JOHANNES GUTENBERG UNIVERSITÄT MAINZ

Synthese und radiochemische Evaluierung von Chelatoren für milde Markierungen mit ^{68}Ga, ^{44}Sc und ^{177}Lu sowie *in vitro*- und *in vivo*-Evaluierung von deren TOC- und PSMA-Derivaten

Dissertation

zur Erlangung des Grades
„Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)“
im Promotionsfach Chemie

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

Jean-Philippe Sinnes
geboren in Wiesbaden

Mainz, Juli.2018

Zusammenfassung

In der Radiopharmazeutischen Chemie wird die Verwendung von Chelatoren zur Komplexierung von Radiometallen immer wichtiger. Die Konjugate von Chelatoren und Biomolekülen (Radiopharmaka) ermöglichen mittels Positronenemissionstomographie (PET) und Einzelphotonen-Emissions-computertomographie (engl. SPECT) sowohl die Visualisierung als auch die Therapie von malignen Tumoren mit Therapienukliden. Die Verbindung beider Anwendungen in der "Theranostik" ist ein neues Kernfeld der Nuklearmedizin.

Bis auf wenige Ausnahmen (die ionisch verabreichten Kationen ^{89}Sr, ^{223}Ra, ^{201}Tl) können Radiometalle für die Nuklearmedizin ausschließlich durch koordinative Bindungen zu Chelatoren und nicht kovalent nutzbar gemacht werden. Die Radiometall-Chelator-Komplexe müssen angemessene Reaktionszeiten und -bedingungen bei der Komplexbildung als auch eine gute Komplexstabilität *in vivo* aufweisen. Hierbei können die Radiometall-Chelator-Komplexe in sich bereits physiologisch relavent sein, wie für verschiedene ^{99m}Tc-Komplexe bekannt (^{99m}Tc-Sestamibi bekannt als Cardiolite® für Brustkrebsimaging). Andere Komplexe bzw. die Chelatoren werden an Targetmoleküle gekoppelt, welche eine bestimmte physiologische Anreicherung zeigen. Diese Targetmoleküle stellen Anforderungen an die Radiomarkierung, da diese nur unter bestimmten Bedingungen stabil sind (Beispielsweise Antikörper: physiologischer pH und Temperaturen < 37 °C). Die Auswahl eines Radionuklids muss ebenfalls in Abstimmung mit der angestrebten Anwendung erfolgen, da nach der Radiomarkierung und Aufreinigung noch die Zirkulationszeit *in vivo* bis zur genügenden Anreicherung im Target zu beachten ist. Diese kann bei gewissen Biomolekülen, wie Antikörpern, bis zu 7 Tagen dauern.

Die vorliegende Dissertation gliedert sich in folgende 3 Hauptabschnitte: Hauptabschnitte 1: DATA^{5m}; Hauptabschnitt 2: AAZTA^{5}; Hauptabschnitt 3: Nebenprojekte. Jeder Hauptabschnitt enthält bereits veröffentlichte Arbeiten. An diese schließen sich Manuskripte für die Veröffentlichung und Abschnitte zu Kooperationen und Projekten an.

Im ersten Hauptabschnitt wurden Derivate des neuen ^{68}Ga-Chelators DATA^{5m}, das DATA^{5m}-TOC und DATA^{5m}-PSMA, in *in vitro*-Studien als auch *in vivo*-Tier- und Humanstudien bezüglich ihrer Affinität zu den korrespondierenden Rezeptoren und ihr Potenzial in der molekularen Bildgebung untersucht. Das [^{nat}Ga]Ga-DATA^{5m}-TOC mit dem Somatostatin-Analogon [DPhe^{1}][Tyr^{3}]-Octreotid (TOC) konnte an HEK293-Zellmembranen eine zum etablierten [^{nat}Ga]Ga-DOTA-TOC vergleichbare Affinität zum humanen Somatostatin-Rezeptor 2 (hsst$_2$) aufweisen. Erste präklinische *in vivo*-Tierstudien mit [^{68}Ga]Ga-DATA^{5m}-TOC in tumortragenden Mäusen zeigten eine spezifische Anreicherung im Tumorgewebe vergleichbar zum [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC. Diese Ergebnisse konnten in einem 46-Jährigen

Patienten mit differenzierbarem neuroendokrinen Tumor (NET) im Pankreas bestätigt werden, wobei das [^{68}Ga]Ga-DATA^{5m}-TOC eine geringere Aufnahme im Tumor zeigte (SUV([^{68}Ga]Ga-DATA-TOC) = 46,9 vs. SUV([^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC) = 71,1). Durch eine geringere Aufnahme in die Leber konnte dort dennoch mit dem [^{68}Ga]Ga-DATA^{5m}-TOC ein besserer Kontrast erhalten werden. Diese Ergebnisse konnten später in einer 19 Patienten umfassenden Studie bestätigt werden. [^{68}Ga]Ga-DATA^{5m}-PSMA zeigte vergleichbar gute Markierungseigenschaften wie das DATA^{5m}-TOC und eine ebenfalls hohe Stabilität. Anschließende *in vitro* Studien des [$^{nat/68}$Ga]Ga-DATA^{5m}-PSMA zur Bindungsaffinität und Internalisierung auf PSMA-positiven LNCaP-Zellen zeigten eine nanomolare Bindungsaffinität, allerdings eine vergleichbare Internalisierung.

