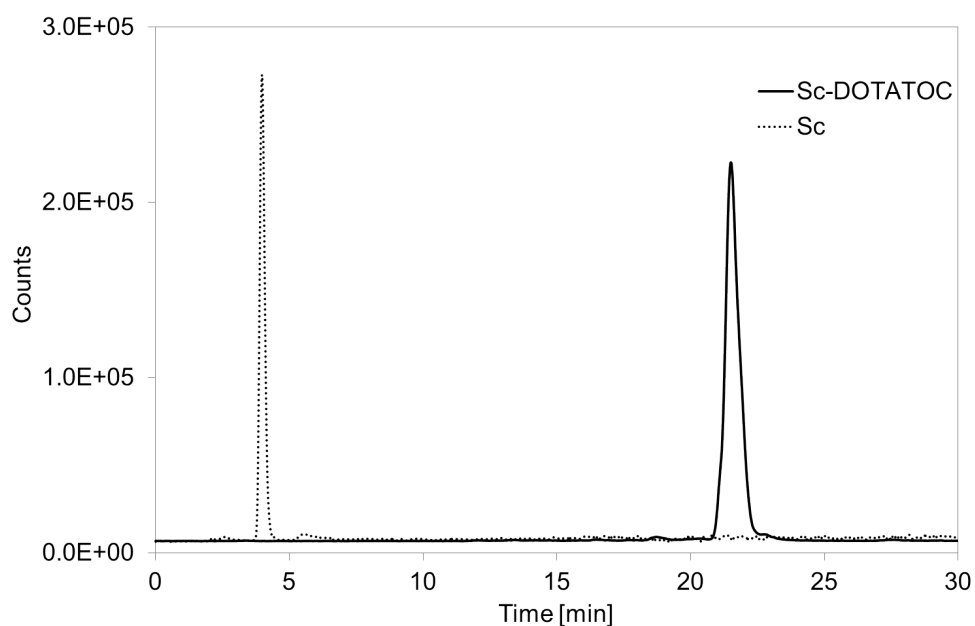
Labeling of DOTATOC with <sup>44</sup>Sc was performed by mixing different volumes of DOTATOC stock-solution (1 mg/mL) with post-processed <sup>44</sup>Sc eluate in 0.25 M ammonium acetate buffer pH 4.0 and heating mixtures in an oil-bath. Optimization of labeling reaction was performed varying incubation time and temperature, changing concentration of DOTATOC and pH of reaction mixtures. Optimization of each parameter was repeated 3–4 times in separate experiments. Effect of DOTATOC concentration on labeling yields was evaluated with quantity of peptide being varied from 7 to 28 nmol. Solutions were heated for 30 min at 95 °C. Influence of temperature and incubation time on reaction yield was inves-

tigated by heating solutions containing  $^{44}\text{Sc}$  and 21 nmol of DOTATOC at 40, 80, 95 and 115 °C for up to 30 min. Effect of pH on  $^{44}\text{Sc}$ -DOTATOC formation was determined by addition of 100–250 mL of concentrated HCl or NaOH to the mixture of 21 nmol DOTATOC with  $^{44}\text{Sc}$  in ammonium acetate buffer (pH 4.0) up to desired pH. Solutions were heated again for 30 min at 95 °C. The pH of reaction mixture was measured before and after heating.

### Quality control

Radiochemical analysis of  $^{44}\text{Sc}$ -DOTATOC formation was performed mostly using thin-layer chromatography (TLC). The TLC plates (Silica-gel 60, Merck) were developed by three different solutions: (a) 0.1 M sodium citrate pH 4.0; (b) mixture of 5 % NaCl with MeOH (3:1); and (c) mixture of 5 % NaCl with MeOH and 25 %  $\text{NH}_3$  (3:1:1). Quantitative distribution of radioactivity on TLC plates was measured using an electronic autoradiography system and associated software (Instant Imager®, Packard Canberra). The  $R_f$  values for free  $^{44}\text{Sc}$  and  $^{44}\text{Sc}$ -DOTATOC conjugate were determined. If TLC plates were developed with 0.1 M sodium citrate pH 4.0, free uncomplexed  $^{44}\text{Sc}$  moved almost with front of the developing solution with  $R_f = 0.8$ , whereas  $^{44}\text{Sc}$ -DOTATOC remained at the origin with  $R_f = 0$ . Using 5 % NaCl with MeOH (3:1) as solvent resulted in the following  $R_f$  values: 0 and 0.3 for free  $^{44}\text{Sc}$  and  $^{44}\text{Sc}$ -DOTATOC, respectively. Addition of 25 %  $\text{NH}_3$  aq. to 5 % NaCl with MeOH (3:1:1) caused hydrolysis of unchelated free  $^{44}\text{Sc}$  ( $R_f = 0$ ), whereas  $^{44}\text{Sc}$ -DOTATOC moved with front of the developing solution ( $R_f = 0.9$ ). All three TLC developing solutions were used for analysis of each sample giving very good results of distinction between free  $^{44}\text{Sc}$  and  $^{44}\text{Sc}$ -DOTATOC.

RP-HPLC with LiChrosphere 100-RP18EC column (5 mm, 250 mm × 4 mm) was used to quantify the amount of  $^{44}\text{Sc}$ -DOTATOC formation. HPLC was performed using Hitachi L-7100 pump system coupled with UV (Hitachi L-7400) and radiometric (Gamma Raytest) detectors. Solvents for HPLC were obtained as HPLC grade and degassed by ultrasonication for 15–20 min just before use. The gradient elution system utilized mobile phase A (deionized  $\text{H}_2\text{O}$ ) and mobile phase B (100 % acetonitrile) and flow rate of 0.8 mL/min, starting with 82 % A/18 % B for 2 min, then the gradient was increased to 30 % B over the next 25 min and then held at 30 % B for 6 min, after which gradient parameters returned to the initial conditions during next 2 min. Mobile phase A contained 0.01 % TFA. The retention time of free  $^{44}\text{Sc}$  was  $R_t = 3.2$  min, whereas for  $^{44}\text{Sc}$ -DOTATOC it was 21.5 min (Fig. 1).



**Fig. 1:** Representative RP-HPLC radiochromatogram of free uncomplexed  $^{44}\text{Sc}$  and  $^{44}\text{Sc}$ -DOTATOC.

### **Microwave supported labeling of DOTATOC with $^{44}\text{Sc}$**

Influence of microwave heating on radiolabeling of DOTATOC with  $^{44}\text{Sc}$  was determined under the optimal conditions found during optimization studies. Therefore, samples were prepared by mixing 21 nmol of DOTATOC with post-processed  $^{44}\text{Sc}$  eluate and after exposed to microwave radiation. Commercially available LabMate microwave unit (CEM, Matthews, NC, USA) was used for these studies. This fully-automated device enables exposition of sample to microwave radiation and also provides process control according to time, radiation power, temperature and pressure in a hermetically sealed autoclave. Samples prepared in special pressurized glass vessels (delivered with LabMate) were sealed by Teflon coated cork and put into the apparatus single-mode cavity which were exposed to microwave radiation. Device was set to the PowerMax mode, with temperature of sample kept at fixed value of  $\sim 95^\circ\text{C}$  during the whole period of microwave heating. Stable temperature was achieved by continuous automatic temperature measurements and automatically-controlled changes in microwave power mode and simultaneous cooling of sample by compressed-air during heating. The yield of  $^{44}\text{Sc}$ -DOTATOC formation was determined by TLC analysis at conditions mentioned above.

### **Solid phase extraction (SPE)**

$^{44}\text{Sc}$ -labeled DOTATOC was purified from unreacted  $^{44}\text{Sc}$  species by reversed-phase chromatography. Mini C-18 cartridges (Phenomenex Strata-X Tube, 30 mg) were first equilibrated with 2 mL ethanol and later rinsed with 10 mL water. Then, reaction mixture with  $^{44}\text{Sc}$ -DOTATOC was passed through cartridge providing quantitative retention of both the chelated and non-chelated radionuclide. After washing cartridge with 5 mL water,  $^{44}\text{Sc}$ -DOTATOC was recovered from column with 400  $\mu\text{L}$  of pure ethanol.

### **Stability studies**

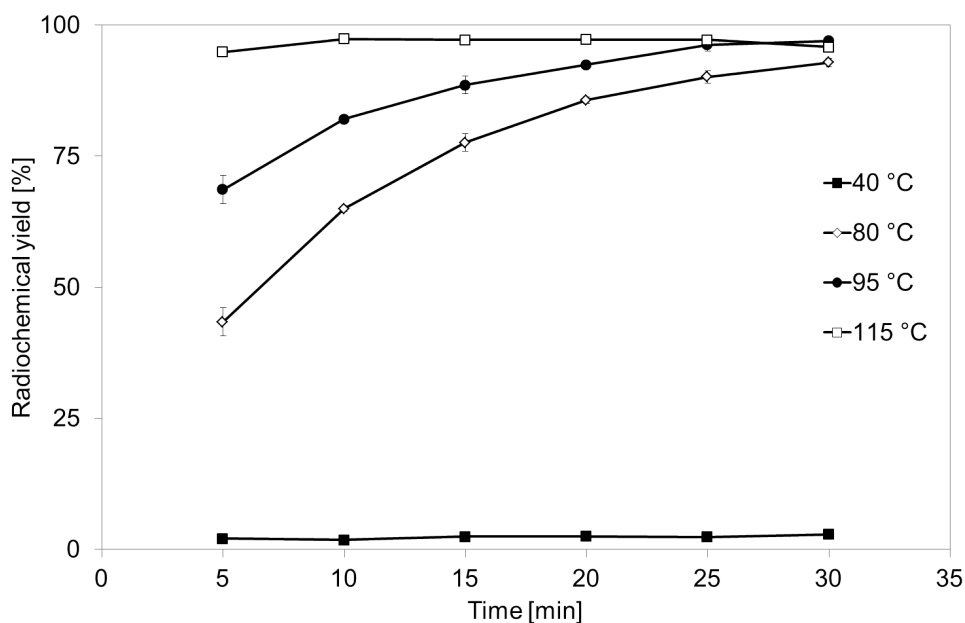
$^{44}\text{Sc}$ -DOTATOC of radiochemical purity >98 % was used for stability studies. Every experiment was repeated 3–4 times. Stability studies of  $^{44}\text{Sc}$ -DOTATOC in 0.9 % NaCl and PBS (pH 7.4) were performed by addition 20 mL of purified  $^{44}\text{Sc}$ -DOTATOC conjugate to 500  $\mu\text{L}$  of pre-warmed 0.9 % NaCl or PBS. Solutions were incubated for 22 h at 37 °C. Stability in fetal calf serum and human serum albumin were performed in similar way and incubated for 24 h at 37 °C.

Stability of  $^{44}\text{Sc}$ -DOTATOC was also monitored in solutions containing different metal cations, e. g.  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  at concentration levels of  $10^{-2}$  M each. The 20  $\mu\text{L}$  purified fraction of  $^{44}\text{Sc}$ -DOTATOC was added to 500  $\mu\text{L}$  of an aqueous solution containing one of the metal cations. Solutions were incubated for 25 h at 37 °C. Studies with DTPA and EDTA were also performed to check the stability of synthesized  $^{44}\text{Sc}$ -DOTATOC in the presence of competing chelating ligands. The appropriate aliquots of purified  $^{44}\text{Sc}$ -DOTATOC were added to DTPA or EDTA solutions in 0.9 % NaCl in such a way that the final molar ratio of DTPA or EDTA to conjugate was equal to 100:1. The final volume of all solutions was 500  $\mu\text{L}$ . Solutions were incubated at 37 °C up to 25 h. From all studied solutions adequate aliquots were taken at every time point and analyzed by TLC according to procedures described above. Also RP-HPLC quality control studies were done.

### **Results and Discussion**

Macrocyclic chelators are widely used in radiopharmacy for metallic radionuclides complexation, because they offer higher stability compare to acyclic ones, e. g. thermodynamic stability constant ( $\log K$ ) of Sc(III) with DOTA is 27.0, whereas for Sc(III)-DTPA it is 20.99 [22, 23]. However, the complex formation with macrocyclic DOTA derivatives generally requires heating at elevated temperatures in contrast to open-

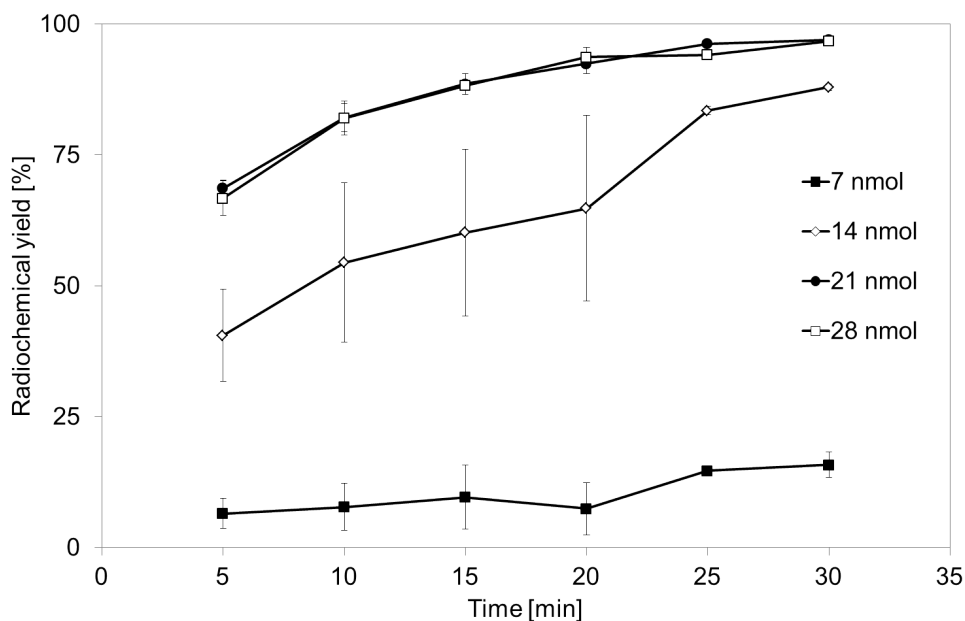
chain analogues. Therefore, influence of temperature on  $^{44}\text{Sc}$ -DOTATOC formation was evaluated and results are presented on (Fig. 2).



**Fig. 2:** Formation of  $^{44}\text{Sc}$ -DOTATOC at pH 4.0 as a function of heating at different temperatures (21 nmol DOTATOC,  $n = 4$ ).

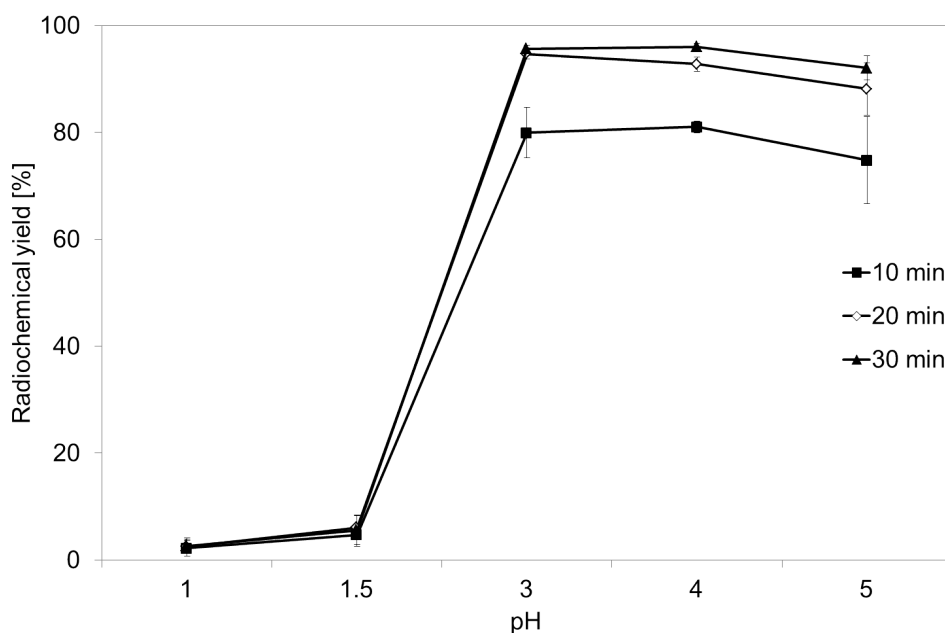
Incubation at 40 °C revealed around 5 % yield of  $^{44}\text{Sc}$ -DOTATOC complex even after 30 min of heating. Increasing temperature resulted in higher yields, e.g. yield approached 100 % after 5 min at close to 100 °C (oil-bath temperature 115 °C). Because of an intensive bubbling of the aqueous solution and its high vapping at this temperature, a temperature of 95 °C was selected for further studies. The overall radiolabeling yield for  $^{44}\text{Sc}$ -DOTATOC was >98 %, when 21 nmol of peptide was added to post-processed  $^{44}\text{Sc}$  eluate (pH 4.0) and heated in an oil-bath for 25 minutes at 95 °C (Fig. 3). Increasing amount of peptide up to 28 nmol did not influence the reaction yield.





**Fig. 3:** Time course of  $^{44}\text{Sc}$  complexation reaction forming  $^{44}\text{Sc}$ -DOTATOC with different amounts of DOTA-TOC at pH 4.0 ( $T = 95^\circ\text{C}$ ,  $n = 4$ ).

Scandium belongs to the transition metals group and its complex formation should strongly depend on pH of aqueous solution. Therefore, pH was considered to be an important parameter during optimization studies. The highest reaction yield was obtained, when pH was kept between 3 and 4 (Fig. 4). Increasing pH up to 5 caused slow decrease in labeling yield due to the hydrolysis of  $^{44}\text{Sc}(\text{III})$ . Acidifying the solution to  $\text{pH} < 2$  resulted in an extreme drop of labeling yields, probably due to the protonation of DOTA chelator. This study confirmed that previously developed method of post-elution processing of  $^{44}\text{Sc}$ -generator eluate and its final elution with acetate buffer (pH 4.0) gives not only high  $^{44}\text{Sc}$  recovery, but also enables direct labeling of DOTA-conjugated tracers [15].



**Fig. 4:** Formation of  $^{44}\text{Sc}$ -DOTATOC as a function of pH (21 nmol DOTATOC,  $T = 95\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $n = 4$ ).

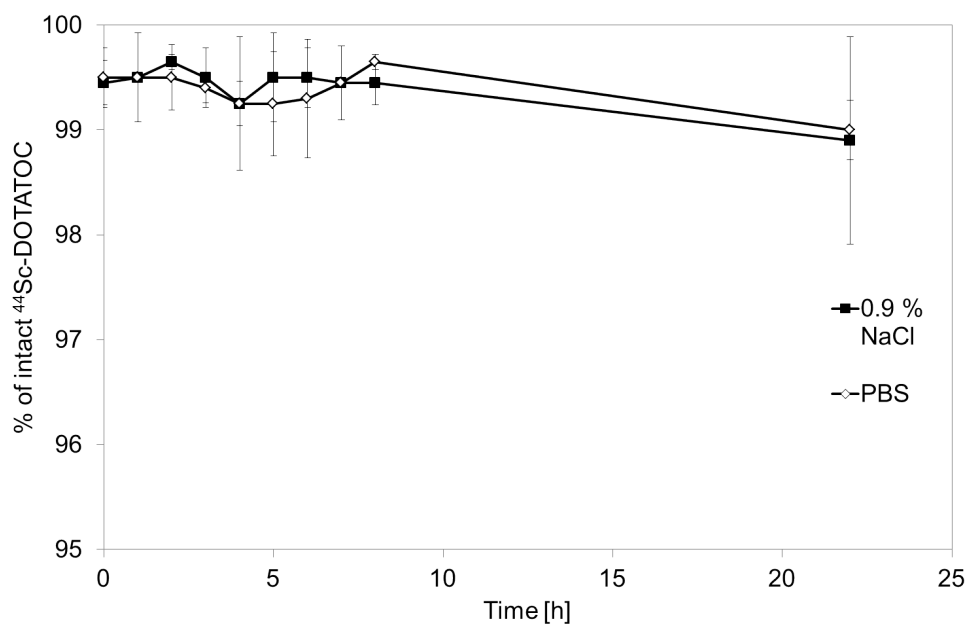
Reaction time is a crucial factor when short-lived radionuclides are used for labeling. Microwave-assisted synthesis is commonly used in organic chemistry, because it enhances chemical yields by reducing reaction time without causing major degradation or introducing undesired by-products and it also improves reproducibility [24]. This technique has been used for labeling organic molecules with  $^{18}\text{F}$  [25, 26], but also in synthesis and complex formation with other radiohalogens such as  $^{123}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$  [27, 28]. Microwave heating has already shown its potential in increasing yield and shortening time of  $^{68}\text{Ga}$  complexation with DOTA- and NOTA-conjugated oligonucleotides and peptides [29, 30]. The influence of microwave supported heating on  $^{44}\text{Sc}$ -DOTATOC formation is demonstrated in Table 1. After 1 min of microwave heating, the reaction yield was  $>95\%$  and increased up to 98 % during next 2 min. Thus, it was confirmed that exposition of reaction mixture to microwave heating considerably shortened the reaction time.

In both cases of  $^{44}\text{Sc}$ -DOTATOC formation, i. e. conventional and microwave supported heating, the radiochemical purity was mostly  $>98\%$  and additional purification of the product was not necessary. However, to remove acetate ions, the purification was easily performed on RP C-18 mini-cartridge Strata-X and conjugate was recovered in 400  $\mu\text{L}$  fraction of pure ethanol with  $\sim 94\%$  efficacy and containing  $<0.9\%$  free  $^{44}\text{Sc}$ . Ethanol could be removed in the stream of nitrogen at room temperature and dried residue reconstituted in PBS.

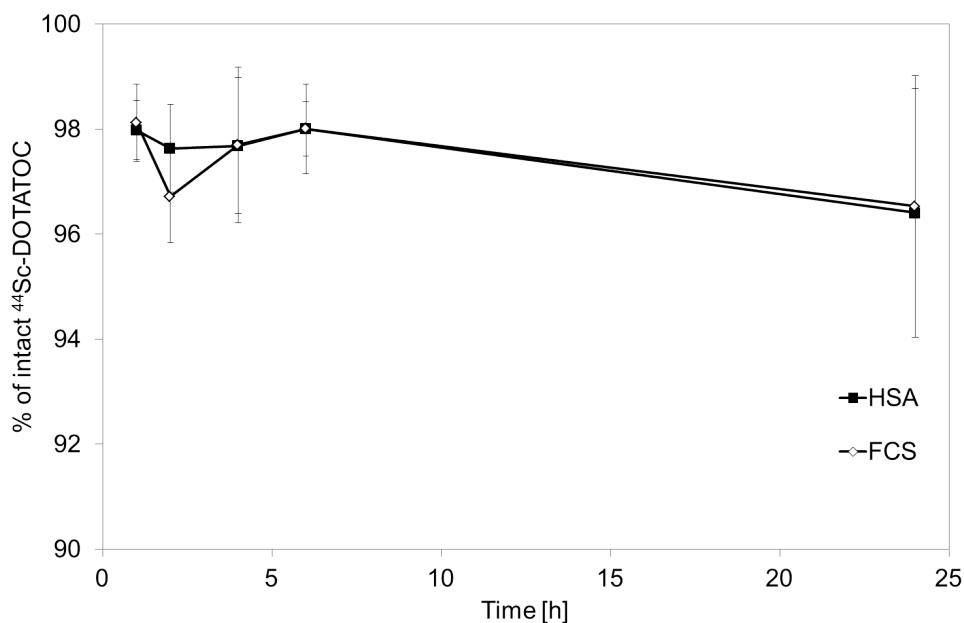
**Tab. 1:** Influence of microwave heating on the yield of  $^{44}\text{Sc}$ -DOTATOC (pH 4.0, 95 °C, 21 nmol peptide, n = 4).

Time [min]	Yield [%]	SD [%]
1	95.7	±2.0
3	97.1	±1.4
5	97.9	±0.9
10	97.6	±1.3
15	98.2	±0.8

Stability of  $^{44}\text{Sc}$ -DOTATOC was analyzed first in 0.9 % NaCl and PBS (pH 7.4). The results presented in Figure 5 indicate high stability of the formed conjugate even after 22 h incubation at 37 °C. Also studies in calf (FCS) and human (HSA) serums confirmed high stability of  $^{44}\text{Sc}$ -DOTATOC (Fig. 6).

**Fig. 5:** Stability of  $^{44}\text{Sc}$ -DOTATOC in 0.9 % NaCl and PBS (pH 4.0) at 37 °C (n = 3).

Presence of different metal cations in final solution can cause transmetallation of radionuclide-conjugate and finally induce a release of the free radionuclide into solution. Therefore, it was interesting to determine whether  $^{44}\text{Sc}$ -DOTATOC is stable in the presence of relevant metal cations. The addition of  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  did not induce transmetallation reaction (Tab. 2).  $^{44}\text{Sc}$ -DOTATOC was stable even after 25 h incubation at 37 °C with metal cations at rather high concentration levels of  $10^{-2}$  M.



**Fig. 6:** Stability of <sup>44</sup>Sc-DOTATOC in calf (FCS) and human (HSA) serum at 37 °C (n = 3).

**Tab. 2:** Stability of <sup>44</sup>Sc-DOTATOC at 37 °C in the presence of different metal cations at 10<sup>-2</sup> M concentration (n = 3).

Time [h]	% of intact <sup>44</sup> Sc-DOTATOC ± SD			
	Fe <sup>3+</sup>	Cu <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>
0	99.0 ± 0.3	99.5 ± 0.1	99.1 ± 0.3	99.6 ± 0.2
2	98.8 ± 0.1	99.3 ± 0.7	98.8 ± 0.2	99.3 ± 0.6
4	99.2 ± 0.1	99.6 ± 0.3	99.2 ± 0.2	99.6 ± 0.1
6	99.2 ± 0.3	99.5 ± 0.1	99.5 ± 0.2	99.7 ± 0.1
25	98.5 ± 0.7	99.2 ± 0.6	99.6 ± 0.1	99.6 ± 0.3

Similarly, stability of <sup>44</sup>Sc-DOTATOC in the presence of other complexing agents, like EDTA and DTPA was investigated to check if <sup>44</sup>Sc can follow transmetallation from DOTA-conjugate to competing ligand. This was not the case; experimental studies confirmed high stability of <sup>44</sup>Sc-DOTATOC even after 25 h incubation at 37 °C with EDTA or DTPA ligands at molar ratios of competing ligand to DOTA-peptide equal to 100:1 (Tab. 3).