Der zweite Hauptabschnitt befasst sich mit dem AAZTA^5-Chelator und seinen TOC- und PSMA-Derivaten, welche mit AAZTA^5 als theranostischem Chelator mit diagnostischen (^{68}Ga und ^{44}Sc) als auch therapeutisch genutzten Radionukliden (^{117}Lu) evaluiert wurden. AAZTA^5, AAZTA^5-TOC und AAZTA^5-PSMA konnten mit allen drei Radiometallen quantitative Ausbeuten von >99 % bei Raumtemperatur in weniger als 5 Minuten erreichen. Dabei konnten für alle Nuklide und Derivate geringe Vorläufermengen verwendet werden. Weiterhin zeigten die Markierungen, dass auch bei höheren pH-Werten nahe dem physiologischen pH immer noch eine schnelle und quantitative Komplexierung aller drei Nuklide mit allen Derivaten möglich war. Besonders die ^{44}Sc-Komplexe aller Derivate stellten sich als sehr stabil über 24 Stunden heraus. Die ^{177}Lu-Komplexe waren über 24 Stunden stabil, aber nach mehreren Tagen kam es zu einer leichten Degradierung der ^{177}Lu-Komplexe. Der ^{68}Ga-Komplex des AAZTA^5 war, wie aus der Literatur zu erwarten, nicht vollständig stabil über die gewünschten 2-3 Stunden. Bei den ^{68}Ga-Komplexen der Derivate des AAZTA^5 (AAZTA^5-TOC und AAZTA^5-PSMA) konnte hingegen eine hohe bis vollständige Stabilität über 2-3 Stunden gefunden werden. Weiterführende *in vitro*-Studien zur Bindungsaffinität und Internalisierung des [$^{nat/68}$Ga]Ga-, [$^{nat/44}$Sc]Sc- und [$^{nat/177}$Lu]Lu-AAZTA^5-PSMA zeigten eine Bindungsaffinität im niedrig nanomolaren Bereich, wobei das [$^{nat/68}$Ga]Ga-AAZTA^5-PSMA die höchste Affinität mit 8,69 ± 0,95 nM vergleichbar zum [^{nat}Ga]Ga-PSMA-617 mit 6,4 ± 1,02 nM aufwies. Allgemein konnte für die AAZTA^5-PSMA-Komplexe eine sehr hohe Internalisierung vergleichbar zu den korrespondierenden PSMA-617-Komplexen festgestellt werden. In ersten *in vivo* Tierstudien in Mäusen konnte das [^{44}Sc]Sc-AAZTA^5-PSMA einen aus LNCaP-Zellen gebildeten Tumor gut visualisieren. Abschließend konnten auch AAZTA^5-Varianten zur milden Kopplung mit ^{177}Lu evaluiert werden und erfolgreich an den Antikörper mAk gekoppelt werden.

Der letzte Hauptabschnitt unterteilt sich in mehrere kleinere Projekte:

In den ersten beiden Unterprojekten wurde die Möglichkeit zum Einsatz des [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 für die Dosimetrie zur PRRT untersucht. Es konnte anhand von 5 Patienten durch einen Vergleich der Dosimetrie von [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 und [^{68}Ga]Ga-PSMA-617 gezeigt werden, dass [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 gut geeignet ist und größere Studien mit mehr Patienten nötig sind.

Das dritte Unterprojekt befasst sich mit dem ^{44}Ti/^{44}Sc-Generator. Nach Auftreten eines ^{44}Ti-Durchbruchs konnte > 90 % der ^{44}Ti Aktivität auf eine neue Säule transferiert und damit der Durchbruch normalisiert werden.

Im vierten Unterprojekt werden die Ergebnisse von zwei Kooperationen zum Thema *in vivo* Click vorgestellt. Erste *in vivo*-Click-Tierversuche mit dem [^{68}Ga]Ga-DATA^{5m}-PEG$_{11}$-Tz konnten einen Bauchspeicheldrüsentumor nach Vorabinjektion des Antikörpers 5B1-TCO erfolgreich darstellen. Weiterhin konnte in einer proof-of-concept-Studie das *in vivo*-Click-Prinzip mit einem Bisphosphonat-Modell bestätigt werden.

In einem fünften Unterprojekt wurden die Markierungseigenschaften von DATA^{5m} und zwei Abwandlungen, dem DATA^{5dm} und DADA^{A4m}, mit [^{18}F]AlF^{2+} untersucht. Der erhaltene [^{18}F]AlF^{2+}-DATA^{5m}-Komplex erwies sich als nicht stabil und die neuen Chelatoren DATA^{5dm} und DADA^{A4m} konnten keine Umsetzung mit dem [^{18}F]AlF^{2+} zeigen.

Im letzten Unterprojekt wurden weiterführende Tierversuche mit [^{225}Ac]Ac-DOTA^{ZOL} aufbauend auf den Daten von Pfannkuchen *et al.* durchgeführt. Durch Erhöhung der Vorläufermenge oder DTPA-Zusatz konnte der im Präperat vorhandene Anteil unkomplexierten ^{225}Ac auf 0 reduziert werden. Durch Zusatz von DTPA zur Injektion wurde dieser Anteil in den [^{225}Ac]Ac-DTPA-Komplex überführt, welcher schnell renal ausgeschieden wird. Beide Effekte verringern die ^{225}Ac-Aufnahme in die Leber. Parallel dazu konnte eine erhöhte Knochenaufnahme bei Koinjektion von DTPA festgestellt werden. Abschließend konnten Erkenntnisse über den *in vivo*-Verbleib der Tochternuklide des ^{225}Ac, dem ^{221}Fr und ^{213}Bi, getroffen werden und errechnet werden, dass etwa 17% der Aktivität der Tochternuklide nicht am Knochen verbleibt.

Meinen Eltern

Inhalt

1. Einleitung 3

1.1 Positronenemissionstomographie PET 4

1.1.1 Grundlagen 4

1.1.2 PET-Technik 5

1.1.3 Eigenschaften von PET-Isotopen 7

1.2 Gallium-68 9

1.2.1 Eigenschaften 9

1.2.2 ^{68}Ge/^{68}Ga-Nuklidgenerator 10

1.3 Scandium-44 12

1.3.1 Eigenschaften / wichtige Isotope 12

1.3.1 ^{44}Ti/^{44}Sc-Nuklidgenerator 13

1.4 Radionuklide für die Therapie 14

1.4.1 Lutetium-177 15

1.5 Chalatoren für dreiwertige Metalle 16

1.5.1 Komplexchemie 16

1.5.2 Bifunktionelle Chelatoren 17

1.5.3 Azyclische Chelatoren 17

1.5.4 Makrozyclische Chelatoren 20

1.5.5 Hybridische Chelatoren 21

1.6 Targetvektoren 23

1.6.1 Somatostatin 23

1.6.2 PSMA 24

2.0 Problemstellung und Zielsetzung 27

3.0 Literaturverzeichnis 30

4.0 Hauptabschnitt 1: DATA^{5m} 39

4.1 Instant kit-preparation of ^{68}Ga-radiopharmaceuticals via the chimeric chelator DATA: Clinical translation of [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC 41

4.2 Novel bifunctional DATA chelator for quick access to site-directed PET ^{68}Ga-radiotracers: Preclinical proof-of-principle with [Tyr^3]octreotide 63

4.3 Weiterführende Patienten Studien zu DATA^{5m}-TOC 83

4.4 DATA^{5m}-PSMA: Radiomarkierung und in vitro Evaluation 86

5.0 Hauptabschnitt 2: AAZTA^5 91

5.1 AAZTA^5/AAZTA^5-TOC: Synthesis and radiochemical evaluation with ^{68}Ga, ^{44}Sc and ^{177}Lu 93

5.2 [^{44}Sc]Sc-AAZTA^5-PSMA for radiotheranostics in tandem with [^{177}Lu]Lu-AAZTA^5-PSMA: radiolabeling and stability with ^{68}Ga, ^{44}Sc and ^{177}Lu and preclinical investigation 107

Ergänzung zu 5.2: Erste *in vivo* Tierstudien mit [^{44}Sc]Sc AAZTA^5-PSMA 125

5.3 Synthesis and radiolabelling of new AAZTA-derivatives with ^{177}Lu for mild coupling with targeting vectors 127

6.0 Hauptabschnitt 3: kleinere Projekte und Kooperationen 155

6.1 Prediction of normal organ absorbed doses for [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 using [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 biokinetic and dosimetric analysis data 157

6.2 [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 Biodistribution and Dosimetry in Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Carcinoma 175

6.3 Regeneration des ^{44}Ti/^{44}Sc-Generators 195

6.4 *In vivo*-Click-Anwendung von DATA^{5m}- und DOTA-PEG$_{11}$-Tetrazinen 201

6.5 Evaluation des DATA chelators mit [^{18}F]AlF^{2+} 213

6.6 Weiterführende *in vivo*-Evaluationen mit [^{225}Ac]Ac-DOTA^{ZOL} 221

7.0 Zusammenfassung und Ausblick 229

Danksagung ..... **Fehler! Textmarke nicht definiert.**

Eidesstattliche Erklärung ..... **Fehler! Textmarke nicht definiert.**

Curriculum Vitae ..... **Fehler! Textmarke nicht definiert.**

1. Einleitung

Über die letzten Jahrzehnte hat sich Krebs zu einer der häufigsten Todesursachen auf der Welt entwickelt. Hochrechnungen der weiteren Entwicklung deuten auf ein konstantes Steigen der Neuerkrankungen und Todesfälle durch Krebserkrankungen hin. Laut dem World Cancer Report 2014 wird mit jährlich bis zu 20 Millionen Neuerkrankungen ab dem Jahr 2025 gerechnet, einem Anstieg von fast 40% im Verhältnis zu heutigen Zahlen [1–3]. Das Ansteigen der Neuerkrankungen begründet sich vorwiegend auf der steigenden Lebenserwartung und verschiedenen äußeren Einflüssen [4]. Mit der steigenden Anzahl an Neuerkrankungen wird die Diagnose und Therapie von Krebserkrankungen immer wichtiger. Für die Diagnose, besonders die frühe Erkennung, einer Krebserkrankung sind nuklearmedizinische Verfahren wie die Positronenemissiontomografie (PET) und Einzelphotonenemissionstomographie (SPECT) von großem Vorteil. Als nich-tinvasive Verfahren ermöglichen diese bildgebenden Methoden sowohl eine Visualisierung des Tumors als auch seiner Metastasen. Als Grundlage für diese Verfahren gilt das "Tracer-Prinzip" nach Georg de Hevesy, wofür er 1943 den Nobelpreis für Chemie erhielt [5]. Hierbei werden kleinste Mengen Radioaktivität, sogenannte „Spurerzeuger“ oder auch Tracer, in den Stoffwechselprozess eines Patienten eingebracht und nehmen an diesem Teil, jedoch ohne diesen zu beeinflussen. Mittels geeigneter Detektoren wird dann die Verteilung der Radioaktivität im Körper gemessen und die biochemischen Vorgänge, an denen der Tracer teilnimmt, visualisiert [6, 7]. In der modernen Nuklearmedizin wird das Messverfahren der PET und der SPECT mit einem morphologisch bildgebenden Verfahren, wie der CT oder MRT, gekoppelt. Durch die Kopplung der morphologischen Daten mit der Visualisierung der biochemischen Prozesse lassen sich diese direkt zuordnen [8, 9].

In der modernen Radiochemie stehen die Neu-und Weiterentwicklung dieser Tracer im Mittelpunkt. Ein solcher Tracer baut sich aus einem biologisch aktiven Molekül (meist ein Biomolekül wie z.B. ein Peptid) und einem radioaktiven Teil auf. Den radioaktiven Teil kann man nach Strahlungsart, β^+-Emitter für die PET (z.B. ^{18}F, ^{68}Ga) oder γ^--Emitter für die SPECT (z.B. ^{99m}Tc, ^{123}I), und nach der Bindungsart, direkte kovalente Bindung und koordinative Bindung über einen Chelator, unterscheiden. Eine direkte kovalente Bindung kann für Nuklide wie ^{18}F, ^{11}C oder ^{123}I gewählt werden, wobei diese meist im Targetvektor (kurz TV) einen möglichst ähnlichen Baustein ersetzen. Die koordinative Bindung über einen Chelator wird vorwiegend für metallische Nuklide, wie ^{68}Ga, ^{89}Zr oder ^{177}Lu, gewählt, da diese keine direkte kovalente Bindung eingehen können [10].