**Tab. 3:** Stability of  $^{44}\text{Sc}$ -DOTATOC at 37 °C in the presence of EDTA or DTPA at molar ratio 100:1 of competing ligand to DOTA-peptide (n = 3)

Time [h]	% of intact $^{44}\text{Sc}$ -DOTATOC $\pm$ SD	
	EDTA	DTPA
0	98.6 $\pm$ 0.1	98.6 $\pm$ 0.2
0.5	98.7 $\pm$ 0.4	99.1 $\pm$ 0.1
1	98.6 $\pm$ 0.6	99.1 $\pm$ 0.2
2	98.8 $\pm$ 1.0	98.7 $\pm$ 0.4
3	99.0 $\pm$ 0.1	98.9 $\pm$ 0.2
4	98.9 $\pm$ 0.2	99.0 $\pm$ 0.1
5	98.8 $\pm$ 0.6	99.0 $\pm$ 0.2
6	98.4 $\pm$ 0.6	99.1 $\pm$ 0.3
7	98.5 $\pm$ 0.1	99.1 $\pm$ 0.1
8	98.7 $\pm$ 0.1	99.0 $\pm$ 0.2
25	97.9 $\pm$ 1.6	97.6 $\pm$ 1.6

## Conclusions

Synthesis of DOTATOC with the new generator derived PET radionuclide  $^{44}\text{Sc}$  was investigated in details. Incorporation of  $^{44}\text{Sc}$  into DOTATOC was almost quantitative (>98 %) at pH 4.0 after 25 min heating in an oil-bath at 95 °C. This time can be significantly reduced to 3 min only when microwave heating is adopted for synthesis. We also performed optimization studies with DOTA-D-Phe<sup>1</sup>-Tyr<sup>3</sup>-octreotate (DOTATATE, abx, Germany) and obtained the same results. Therefore, only experimental data for  $^{44}\text{Sc}$ -DOTATOC are exemplified in this manuscript. Special efforts were focused on stability studies of  $^{44}\text{Sc}$ -DOTATOC conjugate, which was found to be stable in 0.9 % NaCl, PBS (pH 7.4), calf (FCS) and human (HSA) serum as well as in the presence of metal cations ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$ ) and competing ligands, like EDTA and DTPA.

This study confirms the compatibility of  $^{44}\text{Sc}$  radionuclide with established radiolabeling chemistry and may allow follow-up research on PET/CT imaging with this new trivalent metallic positron emitter. It can stimulate development of new metalloradiopharmaceuticals based on this longer-lived positron emitter  $^{44}\text{Sc}$  in order to cover imaging periods of more than one day. A specific field might be application of

---

diagnostic  $^{44}\text{Sc}$  tracers for matching therapeutic analog compounds labeled with e. g.  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{177}\text{Lu}$  or with the  $\beta^-$  emitter  $^{47}\text{Sc}$ . In addition, molecular imaging of  $^{44}\text{Sc}$ -labeled tracers by means of a new PET/3G camera based on the  $\beta^+/\beta^-$  emission of this radionuclide is discussed [3].

## Referenzen

- [1] M. A. Lodge, H. Braess, F. Mahmoud, J. Suh, N. Englar, S. Geysler-Stoops, J. Jenkins, S. L. Bacharach, V. Dilsizian, „Developments in nuclear cardiology: transition from single photon emission computed tomography to positron emission tomography-computed tomography“, *J. Invasive Cardiol.* **2005**, *17*, 491–496.
- [2] A. Rahmim, H. Zaidi, „PET versus SPECT: strengths, limitations and challenges“, *Nucl. Med. Commun.* **2008**, *29*, 193–207.
- [3] F. Haddad, L. Ferrer, A. Guertin, T. Carlier, N. Michel, J. Barbet, J.-F. Chatal, „ARRONAX, a high-energy and high-intensity cyclotron for nuclear medicine“, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2008**, *35*, 1377–1387.
- [4] S. M. Qaim, „Decay data and production yields of some non-standard positron emitters used in PET“, *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2008**, *52*, 111–120.
- [5] G. Hao, A. N. Singh, W. Liu, X. Sun, „PET with non-standard nuclides“, *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10*, 1096–1112.
- [6] F. Rösch, P. J. Riss, „The Renaissance of the  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  Radionuclide Generator Initiates New Developments in  $^{68}\text{Ga}$  Radiopharmaceutical Chemistry“, *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10*, 1633–1668.
- [7] F. Rösch, F. F. Knapp, *Radionuclide generators: Radiochemistry and Radiopharmaceutical Chemistry in Life Sciences*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, **2003**.
- [8] I. Ahmad, G. Bonino, G. Cini Castagnoli, S. M. Fischer, W. Kutschera, M. Paul, „Three-laboratory measurement of the  $^{44}\text{Ti}$  half-life“, *Phys. Rev. Lett.* **1998**, *80*, 2550–2553.

- [9] Y. G. Alenitzky, A. F. Novgorodov, D. V. Filosofov, A. V. Skripnik, V. G. Kaplun, A. G. Suzikov, I. A. Eliseev, F. Rösch,  $^{44}\text{Ti}$ : Investigation of target preparation, irradiation and yields in the  $^{45}\text{Sc}(p,2n)$  process, Mainz, **2005**.
- [10] D. V. Filosofov, N. S. Loktionova, F. Rösch, „A  $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$  radionuclide generator for potential application of  $^{44}\text{Sc}$ -based PET-radiopharmaceuticals“, *Radiochim. Acta* **2010**, *98*, 149–156.
- [11] M. W. Greene, M. Hillman, „A scandium generator“, *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **1967**, *18*, 540–541.
- [12] M. Y. Mirza, A. Aziz, „A scandium generator“, *Radiochim. Acta* **1969**, *11*, 43–44.
- [13] E. Seidl, K. H. Lieser, „Die Radionuklidgeneratoren  $^{113}\text{Sn}/^{113\text{m}}\text{In}$ ,  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  und  $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ “, *Radiochim. Acta* **1973**, *19*, 196–1998.
- [14] D. Schumann, S. Horn, J. Neuhausen, Design of a  $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$  generator system, Bern, **2007**.
- [15] M. Pruszynski, N. Loktionova, D. Filosofov, F. Rösch, „Post-elution processing of  $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$  generator-derived  $^{44}\text{Sc}$  for clinical application“, *Appl. Rad. Isot.* **2010**, *68*, 1636–1641.
- [16] A. Kamel, I. Cydzik, S. Federica, S. Krajewski, A. Kasperek, A. Bilewics, „Cyclotron production of  $^{44}\text{Sc}$  - new radionuclide for PET technique“, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2011**, *54*, S53.
- [17] L. F. Mausner, V. Joshi, K. L. Kolsky, G. E. Meinken, R. C. Mease, M. P. Sweet, S. C. Srivastava, „Evaluation of chelating agents for radioimmunotherapy with scandium-47“, *J. Nucl. Med.* **1995**, *36*, 104P.
- [18] W. A. P. Breeman, M. Jong, T. J. Visser, J. L. Erion, E. P. Krenning, „Optimising conditions for radiolabelling of DOTA-peptides with  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{111}\text{In}$  and  $^{177}\text{Lu}$  at high specific activities“, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2003**, *30*, 917–920.
- [19] D. Cordier, F. Forrer, F. Bruchertseifer, A. Morgenstern, C. Apostolidis, S. Good, J. Müller-Brand, H. Mäcke, J. C. Reubi, A. Merlo, „Targeted alpha-radionuclide therapy of functionally critically located gliomas with  $^{213}\text{Bi}$ -DOTA-[ $\text{Thi}^8, \text{Met}(\text{O}^2)^{11}$ ]-substance P: a pilot trial“, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2010**, *37*, 1335–1344.
- [20] V. Tolmachev, I. Velikyan, M. Sandström, A. Orlova, „A HER2-binding Affibody molecule labelled with  $^{68}\text{Ga}$  for PET imaging: direct in vivo comparison with the  $^{111}\text{In}$ -labelled analogue“, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2010**, *37*, 1356–1367.

- 
- [21] E. d. Blois, H. Sze Chan, C. Naidoo, D. Prince, E. P. Krenning, W. A. P. Breeman, „Characteristics of SnO<sub>2</sub>-based <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga generator and aspects of radiolabelling DOTA-peptides“, *Appl. Rad. Isot.* **2011**, *69*, 308–315.
- [22] A. Majkowska-Pilip, A. Bilewicz, „Macrocyclic complexes of scandium radionuclides as precursors for diagnostic and therapeutic radiopharmaceuticals“, *J. Inorg. Biochem.* **2011**, *105*, 313–320.
- [23] Y. Masuda, Y. Okada, I. Murase, E. Sekido, „Complex formation of scandium (III) with polyaminopolycarboxylic acids and isotachophoretic separation of scandium using complexation equilibria“, *Jap. Anal.* **1991**, *40*, 215–220.
- [24] N. Elander, J. R. Jones, S.-Y. Lu, S. Stone-Elander, „Microwave-enhanced radiochemistry“, *Chem. Soc. Rev.* **2000**, *29*, 239–249.
- [25] D. R. Hwang, S. M. Moerlein, C. S. W. M. J. Dence, „Microwavefacilitated synthesis of [<sup>18</sup>F]spiperone“, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **1989**, *26*, 391–392.
- [26] C. Lemaire, R. Cantineau, L. Christiaens, M. Guillaume, „N.C.A. radiofluorination of altanserine a potential serotonin receptorbinding radiopharmaceutical for positron emission tomography“, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **1989**, *36*, 336–337.
- [27] P. Kumar, L. I. Wiebe, M. Asikoglu, M. Tandon, A. J. B. McEwan, „Microwave-assisted (radio)halogenation of nitroimidazole-based hypoxia markers“, *Appl. Rad. Isot.* **2002**, *57*, 697–703.
- [28] M. Pruszynski, A. Bilewicz, M. R. Zalutsky, „Preparation of Rh[16aneS<sub>4</sub>-diol]<sup>211</sup>At and Ir[16aneS<sub>4</sub>-diol]<sup>211</sup>At Complexes as Potential Precursors for Astatine Radiopharmaceuticals. Part I: Synthesis“, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 958–965.
- [29] I. Velikyan, G. J. Beyer, B. Langström, „Microwave-Supported Preparation of <sup>68</sup>Ga Bioconjugates with High Specific Radioactivity“, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 554–560.
- [30] I. Velikyan, G. Lendvai, M. Vällilä, A. Roivainen, U. Yngve, M. Bergström, B. Langström, „Microwave accelerated <sup>68</sup>Ga-labelling of oligonucleotides“, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2004**, *47*, 79–89.



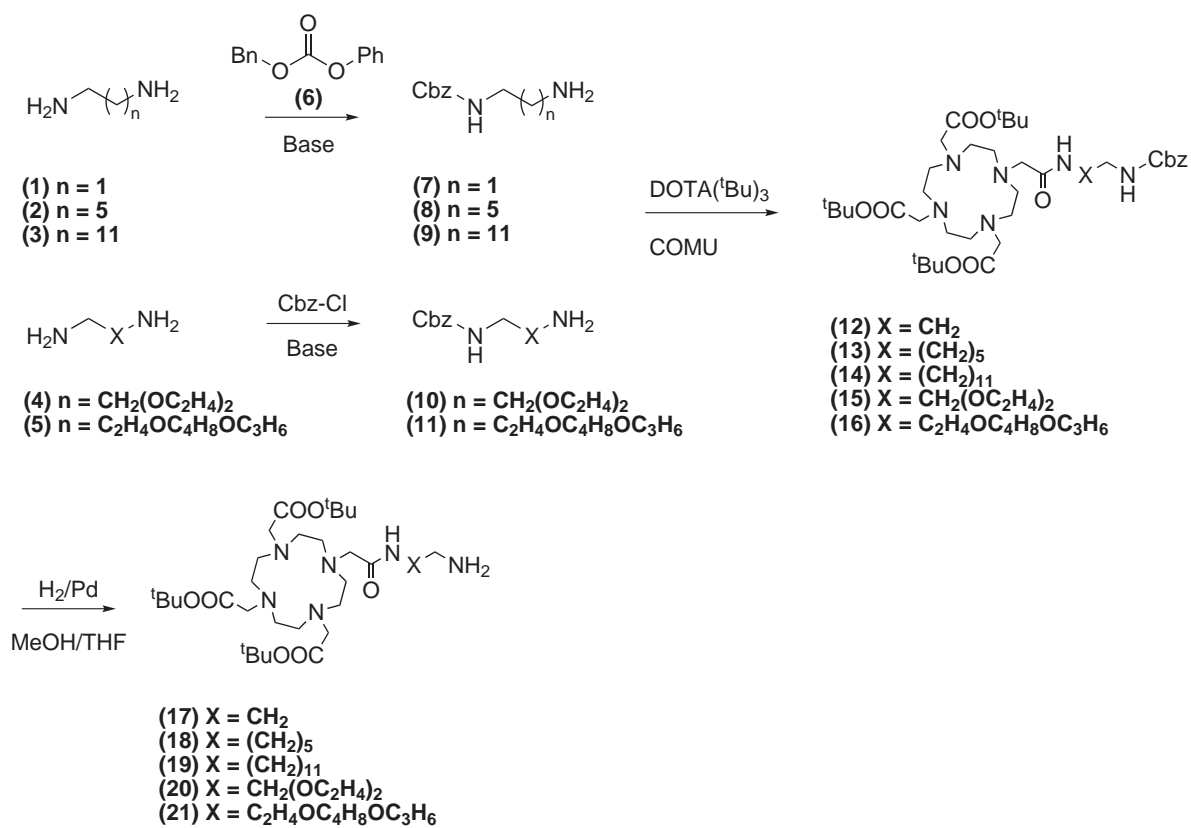
## 4 Zusammenfassung

### 4.1 Radiometallmarkierung von HPMA-basierten Polymeren für die Theranostik

Eine der häufigsten Todesursachen weltweit sind maligne Tumore. Diese stellen eine erhebliche Einschränkung von Lebensqualität und Lebensdauer für die Erkrankten dar. Für eine erfolgreiche Bekämpfung dieser bösartigen Geschwulste ist eine frühzeitige Diagnose und besonders eine effektive und möglichst effiziente Therapie essentiell.