Nachdem die nuklearmedizinischen Verfahren in der Diagnose und auch in der Visualisierung des Krankheitsverlaufs während einer Therapie eingesetzt werden, geht der Trend in den letzten

Jahren immer mehr dazu, die Nuklearmedizin auch in der Therapie anzuwenden. Hierbei werden Nuklide mit stark gewebeschädigender Strahlung (z.B. ^{177}Lu als β^--Strahler oder ^{225}Ac als α-Strahler) verwendet um Tumorgewebe zu zerstören. Damit auch wirklich nur das Tumorgewebe zerstört wird, kommt wieder ein Target Vektor (TV) zum Einsatz, welcher das Radionuklid *in vivo* zum Tumor transportiert. Aktuell wird bereits mit ^{90}Y- oder ^{177}Lu-markierten Peptiden wie Octreotid peptidrezeptorvermittelte Radiotherapie durchgeführt. Es handelt sich bei der Radiotherapie wie auch bei der Diagnostik um ein nicht-invasives Verfahren [11–14].

1.1 Positronenemissionstomographie PET

1.1.1 Grundlagen

Die PET basiert auf Positronenemittern, welche sich als neutronenarme bzw. protonenreiche Kerne durch das Aussenden eines Positrons (β^+ Teilchens) stabilisieren. Zum Spinerhalt wird ein Elektronneutrino (ν_e) ausgesendet, was eine Dreikörperumwandlung bedingt:

$$ {}^{A}_{Z}X_N \rightarrow \ {}^{A}_{Z-1}Y_{N+1} + \ {}^{0}_{1}e^{+} \ + \ \nu_e \ + \ Q $$

Die für jedes Nuklid charakteristische Umwandlungsenergie Q verteilt sich als kinetische Energie sowohl auf den Kern als auch auf die emittierten Teilchen (β^+ und ν_e). Je nachdem wieviel Energie auf das ν_e übertragen wird, erhält das β^+-Teilchen mehr oder weniger Energie, wodurch das β^+-Teilchen keine diskrete Energie aufweist. Diese Energie wird durch Wechselwirkung mit der umgebenden Materie abgegeben, wodurch das Teilchen mit jeder Wechselwirkung an kinetischer Energie verliert. Sobald sich die kinetische Energie im thermischen Bereich befindet, bildet sich mit einem Elektron aus der Umgebung ein Positronium. Dieses annihiliert unter Aussendung von zwei bis drei Gammaquanten [15]. Man differenziert zwischen *ortho*-Positronium (*o*-Ps) und *para*-Positronium (*p*-Ps), welche sich in der Ausrichtung der Spins sowie der mittleren freien Lebensdauer τ_s^0 unterscheiden. Das *p*-Ps besitzt eine antiparallele Spinanordnung, welche in einer Annihilation unter Emission zweier γ-Quanten mit einer Energie von jeweils 511 keV und einem Emissionswinkel von 180° resultiert. Durch die deutlich längere Lebendauer des *o*-Ps und der Möglichkeit zur Umwandlung in ein *p*-Ps kommt die Annihilation des *p*-Ps deutlich häufiger vor.

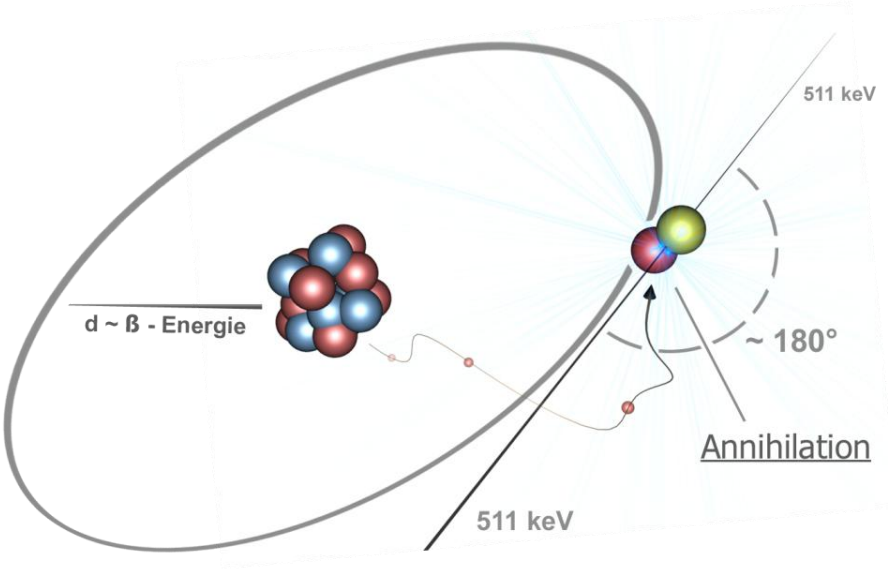


Abbildung 1: Annihilation des *p-Ps* und Aussendung von zwei γ-Quanten von 511 keV.[16]

Die Strecke, die das Positron nach Emission aus dem Radionuklid bis zur endgültigen Vernichtung zurücklegt, hängt von der kinetischen Energie ab, mit der das Positron ausgesandt wird. Je höher seine kinetische Energie E_{Kin}, desto größer ist die zurückgelegte Wegstrecke, bis es zur Annihilation kommt. Damit hängt die Auflösung bei der PET direkt mit der Zerfallsenergie Q zusammen, wie in Abbildung 1 anhand der Strecke *d* zu erkennen ist.

1.1.2 PET-Technik

Zur Lokalisation des Radiopharmakons im menschlichen Körper oder auch im Tier wird die Koinzidenzmessung der zwei 511 keV γ-Quanten genutzt. Mithilfe eines ringförmigen Detektorsystems werden gleichzeitig an gegenüberliegenden Detektoren eintreffende Signale als Koinzidenzen erkannt und mithilfe von Computer-Algorithmen ausgewertet. Dabei werden zufällige Koinzidenzen herausgerechnet und ein dreidimensionales Bild erstellt.

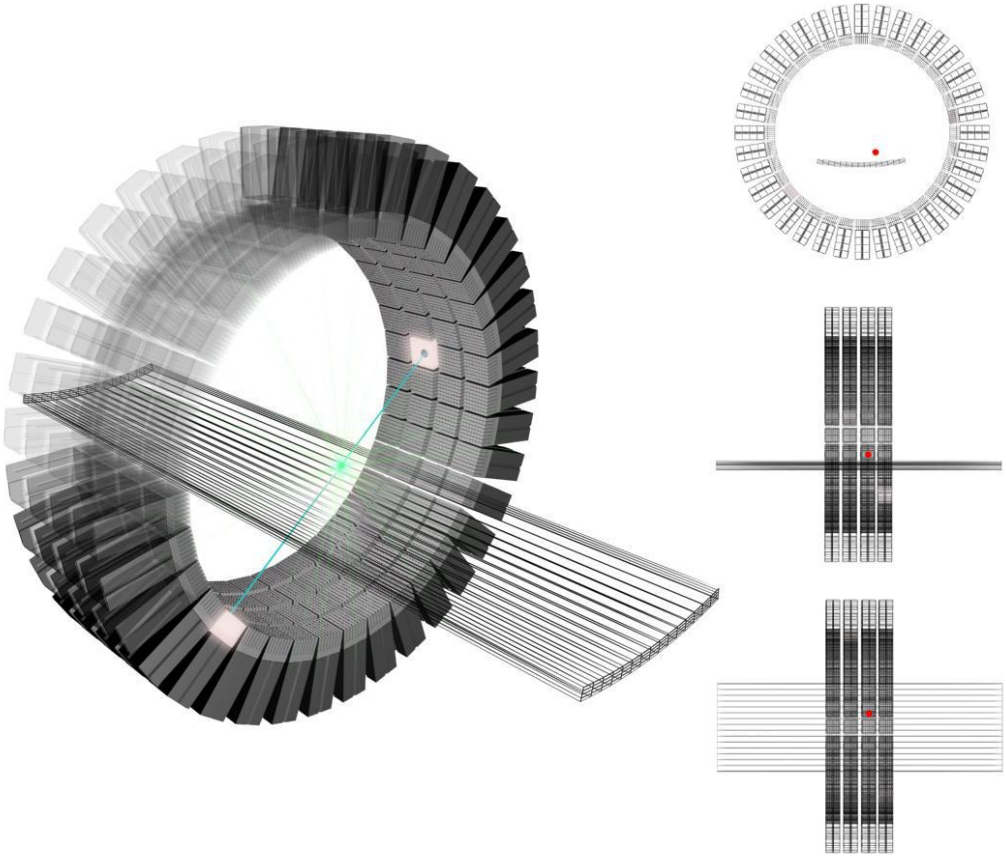


Abbildung 2: Möglicher Detektorringaufbau für eine PET Messung.[16]

Als Detektormaterialien kommen in den PET-Geräten verschiedenste Materialien zum Einsatz, die unterschiedliche Eigenschaften aufweisen. Üblicherweise kommen Bismutgermanat (BGO), Lutetiumorthosilikat (LSO), Gadoliniumsilikat (GSO) oder Lutetiumyttriumorthosilikat (LYSO) zum Einsatz. Wichtige Eigenschaften sind hier vor allem die Abklingzeit, Lichtausbeute, „*stopping power*“ und Totzeit. Höhere Abklingzeiten sorgen aufgrund der Vergrößerung des Koinzidenzfensters für vermehrte zufällige Koinzidenzen. Die Lichtausbeute ist ein wichtiger Faktor für die Energie- und damit die Ortsauflösung des Detektors. Hohe Totzeiten sorgen dafür, dass in kurzen Zeitfenstern eintreffende Quanten nicht registriert werden können. Eine hohe „*stopping power*“ sorgt dafür, dass eintreffende Quanten auch tatsächlich wechselwirken und damit gemessen werden [17].

1.1.3 Eigenschaften von PET-Isotopen

Messtechnisch sind alle Positronenstrahler mit der PET detektierbar, aber nicht alle sind für die PET in der Nuklearmedizin einsetzbar. Wichtige Eigenschaften, die bei der Auswahl berücksichtigt werden müssen, sind ihre Halbwertszeit $t_{1/2}$, ihre maximale β^+-Energie, ihre Verfügbarkeit und die Wahrscheinlichkeit sich neben der β^+-Umwandlung über andere kernchemische Prozesse zu stabilisieren. Desweiteren spielen zusätzliche Strahlungsarten, welche durch andere kernchemische Prozesse erzeugt werden, und die entstehenden Umwandlungsprodukte eine große Rolle für Detektion und auch die Dosimetrie des Patienten. Nicht zuletzt müssen Radionuklide nach ihrer Chemie unterschieden werden. Organische oder nicht-metallische Isotope werden über kovalente Bindungen an organische Moleküle gebunden, was ein äußerst ähnliches Derivat zu ihren biologisch aktiven Vorbildern darstellt. Bei metallischen Radionukliden kommt ein Chelator zum Einsatz, welcher über ionische Bindungen das Metall komplexiert und eine relativ starke Veränderung am TV darstellt.