Der Großteil der derzeit zugelassenen Zytostatika sind jedoch niedermolekulare Verbindungen, welche nur einen geringen therapeutischen Effekt, bei teils erheblichen Nebenwirkungen, erzielen. In diesem Zusammenhang sind Nanomaterialien in den Fokus der Arzneimittelforschung gerückt, welche mehrere Funktionalitäten vereinen und so für Diagnostik und Therapie verwendet werden könnten. Diese Nanotheranostika sind aufgrund des EPR-Effekts in der Lage im tumorösem Gewebe zu akkumulieren. Durch Funktionalisierung mit Targeting-Vektoren kann eine Akkumulation im Zielgewebe weiter forciert und der therapeutische Effekt gesteigert werden. In der Entwicklung von Nanotheranostika übernehmen polymere Materialien infolge ihrer hohen Biokompatibilität, biologischen Abbaubarkeit und strukturellen Vielfalt eine Schlüsselrolle. Systematische Untersuchungen der Radiometallmarkierung von Nanopartikeln in Hinblick auf Markierung, *in vitro* und später *in vivo* wurden allerdings bisher nicht gemacht.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Markierung von HPMA-DOTA-Konjugaten mit verschiedenen Radiometallen ( $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{44}\text{Sc}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ) untersucht. Als Chelator wurde DOTA gewählt, welcher in der Lage ist, mit vielen Metallen stabile Komplexe zu bilden, und darüber hinaus die Möglichkeit bietet, durch Variation des Metalls verschiedene Bildgebungsverfahren (MRT, PET, SPECT) auszunutzen. Für die Einführung des Chelators an das Polymerrückgrat wurden verschiedene mono-Cbz-geschützte Linkerstrukturen an DOTA über eine Amidbindung gekoppelt und anschließend entschützt (Abb. 15).



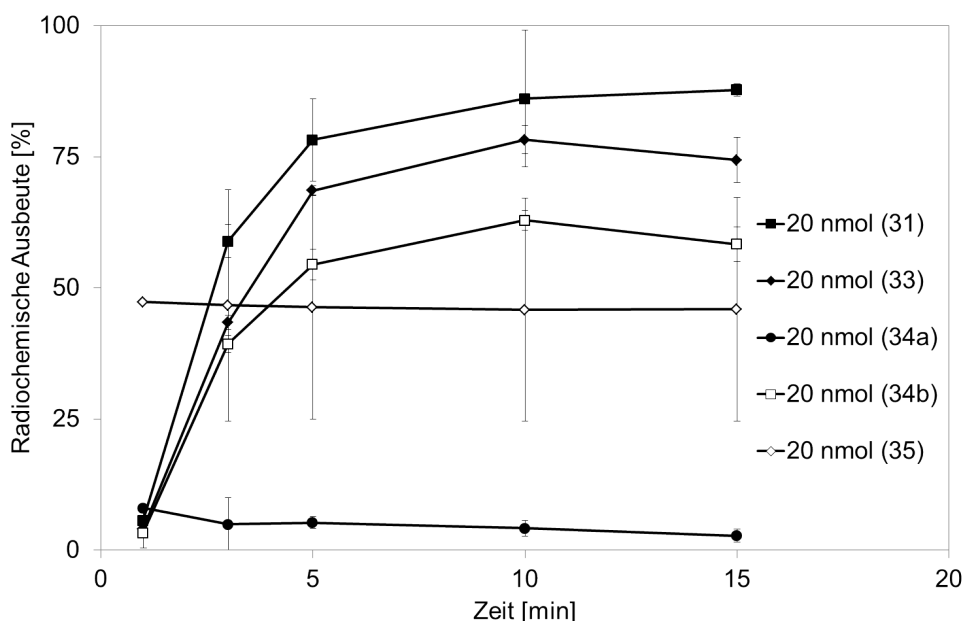
**Abb. 15:** Synthese der  $(\text{tBu})_3$ -DOTA-Liganden.

Die Kopplung der synthetisierten Liganden erfolgte im Arbeitskreis von Prof. Dr. R. Zentel (Johannes Gutenberg-Universität, Mainz) in einer polymeranalogen Reaktion an zuvor dargestelltes HPMA-Rückgrat. Nach Entschützung des Chelators und Aufreinigung konnten fünf HPMA-DOTA-Konjugate mit unterschiedlichen Linkerstrukturen und Belegungsgraden (% DOTA) isoliert werden, welche sich durch einen relativ geringen Polydispersitätsindex auszeichnen (Tab. 5).

**Tab. 5:** Analytische Daten der dargestellten HPMA-DOTA-Konjugate **31–35**. <sup>a</sup>Mittels GPC mit THF als Lösungsmittel bestimmt. <sup>b</sup>Mit <sup>1</sup>H-NMR nach der polymeranalogen Reaktion mit 2-Hydroxypropylamin bestimmt.

Konjugat	$M_n$ [g/mol]	$M_w$ [g/mol]	PDI <sup>a</sup>	% DOTA <sup>b</sup>	Linker
<b>31</b>	15 000	20 000	1,33	11	<b>1</b>
<b>33</b>	12 000	15 000	1,24	1,6	<b>3</b>
<b>34a</b>	12 000	15 000	1,24	0,6	<b>4</b>
<b>34b</b>	12 000	15 000	1,24	1,2	<b>4</b>
<b>35</b>	13 000	16 000	1,24	3,5	<b>5</b>

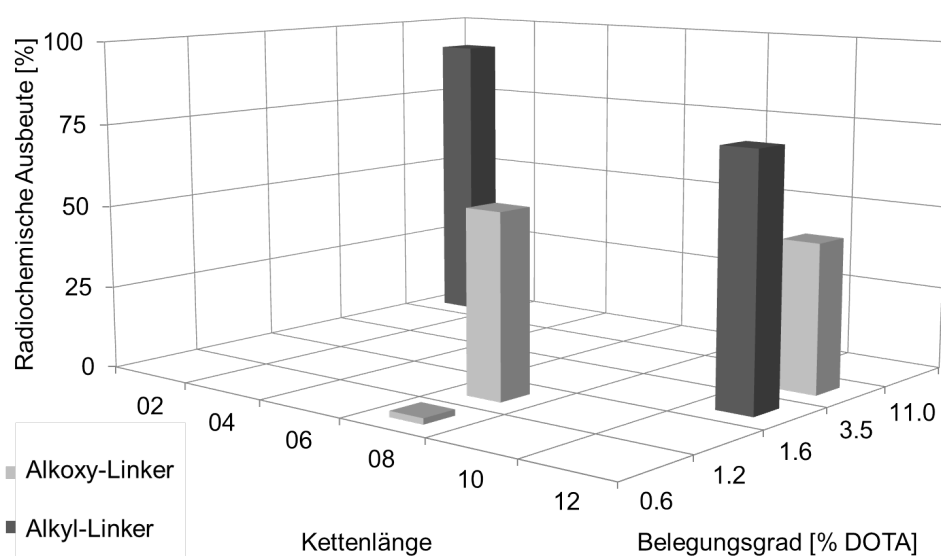
Im nächsten Schritt wurde die Markierung mit  $^{68}\text{Ga}$  für **31** evaluiert. Hierzu wurde nach Zhernosekov et al. [1] aufgereinigtes  $^{68}\text{Ga}$  direkt für die Markierung eingesetzt und die Reaktionsdauer und eingesetztes Polymer in Bezug auf die radiochemische Ausbeute bei 95 °C optimiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Komplexierung innerhalb von 15 min abgeschlossen ist und das 20 nmol des eingesetzten Konjugates zu radiochemischen Ausbeuten über 90 % führen. Zum Vergleich wurde auch die unspezifische Bindung von  $^{68}\text{Ga}$  an HPMA unter den gleichen Bedingungen mit weniger als 5 % bestimmt. Die für **31** optimierten Markierungsbedingungen wurden für die anderen Konjugate übernommen, um den Einfluss von Linkerstruktur (Alkoxy- bzw. Alkylketten; Länge) und des Belegungsgrads auf die Markierung zu untersuchen (Abb. 16).



**Abb. 16:** Markierung der HPMA-DOTA-Konjugate mit  $^{68}\text{Ga}$  (20 nmol, 15 min, 95 °C, n = 3).

Wie an **34a** und **34b** gezeigt werden konnte, hat der Belegungsgrad einen großen Einfluss auf die Komplexierung. So konnten für **34b** (1,2 % DOTA) Ausbeuten von 50 % erreicht werden, während **34a** (0,6 % DOTA) kaum Komplexierung zeigt. Der Einfluss der Linkerstruktur konnte nur indirekt nachgewiesen werden, da sich die Konjugate nicht nur in der Linkerstruktur, sondern auch in ihrem Belegungsgrad deutlich unterscheiden. Für die Linkerstruktur kann allgemein gesagt werden, dass reine Alkylketten als Linker für die Markierung besser geeignet sind als die Alkoxystrukturen. So zeigt **35** mit einer Kettenlänge von n = 12 schlechtere radiochemische Ausbeuten (<50 %) als Konjugat **33** gleicher Kettenlänge, obwohl

es einen doppelt so hohen Anteil an DOTA aufweist. Für die Linkerlänge ergibt sich, dass kurze Linker zu, erwartungsgemäß, geringeren Ausbeuten bei der Markierung führen, da der Chelator für das Metall schlechter erreichbar ist als mit langen Linkern. Bei **31** wird dieser Effekt durch den deutlich höheren Belegungsgrad gegenüber **33** kompensiert (**31** = 11 %; **33** = 1,6 %), wodurch trotz des sehr kurzen Linkers noch Ausbeuten >90 % erreicht werden können. In Abbildung 17 sind diese Ergebnisse nochmals graphisch dargestellt.



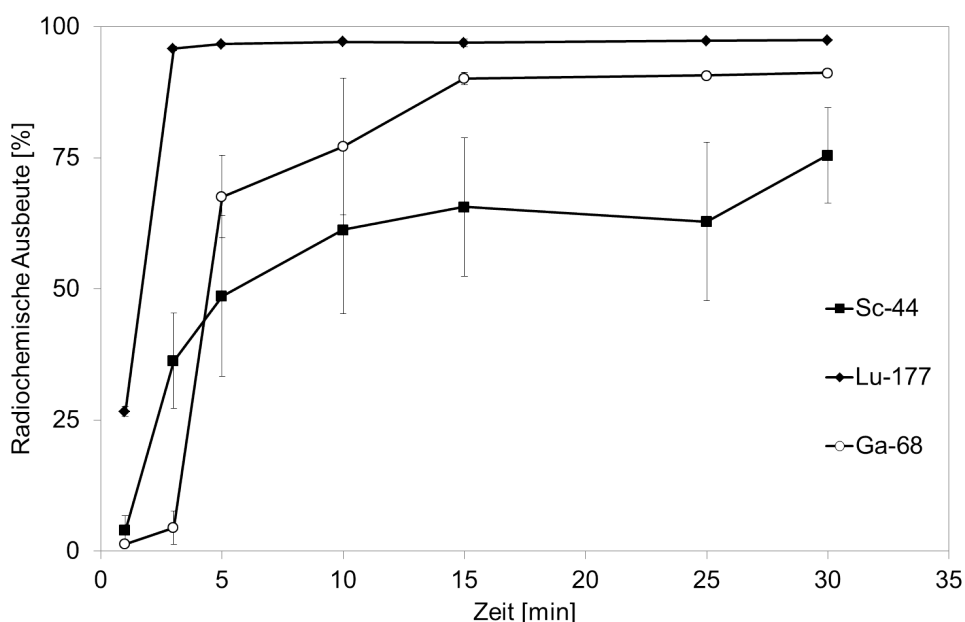
**Abb. 17:** Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute der Markierung der Konjugate mit  $^{68}\text{Ga}$  von der Linkerstruktur und dem Belegungsgrad (20 nmol, 15 min, 95 °C, n = 3).

Weiterhin konnte der positive Effekt von Ethanol auf die Radiometallmarkierung allgemein gezeigt werden. Wurde  $^{68}\text{Ga}$  mit dem Ethanol-basierten Post-Prozessing aufgereinigt und in einer 1:1-Mischung mit HEPES-Puffer verwendet, konnte die Markierungsausbeute für die Konjugate **33–35** um ~20 % gesteigert werden (Tab. 6). Zusätzlich kann durch Verwendung dieser Methode zur Markierung die spezifische Aktivität gesteigert werden, da das Gesamtvolumen der Markierungslösung von 5,25 mL (Aceton Post-Prozessing) auf 2,25 mL (Ethanol Post-Prozessing) reduziert wird.

**Tab. 6:** Markierung der HPMa-DOTA-Konjugate **31–35** mit Hilfe des Aceton- bzw. Ethanol-basierten  $^{68}\text{Ga}$ -Post-Prozessings (20 nmol, 20 min, 95 °C).

Konjugat	Linker	% DOTA	Radiochemische Ausbeute [%]	
			Acetone Post-Prozessing	Ethanol Post-Prozessing
<b>(31)</b>	<b>(1)</b>	11	91 ± 1	
<b>(33)</b>	<b>(3)</b>	1,6	75 ± 2	97 ± 1
<b>(34a)</b>	<b>(4)</b>	0,6	2 ± 1	25 ± 8
<b>(34b)</b>	<b>(4)</b>	1,2	55 ± 3	40 ± 8
<b>(35)</b>	<b>(5)</b>	3,5	45 ± 22	67 ± 6

Zusätzlich zur Markierung mit  $^{68}\text{Ga}$  wurden die Konjugate mit  $^{44}\text{Sc}$  und  $^{177}\text{Lu}$  umgesetzt. Dazu wurde das aufgereinigte Eluat des  $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ -Generators [2] bzw. kommerziell erhältliches  $^{177}\text{Lu}$  für die Markierung verwendet. Für die Markierung der Konjugate mit  $^{68}\text{Ga}$  und  $^{177}\text{Lu}$  konnten Ausbeuten >90 % erzielt werden, während die Komplexierung mit  $^{44}\text{Sc}$  innerhalb von 25 min nur zu Ausbeuten von 75 % führt (Abb. 18). Mit Hilfe von Größenausschluss-Chromatographie konnten die markierten Konjugate schnell und einfach gereinigt und radiochemische Reinheiten von >98 % erreicht werden.