Die Relevanz der Halbwertszeit wird durch die Geschwindigkeit des zu visualisierenden biologischen Prozesses bestimmt. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über die Halbwertszeiten der am häufigsten verwendeten Positronenemitter:

Tabelle 1: Übersicht über häufig verwendete Positronenemitter in der PET.[18–22]

Nuklid	$t_{1/2}$	Anteil β^+ (%)	$E_{\beta,max}$ (MeV)	Herstellung
^{11}C	20,3 min	100	0,960	$^{14}N(p,\alpha)^{11}C$
^{18}F	109,6 min	97	0,635	$^{18}O(p,n)^{18}F$
^{124}I	4,2 d	100	0,973	$^{124}Te(p,n)^{124}I$
^{44}Sc	3,9 h	94	1,470	$^{44}Ti/^{44}Sc$-Generator
^{64}Cu	12,7 h	17,8	0,578	$^{64}Ni(p,n)^{64}Cu$
^{68}Ga	67,71 min	89	1,899	$^{68}Ge/^{68}Ga$-Generator
^{82}Rb	1,27 min	91	1,117	$^{82}Sr/^{82}Rb$-Generator
^{89}Zr	3,3 d	23	0,902	$^{89}Y(p,n)^{89}Zr$

Kohlenstoff-11 mit einer Halbwertszeit von 20 Minuten kann zur Darstellung schneller biologischer Vorgänge (zum Beispiel in Form von [^{11}C]Methionin zu Visualisierung von Hirntumoren [23]) verwendet werden. Er wird dabei direkt in den TV eingebaut und darf wegen der kurzen Halbwertszeit nahezu keine organische Synthese benötigen. Prozesse, welche organische Synthese voraussetzen oder eine langsamere Anreicherung *in vivo* aufweisen, benötigen dementsprechend Nuklide mit einer längeren Halbwertszeit. Mit ca. 110 Minuten besitzt ^{18}F eine Halbwertszeit, welche eine organische Synthese mit anschließender Aufreinigung ermöglicht. Damit findet ^{18}F in vielen Radiotracern Anwendung: z.B. in [^{18}F]FDOPA zur Visualisierung des dopaminergen Systems, in [^{18}F]FDG zur Visualisierung von Tumoren in der Onkologie [24] oder ungebunden als Fluorid in [^{18}F]NaF zur Darstellung von Knochenmetastasen [25]. Bei längeren biologischen Halbwertszeiten, wie zum Beispiel bei Antikörpern, benötigt man entsprechend Nuklide die noch nach mehreren Tagen nachweisbar sind. Für monoklonale Antikörper kommt aktuell bereits ^{89}Zr zum Einsatz [26], welches das Zielgewebe auch nach mehreren Tagen noch sichtbar macht und somit für die langsame Pharmakokinetik des Antikörpers passend ist.

Ein weiterer wichtiger Faktor findet sich in dem Anteil an β^+-Zerfall gegenüber anderen möglichen Umwandlungen des Nuklides. Als direkter Konkurrenzprozess zum β^+-Zerfall ist der Elektroneneinfang (EC) der häufigste parallele Umwandlungskanal der bei Positronenemittern beobachtet wird. Über diesen können sich protonenreiche Kerne durch Einfangen eines kernnahen Elektrons und dessen Reaktion mit einem überschüssigen Proton unter Bildung eines Neutrons stabilisieren. Bei diesem Prozess wird nur ein γ-Quant frei, welches keine Koinzidenz auslösen kann und somit nicht im PET gemessen wird. Es erzeugt eher ungewollte zusätzliche Strahlung, welche aber durch passende Algorithmen herausgerechnet werden kann. Weiterhin tritt bei speziellen Nukliden wie dem Kupfer-64 auch ein gewisser Anteil an β^--Zerfall auf. Diese Strahlung ist stark ionisierend und wird damit häufig in der Therapie zum Zerstören von Gewebe eingesetzt. Allgemein sind andere Zerfallskanäle ungünstig für die Messung mittels PET, da sie entweder nicht detektiert werden oder sogar wie beim Kupfer-64 die Dosisleistung für den Patienten deutlich erhöhen.

Für die letztendliche Auflösung der PET-Bilder spielt auch die jeweilige maximale und durchschnittliche β^+-Energie eine Rolle. Mit steigender kinetischer Energie des emittierten Positrons steigt auch die in Materie zurückgelegte Wegstrecke und damit die Ortsunschärfe. Dementsprechend sind Nuklide mit einer möglichst niedrigen β^+-Energie und damit höheren möglichen Auflösung bevorzugt.

Ein letzter eher praktisch orientierter Punkt ist die Herstellung und die damit verbundene Verfügbarkeit des Radionuklides. Viele große Kliniken mit einer nuklearmedizinischen Abteilung verfügen heutzutage bereits über ein Zyklotron. Damit lassen sich einige Nuklide wie ^{11}C, ^{13}N und ^{18}F

herstellen, aber für viele neuere Anwendungen (z.B. Antikörper) werden Nuklide mit längeren Halbwertszeiten benötigt. Die dafür benötigten größeren Zyklotrone sind nur an einigen wenigen klinischen Einrichtungen zu finden. Diese benötigen aber zusätzlich zur eigentlichen Produktion eine komplexe Abtrennung, welche eine eigene radiochemische Abteilung voraussetzt.

Die Alternative zu den am Zyklotron produzierten Nukliden stellen die Generatornuklide dar. Diese werden über ein Gleichgewicht mit ihrem Mutternuklid konstant aus diesem nachgebildet und abgetrennt. Das heutzutage am häufigsten in der Klinik verwendete Generatornuklid ist ^{99m}Tc [27]. Ein weiteres bereits stark verbreitetes Generatornuklid ist ^{68}Ga, welches über einen ^{68}Ge/^{68}Ga-Generator verfügbar ist. In den vergangen Jahren hat ^{68}Ga einen deutlichen Aufschwung erlebt, nachdem PSMA-11 und PSMA-617 entwickelt wurden und damit eine deutliche Verbesserung in der Diagnostik von Prostatakrebs erreicht werden konnte [28].