**Abb. 18:** Markierung von **31** mit  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{44}\text{Sc}$  und  $^{177}\text{Lu}$  (20 nmol, 30 min, 95 °C, n = 3).

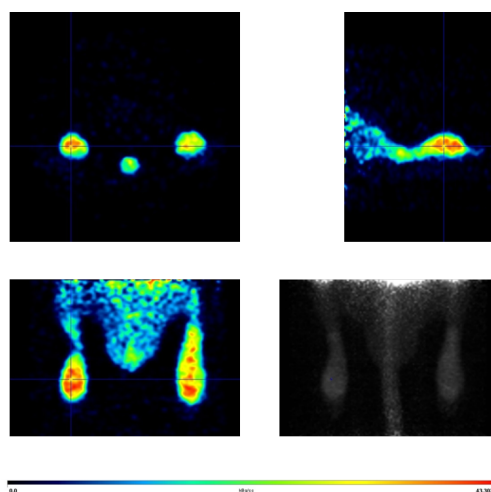
Alle  $^{68}\text{Ga}$ -Konjugate wurden in *in vitro*-Studien auf ihre Stabilität hin getestet. Die Konjugate zeigten in isotonischer Natriumchloridlösung gute bis sehr gute Stabilität. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass

die beiden Konjugate mit den besten Markierungseigenschaften (**31**, **33**) auch am stabilsten gegen Transmetallierung und Transchelatierung sind. Dieses Ergebnis konnte auch anhand der Stabilität in humanem Serum gezeigt werden. Allgemein zeigten die Konjugate mit Alkyllinkern wesentlich bessere Stabilität gegenüber anderen Metallkationen und konkurrierenden Liganden als die mit Alkoxylinkern (Tab. 7).

**Tab. 7:** Stabilitäten der  $^{68}\text{Ga}$ -HPMA-DOTA-Konjugate **31–35** in Gegenwart von verschiedenen Metallkationen ( $10^{-2}$  M) und Chelatoren (Molverhältnis 100:1 Ligand:Konjugat) bei 37 °C über 2 h.

Konjugat	Linker	% DOTA	% des intakten $^{68}\text{Ga}$ -Konjugats $\pm$ SD				
			$\text{Fe}^{3+}$	$\text{Mg}^{2+}$	$\text{Ca}^{2+}$	EDTA	DTPA
<b>31</b>	<b>1</b>	11	$94 \pm 3$	$92 \pm 1$	$82 \pm 5$	$92 \pm 5$	$83 \pm 1$
<b>33</b>	<b>3</b>	1,6	$94 \pm 9$	$69 \pm 2$	$99 \pm 2$	$90 \pm 2$	$87 \pm 1$
<b>34a</b>	<b>4</b>	0,6	$88 \pm 2$	$80 \pm 3$	$70 \pm 1$	$77 \pm 2$	$49 \pm 1$
<b>34b</b>	<b>4</b>	1,2	$84 \pm 2$	$86 \pm 2$	$90 \pm 1$	$44 \pm 3$	$31 \pm 1$
<b>35</b>	<b>5</b>	3,5	$74 \pm 2$	$65 \pm 1$	$83 \pm 8$	$78 \pm 5$	$93 \pm 1$

Insgesamt war es möglich, erste Aussagen zum Einfluss von Linkerstruktur und Belegungsgrad von HPMA-DOTA-Konjugaten auf die Radiometallmarkierung und die *in vitro*-Stabilität zu treffen. In weiteren Studien mit den aussichtsreichsten Konjugaten könnten deren pharmakologische Eigenschaften, je nach verwendetem Isotop, auch über längere Zeiträume untersucht werden. Erste Versuche an tumortragenden Ratten mit dem  $^{68}\text{Ga}$ -markierten HPMA-DOTA-Konjugat **31** wurden bereits durchgeführt und konnten eine Anreicherung des Konjugats im Tumor zeigen (Abb. 19).



**Abb. 19:** Erstes  $\mu\text{PET}$ -Bild 120 min p. i. mit dem  $^{68}\text{Ga}$ -markierten HPMA-DOTA-Konjugat **31** einer tumortragenden Ratte (Walker Mamma Karzinom).

## 4.2 Entwicklung eines Ethanol-basierten Post-Prozessings für Generator-produziertes $^{68}\text{Ga}$ auf Grundlage der etablierten Kationenaustauscher-Methodik

Der große Vorteil des Positronenemitters  $^{68}\text{Ga}$  gegenüber den konventionell verwendeten PET-Nukliden ist seine Zyklotron-unabhängige Verfügbarkeit über den  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generator. Dies wird möglich durch das säkulare Gleichgewicht, welches zwischen dem langlebigen Mutternuklid  $^{68}\text{Ge}$  ( $t_{1/2} = 270,95$  d) und dem relativ kurzlebigen Tochternuklid  $^{68}\text{Ga}$  ( $t_{1/2} = 67,71$  min) vorliegt. Weiterhin zeichnet sich  $^{68}\text{Ga}$  durch seine hohe Positronenausbeute von 89 %, begleitet von geringer Photonenemission (1,077 keV, 3,22 %), aus. Dementsprechend zählt  $^{68}\text{Ga}$  zu den vielversprechenden PET-Nukliden, welches bereits intensiv in der Forschung und in geringerem Maße in der Medizin angewendet wird.

Die Produktion von  $^{68}\text{Ga}$  mithilfe eines  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generators erfordert jedoch, dass das Eluat bestimmte Spezifikationen (Elutionsausbeute, Durchbruch des Mutternuklids, Gehalt an Fremdionen, pH-Wert etc. ) erfüllen muss, bevor es für die Formulierung von Radiopharmaka verwendet werden darf. Um dies zu gewährleisten, wurden in den letzten Jahren mehrere Methoden entwickelt, welche metallische Verunreinigungen, den pH-Wert und das Volumen der  $^{68}\text{Ga}$ -haltigen Lösung minimieren. In dieser Hinsicht besonders vielversprechend ist das von Zhernosekov et al. beschriebene Kationenaustauscher-basierte Post-Prozessing [1]. Dieses nutzt Aceton-haltige Lösungen zum Aufreinigen und Eluieren von  $^{68}\text{Ga}$ , was für die Routineanwendung in der Medizin jedoch ein Nachteil ist.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Ersatz von Aceton im etablierten Protokoll durch ein geeigneteres Lösungsmittel wie z. B. Ethanol möglich ist. Als Lösungsmittel wurde Ethanol gewählt, welches als Additiv und Lösungsmittel bereits breite Anwendung in der medizinischen Praxis findet. So wird es in der Medizin als Konservierungsmittel oder zur Verbesserung der Löslichkeit von Arzneistoffen und in der Radiopharmazie als Radiolyseinhibitor eingesetzt. Ein weiterer Vorteil von Ethanol als Lösungsmittel ist die Steigerung der Effizienz von Radiometallmarkierungen durch dessen Zusatz [3]. Das entwickelte Ethanol-basierte Protokoll erlaubt die effiziente Konzentration des  $^{68}\text{Ga}$ -Generatoreluats mit hohen Elutionsausbeuten ( $\sim 90$  %, 1 mL) innerhalb von 5 Minuten, einschließlich Generatorelution. Als Kationenaustauscher können die Austauscher AG 50W-X8 ( $-400$  mesh) und AG 50W-X4 (200–

400 mesh) von BioRad verwendet werden. Für diese Austauscher konnte das Aceton problemlos durch Ethanol ersetzt werden. Im Gegensatz dazu konnten mit den entsprechenden Austauschern von Varian (BondElut), MerckKGG (LiChrolut) und Phenomenex (STRATA-X-C) keine oder nur sehr geringe  $^{68}\text{Ga}$ -Elutionsausbeuten erhalten werden (Tab. 8).

**Tab. 8:** Relative Verteilung (%) von  $^{68}\text{Ga}(\text{III})$  auf den untersuchten Kationenaustauschersäulen (SCX 1 = AG 50W-X8, SCX 2 = AG 50W-X4, SCX 3 = STRATA-X-C, SCX 4 = Varian SCX, SCX 5 = MerckKGG SCX) bei Verwendung der optimierten Ethanolösungen.

Volumen	Fraktion	Eluent	SCX 1	SCX 2	SCX 3	SCX 4	SCX 5
5 mL	i	0,1 N HCl	0,37	2,32	5,44	0,02	0,04
1 mL	ii	80 % EtOH/0,15 N HCl	0,55	2,38	0,05	0,00	0,01
0,4 mL	iii	90 % EtOH/0,9 N HCl	75,72	78,16	23,90	0,00	0,01
1 mL	iv	4 N HCl	17,21	5,48	8,34	98,32	95,94
1 mL	v	H <sub>2</sub> O	1,65	3,17	5,53	4,48	5,28

Generell ist die Elutionsausbeute für  $^{68}\text{Ga}$  abhängig von der HCl-Konzentration in der verwendeten Lösung. Bei Konzentrationen  $<0,6\text{ N}$  liegt die Elutionsausbeute unter 50 % in 0,4 mL Elutionsvolumen. Für die Waschlösung wurde daher eine HCl-Konzentration von 0,15 N verwendet, da in diesem Schritt das  $^{68}\text{Ga}$  nach Möglichkeit nicht oder nur in sehr geringem Maße vom Adsorbermaterial gelöst werden soll. Für die Elutionslösung selbst konnte die optimale HCl-Konzentration mit 0,9 N bestimmt werden. Des Weiteren wurde der Einfluss von Volumen und Ethanolgehalt auf die Elutionsausbeute untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Ausbeute mit zunehmendem Ethanolanteil steigt. Dabei ist jedoch zu beachten, dass für eine HCl-Konzentration von 0,9 N der maximal mögliche Ethanolgehalt bei 90 % liegt. Das benötigte Elutionsvolumen ist im Vergleich zur herkömmlichen Aceton-Methode größer. Mit 0,4 mL können nur  $\sim 80\%$   $^{68}\text{Ga}$  vom Kationenaustauscher eluiert werden. Mit 0,8 mL, besser noch 1,0 mL der Elutionslösung, kann die Elutionsausbeute jedoch auf  $>90\%$  gesteigert werden.

Neben der hohen Elutionsausbeute ist die Methode für die quantitative Abtrennung von  $^{68}\text{Ge}(\text{IV})$  und die effektive Reduktion von Fremdionen wie Fe(III) und Ti(IV) geeignet (Tab. 9). Diese chemische Aufreinigung ist aus zwei Gründen notwendig. Erstens garantiert die quantitative Abtrennung von  $^{68}\text{Ge}(\text{IV})$  die Einhaltung rechtlicher Bestimmungen zum  $^{68}\text{Ge}$ -Gehalt von radiopharmazeutischen Formulierungen. In der 90 % EtOH/0,9 N HCl-Lösung war es, auch bei sehr langen Messzeiten, nicht mehr möglich  $^{68}\text{Ge}(\text{IV})$



#### 4 Zusammenfassung

nachzuweisen. Zweitens ermöglicht die Reduktion von Fremdionen die Radiomarkierung mit höheren spezifischen Aktivitäten. Der Anteil an Fe(III) kann, abhängig vom verwendeten Kationenaustauscher, auf bis zu 15 % (AG 50W–X8) bzw. 33 % (AG 50W–X4) im Eluat reduziert werden. In der entsprechenden Lösung der Aceton-Methode befinden sich im Vergleich dazu noch 50 % Fe(III).

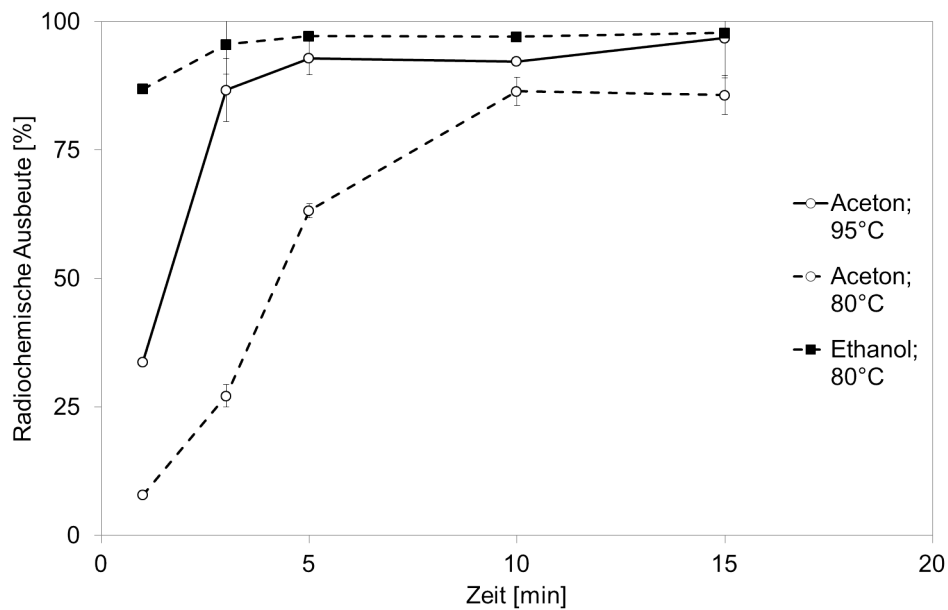
**Tab. 9:** Vergleich der relativen Verteilung (%) von  $^{68}\text{Ga(III)}$ ,  $^{68}\text{Ge(IV)}$ ,  $^{59}\text{Fe(III)}$  und  $\text{Ti(IV)}$  auf 50 mg AG 50W–X8 –400 mesh zwischen Ethanol- und Aceton-basierten Post-Prozessing.