1.2 Gallium-68

1.2.1 Eigenschaften

Gallium ist eines der seltenen Metalle auf der Erde und tritt in der Natur meist in Kombination mit Zink oder Aluminium auf, wodurch es hauptsächlich als Nebenprodukt bei deren Produktion abfällt [29]. In wässrigen Lösungen liegt Gallium als Ion mit der Oxidationszahl +3 vor und verhält sich wie eine harte Lewis-Säure. Als solches bildet es mit harten Lewis-Basen (z. B. Amino-, Carboxyl- oder Hydroxyl-Gruppen) oktaedrische Komplexe mit der Koordinationszahl 6. Bei der Handhabung muss seine Ähnlichkeit zum Eisen als am häufigsten vorkommendes und eingesetztes Metall berücksichtigt werden. Das dreiwertige Gallium-Ion ähnelt dem ebenfalls dreiwertigen Eisen-Ion in Ladung und Ionenradius [30].

In der Nuklearmedizin wird das zyklotronproduzierte ^{67}Ga für die SPECT und ^{68}Ga als Generator-Nuklid für die PET genutzt. Weitere relevante Isotope sind ^{69}Ga und ^{71}Ga als NMR-aktive Isotope. Natürliches Gallium setzt sich zu 60 % aus ^{69}Ga und zu 40 % aus ^{71}Ga zusammen.

1.2.2 ^{68}Ge/^{68}Ga-Nuklidgenerator

Das Mutternuklid ^{68}Ge wird über eine (p,xn) Reaktion aus ^{69}Ga oder ^{nat}Ga hergestellt [31, 32]. Das erhaltene ^{68}Ge mit einer Halbwertszeit von 271 d zerfällt unter Elektroneneinfang zum Tochternuklid ^{68}Ga, welches sich mit einer Wahrscheinlichkeit von 89,14 % durch β^+-Emission zum stabilen ^{68}Zn umwandelt. Mit einer Halbwertszeit von 67,6 min zerfällt dabei das ^{68}Ga zu ^{68}Zn:

$$^{68}\text{Ge} \xrightarrow{\text{EC}} {}^{68}\text{Ga} \rightarrow {}^{68}\text{Zn} + \beta^+ + \nu_e + Q$$

Dem Generator liegt mit diesen Halbwertszeiten dementsprechend ein säkulares Gleichgewicht zu Grunde, da die Halbwertszeit des Mutternuklides die des Tochternuklides um mehr als das 1000-fache übersteigt. Nach radiochemischer Abtrennung wird das Germanium auf einer anorganischen (TiO_2 oder SnO_2) oder organischen Matrix fixiert. Unter Verwendung von Salzsäure (0,05 - 0,6 M) kann das ^{68}Ga vom ^{68}Ge/^{68}Ga-Generator eluiert werden. Ein geringer Anteil des Germaniums sowie Verunreinigungen wie ^{68}Zn, Fe^{3+}- oder Trägermaterial-Ionen (Ti^{4+} oder Sn^{4+}) werden mit der salzsauren Lösung coeluiert. Zur Abtrennung dieser Verunreinigungen wird das Eluat auf einem Kationentauscher fixiert (Abbildung 3). Durch Spülen des Kationentauschers mit N1 (80% Aceton/0,15 M HCl) werden unerwünschte Ionen eluiert und nur das ^{68}Ga verbleibt auf dem Tauscher. Anschließend wird mit einer Lösung N2 (97,5% Aceton/0,05 M HCl) das ^{68}Ga vom Kationentauscher eluiert [33].