Fraktion	Volumen	Eluent	Ga(III)	Ge(IV)	Fe(III)	Ti(IV)
<b>Ethanol-Post-Prozessing</b>						
i	5 mL	0,1 N HCl	0,13	97,17	11,12	2,85
ii	1 mL	80 % EtOH/0,15 N HCl	0,57	2,83	1,99	0,76
iii	1 mL	90 % EtOH/0,9 N HCl	80,47	<0,25	14,09	6,83
iv	1 mL	4 N HCl	15,71	<0,25	42,28	58,73
v	1 mL	H <sub>2</sub> O	0,84	<0,25	16,96	30,83
<b>Aceton-Post-Prozessing</b>						
i	7 mL	0,1 N HCl	0,16	97,08	0,13	7,30
ii	0,6 mL	80 % Acetone/0,15 N HCl	1,43	2,92	37,86	0,68
iii	0,4 mL	97,6 % Acetone/0,05 N HCl	97,82	<2 · 10 <sup>-2</sup>	49,78	7 · 10 <sup>-2</sup>
iv	1 mL	4 N HCl	0,41	<5 · 10 <sup>-3</sup>	11,61	72,15
v	1 mL	H <sub>2</sub> O	0,18	<3 · 10 <sup>-3</sup>	0,62	19,80

Infolge der hohen HCl-Konzentration im Eluat ( $\text{HCl} \equiv 9 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L H}^+$ ) und dem daraus resultierenden sehr niedrigen pH-Wert ist der direkte Einsatz der 90 % EtOH/0,9 N HCl-Lösung für die Markierung nicht geeignet. Daher wurde die Markierung mit verschiedenen Puffersystemen (NaOAc, NH<sub>4</sub>OAc, NaHEPES), mit unterschiedlichen Konzentrationen, pH-Werten und Volumina, untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, für die medizinische Anwendung taugliches  $^{68}\text{Ga-DOTATOC}$  mit radiochemischen Ausbeuten >99 % darzustellen. Aufgrund der sehr guten Markierungsausbeuten kann auf eine abschließende Aufreinigung von nichtkomplexiertem  $^{68}\text{Ga}$  verzichtet werden. Dadurch werden Ausbeuteverluste durch folgende Aufreinigungsschritte vermieden.

Durch Zusatz von Ethanol zu Lösungen für die Radiometallmarkierung kann die Effizienz der Markierung drastisch gesteigert werden [3]. Dieser Effekt konnte für die Markierung von DOTATOC mit der ethanolischen  $^{68}\text{Ga}$ -Lösung bestätigt werden. Bei einem 1:1-Verhältnis von Puffer zu Elutionslösung liegt der

Gesamtethanolgehalt bei 45 %. Dieser hohe Anteil führt zu einer deutlichen Verbesserung der Markierungseffizienz [3]. Der direkte Vergleich von Aceton- und Ethanol-Methode zeigt diese Verbesserung an der Modellverbindung DOTATOC. So erhält man mit den Ethanol-haltigen Lösungen, auch bei verringerter Temperatur (80 °C) und Reaktionszeit (5 min), Markierungsausbeuten von >98 % (Abb. 20).



**Abb. 20:** Vergleich der Markierungskinetiken von  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC mit  $^{68}\text{Ga}$  nach Ethanol- (1 M HEPES buffer, 2 mL, 80 °C) und nach Aceton-Post-Processing (Wasser, 5 mL, 80 und 95 °C).

Insgesamt kombiniert das entwickelte Post-Processing die Vorteile von Kationenaustauschern mit denen von Ethanol und ist auch auf automatisierte Module problemlos übertragbar. Für die Markierung von Radiopharmaka mit dem Generator-produzierten  $^{68}\text{Ga}$  repräsentiert die entwickelte Methode einen wichtigen Schritt für die Entwicklung von Kit-Formulierungen aber auch für die Etablierung und damit zunehmende Anwendung in der klinischen Routine.

### 4.3 Entwicklung von Methoden zur Bestimmung des $^{68}\text{Ge}$ -Gehalts in $^{68}\text{Ga}$ -Lösungen zur Qualitätssicherung

Kommerziell erhältliche  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generatoren liefern Anfangsaktivitäten von 20 mCi (0,74 GBq), 30 mCi (1,11 GBq), 50 mCi (1,85 GBq) oder mehr an  $^{68}\text{Ge}$  bzw.  $^{68}\text{Ga}$ . Innerhalb der ersten Wochen können 60–90 % der vorhandenen  $^{68}\text{Ga}$ -Aktivität eluiert werden. Außer dem gewünschten Radionuklid  $^{68}\text{Ga}$  werden jedoch auch messbare Mengen des langlebigen Mutternuklids  $^{68}\text{Ge}$  eluiert ( $10^{-2}$ – $10^{-4}$  % bzgl. der Ausgangsaktivität) [4, 5]. Hinsichtlich der Anwendung von  $^{68}\text{Ga}$ -Radiopharmaka ist dieser  $^{68}\text{Ge}$ -Durchbruch allerdings ein kritischer Faktor und darf laut der Europäischen Pharmakopöe nicht mehr als 0,001 % der Gesamtaktivität der  $^{68}\text{GaCl}_3$ -Lösung und des fertigen  $^{68}\text{Ga}$ -Radiopharmakons betragen. Dementsprechend muss im Rahmen der Qualitätskontrolle die Radionuklidreinheit bestimmt und damit der Gehalt an  $^{68}\text{Ge}$  quantifiziert werden. Radiochemisch kann  $^{68}\text{Ge}$  aufgrund seiner Zerfallseigenschaften ausschließlich indirekt über den Zerfall seines Tochternuklids  $^{68}\text{Ga}$  detektiert werden. Kleinste Mengen des Nuklids in einem Überschuss an  $^{68}\text{Ga}$   $\gamma$ -spektroskopisch nachzuweisen, ist deshalb nicht möglich. Bisher müssen  $^{68}\text{Ga}$ -Radiopharmaka bis zu 2 Tage aufbewahrt werden, bevor eine Quantifizierung des  $^{68}\text{Ge}$ -Durchbruchs erfolgen kann, also erst nach Applikation des Medikaments.

Es wurden zwei unterschiedliche Methoden entwickelt, mit deren Hilfe der  $^{68}\text{Ge}$ -Gehalt in  $^{68}\text{Ga}$ -Lösungen radiochemisch ohne  $\gamma$ -Spektroskopie noch vor Applikation quantifiziert werden kann.

Die erste Methode basiert auf der quantitativen Separation von  $^{68}\text{Ge}$  und  $^{68}\text{Ga}$  auf Grundlage des Kationenaustauscher Post-Prozessings [1]. Nach der vollständigen Abtrennung der beiden Nuklide kann die Aktivität von  $^{68}\text{Ge}$  aufgrund des sich einstellenden säkularen Gleichgewichts mit Hilfe eines Aktivimeters innerhalb einer Stunde bestimmt werden. Die Gesamtaktivität einer Probe des Eluats setzt sich zusammen aus den darin enthaltenen Nukliden  $^{68}\text{Ge}$  und  $^{68}\text{Ga}$  und kann durch Gleichung 5 beschrieben werden.

$$A_{\text{Ga}}^t = A_{\text{Ga}}^0 \exp(-\lambda_{\text{Ga}} t) + \frac{\lambda_{\text{Ga}}}{\lambda_{\text{Ga}} - \lambda_{\text{Ge}}} A_{\text{Ge}}^0 (\exp(-\lambda_{\text{Ge}} t) - \exp(-\lambda_{\text{Ga}} t)) \quad (5)$$

$A_{\text{Ge}}^0$  =  $^{68}\text{Ge}$ -Aktivität (= Durchbruch);  $A_{\text{Ga}}^t$  =  $^{68}\text{Ga}$ -Aktivität zur Zeit  $t$  nach der Elution;  $\lambda = \frac{\ln 2}{t_{1/2}}$ .

Werden die beiden Nuklide quantitativ voneinander getrennt vereinfacht sich Gleichung 5 mit  $A_{Ga}^o = 0$  zu Gleichung 6.

$$A_{Ga}^t = A_{Ge}^o (1 - \exp^{(-\frac{\ln 2}{t_{1/2}} t)}) \quad (6)$$

Im Gleichgewicht gilt dann:

$$A_{Ga}^{equ} = A_{Ge}^{equ} \quad (7)$$

Gemäß der Kinetik des radioaktiven Zerfalls entspricht die Aktivität einer zum Zeitpunkt  $t = 0$  min reinen  $^{68}\text{Ge}$ -Probe nach 28,10 min bzw. 67,71 min  $\frac{1}{4}$  bzw.  $\frac{1}{2}$  der absoluten  $^{68}\text{Ge}$ -Aktivität in der Probe.

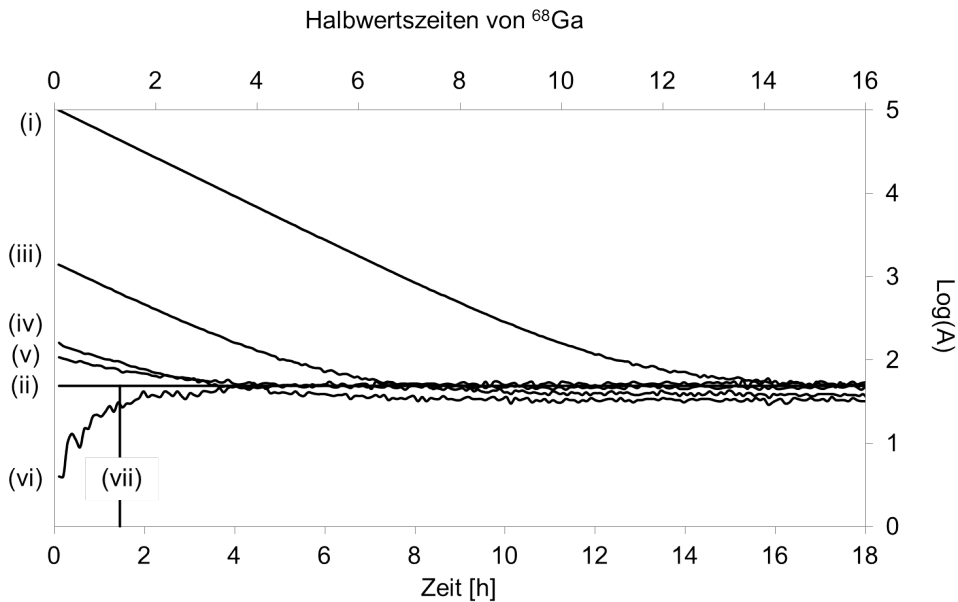
Durch Variation der Masse des Austauscherharzes bzw. durch Kombination mehrerer Kationenaustauscher konnten die beiden Radionuklide bereits während des Post-Prozessings effizient voneinander getrennt werden, ohne die Elutionsausbeute und Synthesedauer zu beeinflussen. Als Kationenaustauscher wurden AG 50W-X8 (-400 mesh) von BioRad und STRATA-X-C von Phenomenex in den in Tabelle 10 aufgeführten Kombinationen verwendet.

**Tab. 10:** Masse und Kombination der verwendeten Austauscherharze für die quantitative Separation von  $^{68}\text{Ge}$  und  $^{68}\text{Ga}$ .

Nr.	AG 50W-X8	STRATA-X-C
iii	50 mg	–
iv	50 mg	30 mg
v	50 mg	120 mg
vi	220 mg	–
	220 mg	120 mg

Es konnte gezeigt werden, dass mit zunehmender Masse an Austauscherharz die Adsorption von  $^{68}\text{Ga}$  gesteigert werden kann, während  $^{68}\text{Ge}$  auf dem Harz nicht zurückgehalten und im Abfallgefäß aufgefangen wird. Wie in Abbildung 21 gezeigt wird das säkulare Gleichgewicht ohne Abtrennung von Mutter und Tochter erst nach 18 Stunden erreicht (Graph (i)). Zu diesem Zeitpunkt entspricht die gemessene Aktivität der Tochter der Aktivität des Mutternuklids. Durch zunehmende Reduktion der Tochteraktivität stellt sich das Gleichgewicht früher ein (Graph (iii)–(v)). Dementsprechend ist es möglich die Aktivität von  $^{68}\text{Ge}$  in der Probe früher zu bestimmen. Durch die quantitative Separation mit 220 mg AG 50W-X8

(Graph (vi)) befindet sich im Abfallgefäß ausschließlich  $^{68}\text{Ge}$ . Dessen Gesamtaktivität nach Gleichung 6 durch Bestimmung der vorhandenen  $^{68}\text{Ga}$ -Aktivität im Aktivimeter innerhalb einer Stunde quantifiziert werden kann.



**Abb. 21:** Ergebnisse der Trennung von  $^{68}\text{Ga}$  und  $^{68}\text{Ge}$ -Durchbruch für die untersuchten Kationenaustauscher.  $^{68}\text{Ga}$  wurde in kBq gemessen. Graph (i) Aktivität des ursprünglichen  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  Generatoreluat ohne Post-Prozessing über die Zeit, Graph (ii) Aktivitätsniveau des Gleichgewichts nach 18 Stunden ohne Aufreinigung, Graph (iii)–(vi)  $^{68}\text{Ge}$  Lösungen Nach Post-Prozessing mit 50 mg AG 50W–X8, 50 mg AG 50W–X8 + 30 mg SCX, 50 mg AG 50W–X8 + 120 mg SCX und 220 mg AG 50W–X8 + 120 mg SCX. (vii) zeigt die Hälfte der  $^{68}\text{Ga}$ -Aktivität im Gleichgewicht nach 67,71 min an. Der gemessene Wert entspricht 50 % des  $^{68}\text{Ge}$ -Durchbruchs.

Mit der entwickelten Methode ist die frühzeitige Quantifizierung des  $^{68}\text{Ge}$ -Gehalts im Generatoreluat direkt nach der Elution möglich. Für die klinische Anwendung bedeutet das, dass ein wichtiger Teil der Qualitätskontrolle statt wie bisher 2 Tage nach Freigabe/Applikation, bereits während der Synthese des Radiopharmakons möglich ist. Ein weiterer Vorteil der Methode ist die Tatsache, dass keine zusätzlichen teuren Geräte benötigt werden, da die Messungen mit vorhandenen Aktivimetern ohne weiteres durchgeführt werden können.

Die zweite Methode basiert auf der Dünnschichtchromatographie (TLC), welche gewöhnlich für die Analyse von radiochemischer Ausbeute und Reinheit genutzt wird. Hierbei wird ausgenutzt das sich  $^{68}\text{Ga(III)}$  und  $^{68}\text{Ge(IV)}$ , abhängig von der gewählten stationären und mobilen Phase, unterschiedlich verhalten

[6]. Wenn die Differenz der  $R_f$ -Werte für die unterschiedlichen Spezies groß genug ist, ist es möglich, den  $^{68}\text{Ge}$ -Gehalt einer  $^{68}\text{Ga}$ -Lösung schnell und einfach zu bestimmen. Zusätzlich kann durch Auswahl geeigneter mobiler und stationärer Phasen der  $^{68}\text{Ge}$ -Gehalt eines  $^{68}\text{Ga}$ -Radiopharmakons nach dessen Synthese bestimmt werden. Durch Verwendung einer Kalibrierung für den verwendeten Detektor (z. B. Instant Imager<sup>®</sup>, Packard Canberra) kann der  $^{68}\text{Ge}$ -Gehalt auch quantifiziert werden.

Es konnte gezeigt werden, dass von den untersuchten mobilen Phasen die Phasen b)–e) für die Bestimmung des  $^{68}\text{Ge}$ -Gehalts in Generatoreluat geeignet sind. Ebenfalls konnte am Beispiele von  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC gezeigt werden, dass die Methode auch für die Bestimmung in  $^{68}\text{Ga}$ -Radiopharmaka verwendet werden kann (Tab. 11).

**Tab. 11:** Ergebnisse für die  $R_f$ -Werte von  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC und  $^{68}\text{Ge}$  auf Silica Gel 60 TLC Platten (Merck) mit den untersuchten mobilen Phasen.

Mobile Phase	R <sub>f</sub> Wert		
	$^{68}\text{Ga(III)}$	$^{68}\text{Ge(IV)}$	$^{68}\text{Ga-DOTATOC}$
a 0,1 M Zitronensäurepuffer (pH = 4)	1	1	0,1–0,2
b 5 % NaCl:MeOH:25 % NH <sub>3</sub> (3:1:1)	0	0,4–0,6	0,1–0,2
c 2 M HCl:Aceton (1:1)	1	0,1	0,4
d 0,01 M NaC <sub>4</sub> H <sub>5</sub> O <sub>6</sub> :MeOH (3:1)	0	0,4	0,1–0,2
e Cyclohexanon:2 M HCl (20:1)	0,4–0,5	0,1–0,2	0

Durch lineare Regression der für die Kalibrierung an einem Instant Imager<sup>®</sup> (Packard Canberra), nach 10 min Messzeit, wurde Gleichung 8 erhalten.

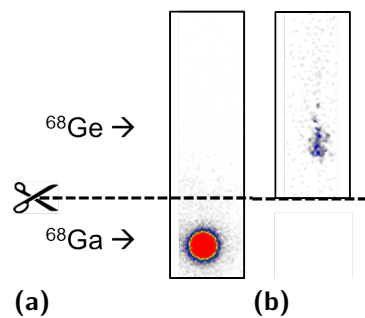
$$y = 2,6344x + 0,4167 \quad (8)$$

$$x = \frac{(y - 0,4167)}{2,6344} \quad (9)$$

$y$  = Counts pro Minute,  $x$  = Aktivität in Bq auf der TLC.

Für die Bestimmung des  $^{68}\text{Ge}$ -Durchbruchs in ursprünglichem Eluat werden 4  $\mu\text{L}$  der Probe auf die TLC aufgetragen und die TLC in der mobilen Phase b) entwickelt. Die TLC wird direkt analysiert, wobei nur  $^{68}\text{Ga}$ -Aktivität bei ( $R_f = 0$ ) gemessen wird (Abb. 6a). Anschließend wird die TLC bei  $R_f = 0,3$  durchgeschnitten und wieder analysiert (Abb. 6). Jetzt kann die Aktivität des  $^{68}\text{Ge}$  gemessen werden (Abb. 6b).

Durch Einsetzen des Messwerts für  $t = 10$  min wird in Gleichung 9 kann die Aktivität des entnommenen Aliquots und daraus direkt die Aktivität im ursprünglichen Eluat zum Zeitpunkt  $t = 10$  min bestimmt werden. Für die Quantifizierung der absoluten Aktivität im Eluat muss dieser Wert wiederum in Gleichung 6 eingesetzt und nach  $A_{\text{Ge}}^0$  aufgelöst werden.



**Abb. 22:** Bestimmung des  $^{68}\text{Ge}$ -Durchbruchs mittels TLC (mobile Phase b)) am Beispiel für Generatoreluat nach  $t = 10$  min.

Die Bestimmung des  $^{68}\text{Ge}$ -Gehalts von  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC-Formulierungen wird analog durchgeführt.

Die Quantifizierung des  $^{68}\text{Ge}$ -Durchbruchs kann mit Hilfe von Dünnschichtchromatographie sowohl in Generatoreluat als auch in  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC schnell und einfach durchgeführt werden. Wie für  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC bereits gezeigt, erlaubt dieses Verfahren die Überprüfung der Radionuklidreinheit vor Freigabe/Applikation des Radiopharmakons. Durch Auswahl geeigneter mobiler Phasen könnte diese Technik auch auf andere Radiopharmaka angewendet werden.

## 4.4 Etablierung von $^{44}\text{Sc}$ als PET-Nuklid

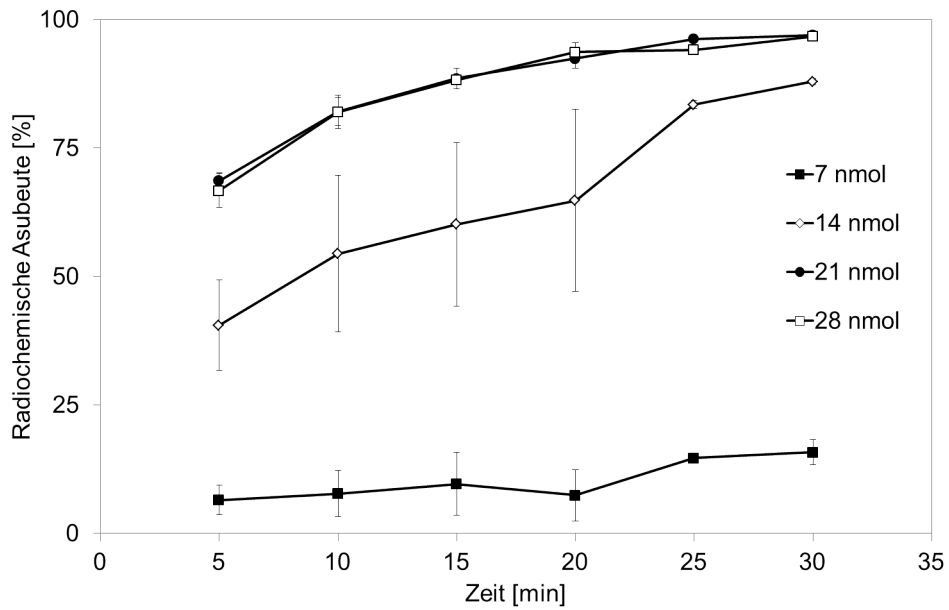
Obwohl  $^{68}\text{Ga}$  in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung in der Forschung, aber auch in der klinischen Routine gewonnen hat, ist es aufgrund seiner kurzen physikalischen Halbwertszeit ( $t_{1/2} = 67,71 \text{ min}$ ) nicht geeignet, um physiologische Prozesse mit langen biologischen Halbwertszeiten zu verfolgen. In diesem Zusammenhang ist das  $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ -Generatorsystem infolge der längeren Halbwertszeit (3,97 h) bei gleichzeitig hoher Positronenausbeute (94,27 %) des Tochternuklids  $^{44}\text{Sc}$  von Interesse.

Ein wichtiger Schritt in Richtung der Anwendung von  $^{44}\text{Sc}$  für neue Radiopharmaka ist der Nachweis des großen Potentials dieses PET-Nuklids anhand einer Modellverbindung. Hierzu wurde die Markierung einer Modellverbindung mit dem Generator-produzierten  $^{44}\text{Sc}$  hinsichtlich ihrer Parameter optimiert. Als Modellverbindung wurde das Somatostatin-Analogon DOTATOC gewählt. Es konnte bestätigt werden, dass die Komplexbildung mit  $^{44}\text{Sc}$  stark pH-abhängig ist. Hierbei erwies sich die Verwendung von  $\text{NH}_4\text{OAC}$ -Puffer (pH = 4) als optimal, da dieser auch für die Elution von  $^{44}\text{Sc}$  nach dem Post-Prozessing verwendet wird und den für die Markierung erforderlichen pH-Wert (pH-Bereich von 3–4) besitzt [2]. Weitere Optimierung der Markierungsparameter ergab höchste radiochemische Ausbeuten (>98 %) bei Einsatz von 21 nmol Peptid in 3 mL aufgereinigten  $^{44}\text{Sc}$ -Eluat (0,25 M  $\text{NH}_4\text{OAC}$ -Puffer, pH = 4) bei 95 °C innerhalb von 35 min (Abb. 23).

Weiterhin wurde der Einfluss einer Mikrowellen-gestützten Markierung auf die radiochemischen Ausbeuten untersucht. Für die Komplexbildung von  $^{68}\text{Ga}$  mit DOTA- oder NOTA-Derivaten konnte bereits der positive Einfluss der Mikrowellen-gestützten Markierung gezeigt werden [7, 8]. Für die Markierung mit  $^{44}\text{Sc}$  wurde eine deutliche Verkürzung der Reaktionszeit von 25 min auf 3 min bei gleichen Ausbeuten beobachtet werden.

Eine Aufreinigung kann mit kommerziell erhältlichen STRATA-X-Kartuschen (RP C-18; Phenomenex) durchgeführt werden. Das markierte Peptid wird in 0,4 mL reinem EtOH erhalten, mit einem Gehalt an unkomplexiertem  $^{44}\text{Sc}$  von <0,9 %. Nach Abdampfen des Alkohols kann  $^{44}\text{Sc}$ -DOTATOC im gewünschten Medium (z. B. 0,9 % NaCl) aufgenommen und weiter verwendet werden.

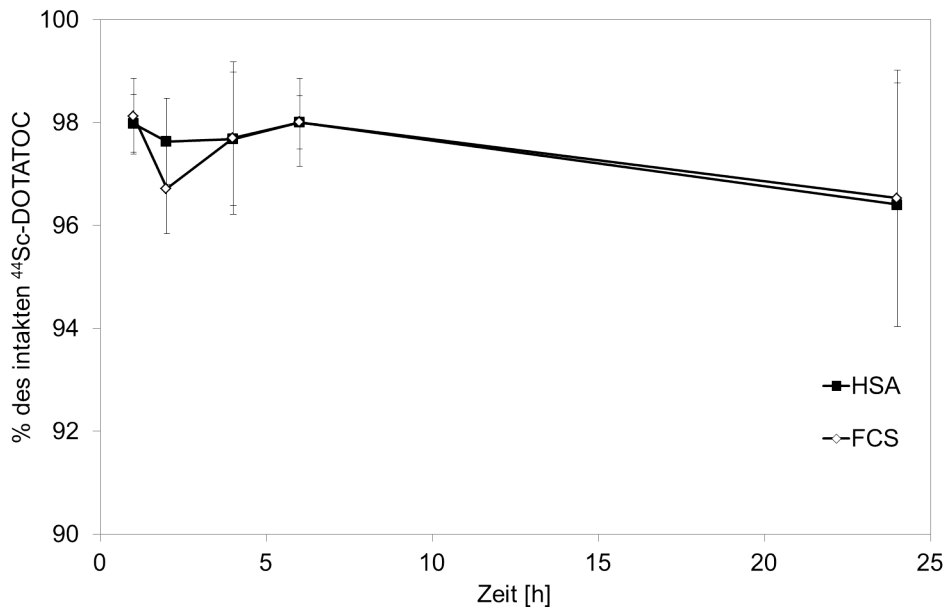




**Abb. 23:** Komplexbildung von  $^{44}\text{Sc}$ -DOTATOC bei pH 4,0 als Funktion der Zeit bei verschiedenen Temperaturen (21 nmol DOTATOC).

Im Anschluss an die Optimierung der Markierungsbedingungen wurde  $^{44}\text{Sc}$ -DOTATOC hinsichtlich seiner Stabilität evaluiert.

Für das Konjugat konnten sehr gute Stabilitäten in 0,9 % NaCl, PBS-Puffer (pH 7,4), Kälberserum (FCS) und humanem Serum (HSA) nachgewiesen werden (Abb 24).



**Abb. 24:** Stabilität von  $^{44}\text{Sc}$ -DOTATOC in Kälber- (FCS) und humanem (HSA) Serum bei 37 °C.

Weiterhin wurde die Stabilität von  $^{44}\text{Sc}$ -DOTATOC in Anwesenheit verschiedener Metallkationen ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) und anderer Chelatoren (DTPA, EDTA) untersucht.  $^{44}\text{Sc}$ -DOTATOC zeigt selbst nach 25 h bei 37 °C in Anwesenheit hoher Konzentrationen an Metallkationen ( $10^{-2}$  M) oder anderen Komplexligenanden (2,1  $\mu\text{mol}$ ) sehr hohe Stabilität.

Durch die Studie konnte gezeigt werden, dass bereits etablierte radiochemische Markierungsmethoden auch auf das Generator-produzierte  $^{44}\text{Sc}$  übertragbar sind. Dadurch könnten weitere Studien über die molekulare Bildgebung biologischer Prozesse über Zeiträume von mehr als 24 h mit diesem metallischen Positronenemitter angeregt werden.

## Referenzen

- [1] 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  $^{68}\text{Ga}$  for Medical Application“, *J. Nucl. Med.* **2007**, *48*, 1741–1748.
- [2] M. Pruszynski, N. Loktionova, D. Filosofov, F. Rösch, „Post-elution processing of  $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$  generator-derived  $^{44}\text{Sc}$  for clinical application“, *Appl. Rad. Isot.* **2010**, *68*, 1636–1641.
- [3] M. Perez-Malo Cruz, F. Rösch, „Improved efficacy of synthesis of  $^{68}\text{Ga}$ -radiopharmaceuticals in mixtures of aqueous solution and non-aqueous solvents“, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2012**, *39*.
- [4] F. Rösch, P. J. Riss, „The Renaissance of the  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  Radionuclide Generator Initiates New Developments in  $^{68}\text{Ga}$  Radiopharmaceutical Chemistry“, *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10*, 1633–1668.
- [5] N. S. Loktionova, A. N. Belozub, D. V. Filosofov, K. P. Zhernosekov, T. Wagner, A. Türler, F. Rösch, „Improved column-based radiochemical processing of the generator produced  $^{68}\text{Ga}$ “, *Appl. Rad. Isot.* **2011**, *69*, 942–946.
- [6] S. Mirzadeh, R. M. Lambrecht, „Radiochemistry of germanium“, *J. Radioanalyt. Nucl. Chem.* **1996**, *202*, 7–102.

- [7] I. Velikyan, G. J. Beyer, B. Langström, „Microwave-Supported Preparation of  $^{68}\text{Ga}$  Bioconjugates with High Specific Radioactivity“, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 554–560.
- [8] I. Velikyan, G. Lendvai, M. Vällilä, A. Roivainen, U. Yngve, M. Bergström, B. Langström, „Microwave accelerated  $^{68}\text{Ga}$ -labelling of oligonucleotides“, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2004**, *47*, 79–89.



## 5 Ausblick

Die vorliegende Dissertation hat sich mit vier verschiedenen Aspekten der Radiopharmakaentwicklung beschäftigt.

Nanomaterialien sind in den Fokus der Arzneimittelentwicklung gerückt, da sie, mit mehreren Funktionalitäten belegt, für Diagnostik und Therapie genutzt werden könnten. Durch passives, aber auch aktives Targeting können diese Nanotheranostika in tumorösem Gewebe akkumulieren. Eine Schlüsselrolle in der Entwicklung von Nanotheranostika übernehmen polymere Materialien. Diese eignen sich infolge ihrer hohen Biokompatibilität, biologischen Abbaubarkeit und strukturellen Vielfalt besonders für die Entwicklung von Theranostika. Durch die Einführung von Chelatoren in die Nanopartikel werden zahlreiche nicht-invasive Techniken zur Analyse der pharmakologischen Eigenschaften einfach zugänglich. Bisher fehlten allerdings systematische Studien zum Einfluss der Linkerstrukturen und des Belegungsgrades auf die Verfügbarkeit des Chelators für die Markierung. Anhand mehrerer HPMA-DOTA-Konjugate konnten erste Aussagen zum Einfluss von Linkerstruktur und Belegungsgrad auf die Radiometallmarkierung und die *in vitro*-Stabilität getroffen werden.

Im weiteren stehen noch *in vivo*-Evaluierungen aus, in denen zusätzlich in Langzeitstudien die Pharmakokinetik der Polymere, unter Ausnutzung der drei bereits verwendeten Radiometalle  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{44}\text{Sc}$  und  $^{177}\text{Lu}$ , untersucht werden sollen. Analoge Versuchsdurchführung der *in vivo*-Studien zu bereits bekannten Evaluierungen mit  $^{18}\text{F}$  und  $^{131}\text{I}$  [1] würde den direkten Vergleich der Ergebnisse ermöglichen.

Bevor jedoch Langzeit-*in vivo*-Studien durchgeführt werden können, sollte die Markierung mit dem Positronen-Emitter  $^{44}\text{Sc}$  weiter optimiert werden, mit dessen etablierter Markierungsschemie nur moderate Ausbeuten erzielt werden konnten. Zusätzlich könnten weitere Konjugate mit neuen Linkerstrukturen synthetisiert und systematisch untersucht werden.

## Referenzen

- [1] D. Moderegger, Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, **2012**, 227 pp.



# Abkürzungsverzeichnis

$\bar{D}$ .....	Mittlere absorbierte Dosis
$\tilde{A}$ .....	Zeitintegral der akkumulierten Aktivität
${}^0_1n, n$ .....	Neutron
${}^1_0\beta^+, \beta^+$ .....	Positron
${}^1_1p^+, p$ .....	Proton
Br .....	Brom
Me <sub>6</sub> TREN .....	Tris(2-Dimethylaminoethyl)-Amin
TcO <sub>4</sub> <sup>-</sup> .....	Pertechnetat
H <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> .....	Oxalsäure
°C .....	Grad Celsius
mL .....	Milliliter
nm .....	Nanometer
µm .....	Mikrometer
α .....	Alpha-Zerfall
β <sup>-</sup> .....	Beta-Minus-Zerfall
β <sub>branch</sub> .....	Wahrscheinlichkeit für den Positronenzerfall
ε .....	Elektroneneinfang
λ <sub>biol</sub> .....	Biologische Komponente
λ <sub>phys</sub> .....	Physikalische Komponente
ν <sub>e</sub> .....	Elektron-Neutrino
τ .....	Lebensdauer des Positroniums
A .....	Aktivität
ACPA .....	4,4'-Azobis(4-Cyanopentansäure)
AEX .....	Anion-Exchanger; Anionenaustauscher
AMG .....	Arzneimittelgesetz
ATRP .....	Atom Transfer Radical Polymerisation; Atom-Transfer Radikalische Polymerisation

---

CEX	Cation-Exchanger; Kationenaustauscher
CT	Computer-Tomographie
CTA	Chain Transfer Agent; Kettenübertragungsmittel
CTP	4-Cyanopentansäure-Dithiobenzoat
d	Tag
DMAPMA	N-[3-(Dimethylamino)-Propyl]-Methacrylamid
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-Tetraessigsäure
DOTATATE	(DOTA-D-Phe(1)-Tyr(3))-Octreotat
DOTATOC	(DOTA(0)-Phe(1)-Tyr(3))-Octreotid
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
$E_{\beta^+}^{\max}$	Maximale Energie des Positrons
$E_{\beta^+}^{\text{mean}}$	Mittlere Energie der Positronen
EPR-Effekt	Enhanced Permeability and Retention Effect; Erhöhte Permeabilität und Retention Effekt
FDG	2-Fluor-2-Desoxy-D-Glucose
g	Gramm
h	Stunde
IAEA	International Atomic Energy Association
kDa	Kilodalton
keV	Kiloelektronenvolt
LFRP	Lebende Freie Radikalische Polymerisation
M	Molarität
$M_n$	Zahlenmittel
$M_w$	Massenmittel
MBq	Megabequerel
mCi	Millicurie
MCP	Methyl-2-Chlorpropionat
MeV	Megaelektronenvolt
min	Minute
MIRD	Medical Internal Radiation Dose

---



## 5 Ausblick

---

mL	Milliliter
mol	Mol
MRT	Magnetresonanztomographie
N	Normalität
NOTA	1,4,7-Triazacyclononan-1,4,7-Triessigsäure
ns	Nanosekunde
PAMAM	Poly(Amidoamin)
PDI	Polydispersitäts Index
PDS	2-(2-Pyridyldisulfid)
PDSM	2-(2-Pyridyldisulfid)-Ethylmethacrylat
PEG	Polyethylenglykol
PET	Positron Emission Tomography; Positronen-Emissions-Tomographie
PGA	Polyhydroxyessigsäure
PK1; FCE 28068	HPMA-Doxorubicin-Konjugat
PLGA	Poly(lactid-co-Glycolid)
Poly(HPMA)	Poly(N-(2-Hydroxypropyl)-Methacrylamid)
Q	Energiegewinn bzw. -verlust
RAFT	Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer Polymerisation; Reversible Additions-Fragmentierungs Kettenübertragungs Polymerisation
RES	Retikulo-Endotheliales System
S	Mittlere absorbierte Dosis des Zielorgans
s	Sekunde; Source
SCID	Severe Combined Immunodeficiency; Schwerer Kombiniertes Immundefekt
SFRP	Stable Free Radical Polymerisation; Stabile Freie Radikalische Polymerisation
SNMMI	Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography; Einzelphotonen-Emissions-Computertomographie
ST-Polymer	Semitelecheles Polymer

t .....	Zeit; Target
$t_{1/2}$ .....	Halbwertszeit
TEMPO .....	2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxyl
TLC .....	Thin-Layer Chromatography; Dünnschichtchromatographie
VEGF .....	Vascular Endothelial Growth Factor

# Abbildungsverzeichnis

1	Vergleich von Drug Delivery-Systemen gegenüber niedermolekularen Verbindungen in der Krebstherapie . . . . .	2
2	Klinisch relevante Drug Carrier-Systeme . . . . .	3
3	Polymer-basierte Drug Carrier-Systeme . . . . .	3
4	Eigenschaften von Nanopartikeln . . . . .	5
5	EPR-Effekt . . . . .	6
6	Polymere Therapeutika . . . . .	9
7	Strukturen zweier HPMA-Konjugate . . . . .	11
8	HPMA-Darstellung via ATRP . . . . .	13
9	HPMA-Darstellung via RAFT . . . . .	14
10	Prinzip der PET . . . . .	18
11	Post-Prozessing Methoden . . . . .	20
12	Bifunktionaler Chelator . . . . .	24
13	Strukturen von DOTA, DO3A und DOTATOC . . . . .	25
14	Strukturen zweier HPMA-Konjugate . . . . .	31
15	Synthese der ( <sup>t</sup> Bu) <sub>3</sub> -DOTA-Liganden . . . . .	142
16	Markierung der HPMA-DOTA-Konjugate mit <sup>68</sup> Ga . . . . .	143
17	Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute der Markierung der Konjugate mit <sup>68</sup> Ga von der Linkerstruktur und dem Belegungsgrad . . . . .	144
18	Markierung von <b>31</b> mit <sup>68</sup> Ga, <sup>44</sup> Sc und <sup>177</sup> Lu . . . . .	145
19	Erstes $\mu$ PET-Bild mit dem <sup>68</sup> Ga-markierten HPMA-DOTA-Konjugat <b>31</b> . . . . .	146
20	Vergleich der Markierungskinetiken von <sup>68</sup> Ga-DOTATOC mit <sup>68</sup> Ga nach Ethanol- (1 M HEPES buffer, 2 mL, 80 °C) und nach Aceton-Post-Prozessing (Wasser, 5 mL, 80 und 95 °C). . . . .	150
21	Ergebnisse der Trennung von <sup>68</sup> Ga und <sup>68</sup> Ge-Durchbruch für die untersuchten Kationen- austauscher . . . . .	153

---

22	Bestimmung des $^{68}\text{Ge}$ -Durchbruchs mittels TLC . . . . .	155
23	Komplexbildung von $^{44}\text{Sc}$ -DOTATOC bei pH 4,0 als Funktion der Zeit bei verschiedenen Temperaturen . . . . .	157
24	Stabilität von $^{44}\text{Sc}$ -DOTATOC in Kälber- (FCS) und humanem (HSA) Serum . . . . .	157

# Tabellenverzeichnis

1	Target-Vektoren für das aktive Targeting . . . . .	8
2	PET-relevante Generatorsysteme . . . . .	19
3	Ausgewählte Radiometalle für die Theranostik . . . . .	28
4	Ausgewählte polymere Nanotheranostika . . . . .	30
5	Analytische Daten der dargestellten HPMA-DOTA-Konjugate <b>31–35</b> . . . . .	142
6	Markierung der HPMA-DOTA-Konjugate mit Hilfe verschiedenen <sup>68</sup> Ga-Post-Prozessings	145
7	Stabilitäten der <sup>68</sup> Ga-HPMA-DOTA-Konjugate in Gegenwart von verschiedenen Metallkationen und Chelatoren . . . . .	146
8	Relative Verteilung von <sup>68</sup> Ga(III) auf den untersuchten Kationenaustauschersäulen . . .	148
9	Vergleich der relativen Verteilung (%) der Metallkationen auf AG 50W–X8 für beide Post-Prozessings . . . . .	149
10	Masse und Kombination der verwendeten Austauscherharze für die quantitative Separation von <sup>68</sup> Ge und <sup>68</sup> Ga . . . . .	152
11	R <sub>f</sub> -Werte von <sup>68</sup> Ga, <sup>68</sup> Ga-DOTATOC und <sup>68</sup> Ge auf TLC Platten mit den untersuchten mobilen Phasen . . . . .	154



# Danksagung

No one who achieves success does so  
without acknowledging the help of others.

The wise and confident acknowledges  
this help with gratitude.

---

*Alfred North Whitehead (1861–1947)*





# Eidstattliche Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 01.11.2009 bis zum 01.11.2013 am Institut für Kernchemie der Johannes Gutenberg-Universität durchgeführt. Ich versichere, dass ich die Arbeit selbst durchgeführt und keine anderen als die in der Dissertation angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Elisabeth Eppard