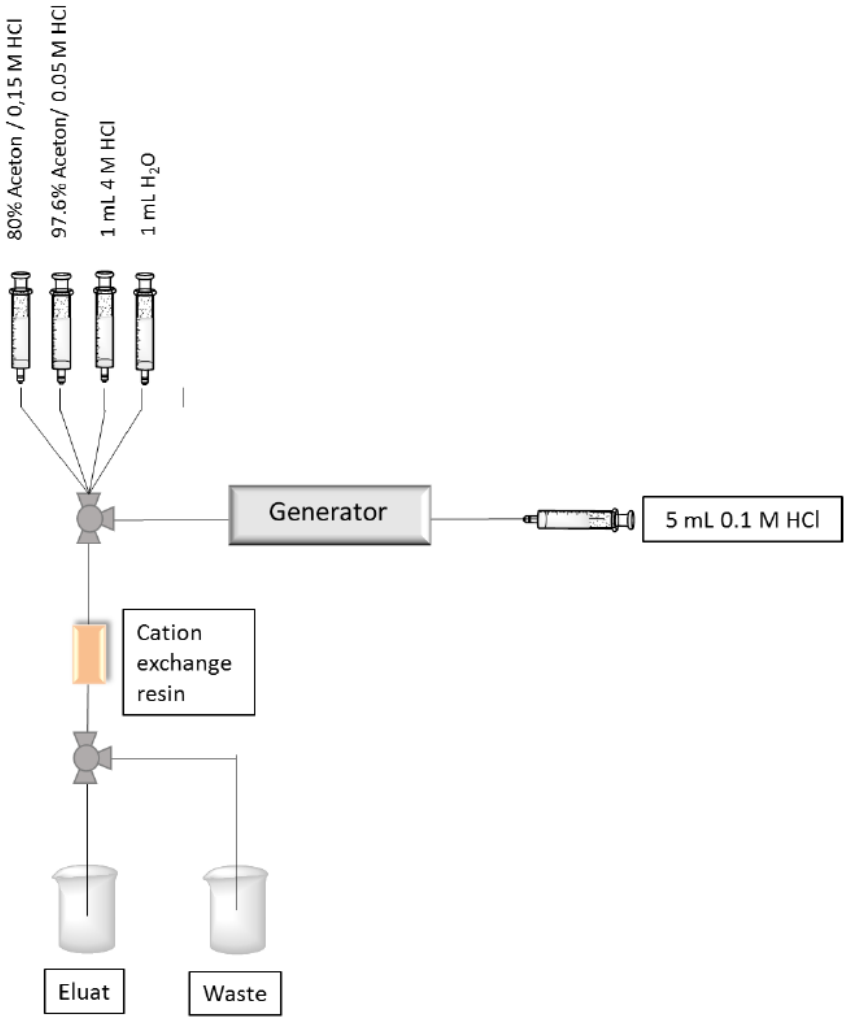


Abbildung 3: Elutionsschema mit kationischer Aufreinigung des Eluates [34]

1.3 Scandium-44

1.3.1 Eigenschaften / wichtige Isotope

Scandium ist wie Gallium eines der seltenen Metalle auf der Erde und zählt zu den Leichtmetallen. Es kommt in hoher Konzentration nur in 5 Mineralen vor: Pretulit ($Sc[PO_4]$), Thortveitit ($Sc_2[Si_2O_7]$), Kolbeckit ($Sc[PO_4]\cdot 2H_2O$), Allendeit ($Sc_4Zr_3O_{12}$) und Heftetjernit ($ScTaO_4$) [29]. Gewonnen wird es hauptsächlich aus dem Thortveitit als Scandiumoxid [35]. In wässrigen Lösungen liegt Scandium als Ion mit der Ordnungszahl +3 vor und verhält sich wie eine harte Lewis-Säure. Als solches bildet es mit harten Lewis-Basen (z. B. Amino-, Carboxyl- oder Hydroxyl-Gruppen) Komplexe mit der Koordinationszahl 6 oder höher.

In der Natur kommt nur Scandium-45 als natürliches Isotop vor, während für die Nuklearmedizin drei andere Isotope von hohem Interesse sind. ^{44}Sc wird als β^+-Emitter für die PET eingesetzt und kann sowohl über den $^{44}Ti/^{44}Sc$-Generator als auch über eine $^{44}Ca(p,n)^{44}Sc$-Kernreaktion an einem Zyklotron produziert werden [36]. Ein weiteres kernchemisch einsetzbares Isotop des Scandiums ist ^{47}Sc [37]. Als reiner β^--Emitter mit einer Halbwertszeit von 3,35 Tagen und einer moderaten β^--Energie von 162 keV eignet es sich prinzipiell für die Radionuklidtherapie. Auf dieselbe Art soll auch ^{46}Sc genutzt werden, welches ebenfalls ein reiner β^--Emitter ist, aber mit einer deutlich längeren Halbwertszeit von 83,79 Tagen eine längere Applikation erfordert. Dementsprechend beinhalten die verschiedenen Scandiumisotope bereits eine Möglichkeit zur theranostischen Anwendung.

Eine weitere Anwendung betrifft nicht direkt ein weiteres Isotop des Scandiums, aber den angeregten Zustand des ^{44}Sc, das ^{44m}Sc. Der metastabile Zustand, in dem sich das ^{44m}Sc befindet, stabilisiert sich zu 99% über einen isomeren Übergang ("isomeric transition" = IT) zum ^{44}Sc. Die Halbwertszeit liegt bei 58,6 Stunden und die ausgesendete Energie ist mit E_{max} 271 keV relativ gering [38]. ^{44m}Sc kann am Zyklotron produziert werden und wird als *in vivo* Generator evaluiert [38, 39]. Die relativ geringe E_{max} und die damit einhergehende geringe Rückstoßenergie bei der Umwandlung zu ^{44}Sc ermöglichen diesem, dabei im Chelator DOTA zu verbleiben.

1.3.1 ^{44}Ti/^{44}Sc-Nuklidgenerator

Die ersten Versuche, einen ^{44}Ti/^{44}Sc-Nuklidgenerator zu bauen, fanden zwischen 1960 und 1970 statt [40–42]. Neuere Veröffentlichungen beschreiben zum ersten mal einen ^{44}Ti/^{44}Sc-Nuklidgenerator zur Herstellung von Radiopharmazeutika [43]. Dieser Generator benutzt eine Anionentauscher-Matrix um das Mutternuklid ^{44}Ti (t ½ 60 Jahre) zu fixieren, welches über eine Kernreaktion aus natürlichem ^{45}Sc über eine ^{45}Sc(p,2n)^{44}Ti-Kernreaktion gewonnen werden kann. Das ^{44}Ti wandelt sich direkt in den Grundzustand des ^{44}Sc durch Elektroneneinfang (EC) um und erzeugt damit keine Nebenprodukte oder angeregte Zwischenprodukte. Der Generator wird mit 20 ml 0,07 M Salzsäure / 0,005M Oxalsäure eluiert (Abbildung 4). Eine Elution des in Mainz befindlichen Generators liefert 175 MBq ^{44}Sc ohne Postprocessing (PP) und 130 MBq ^{44}Sc nach PP mit einem ^{44}Ti-Durchbruch von weniger als 200 Bq, was einen hervorragenden Separationsfaktor von 1 x 10^6 ergibt. Um das Volumen des Eluates zu verkleinern und den ^{44}Ti-Durchbruch als auch andere Metall-Verunreinigungen abzutrennen [44], wird das ^{44}Sc während der Elution auf einem Kationentauscher absorbiert und anschließend mit 3 ml 0,25 M Ammonium-Acetat Puffer (pH 4) eluiert [45]. Durchschnittlich werden bis zu 85% des ^{44}Sc von dem Kationentauscher zurückgewonnen. Der ^{44}Ti-Gehalt der erhaltenen Lösung beinhaltet < 10 Bq.

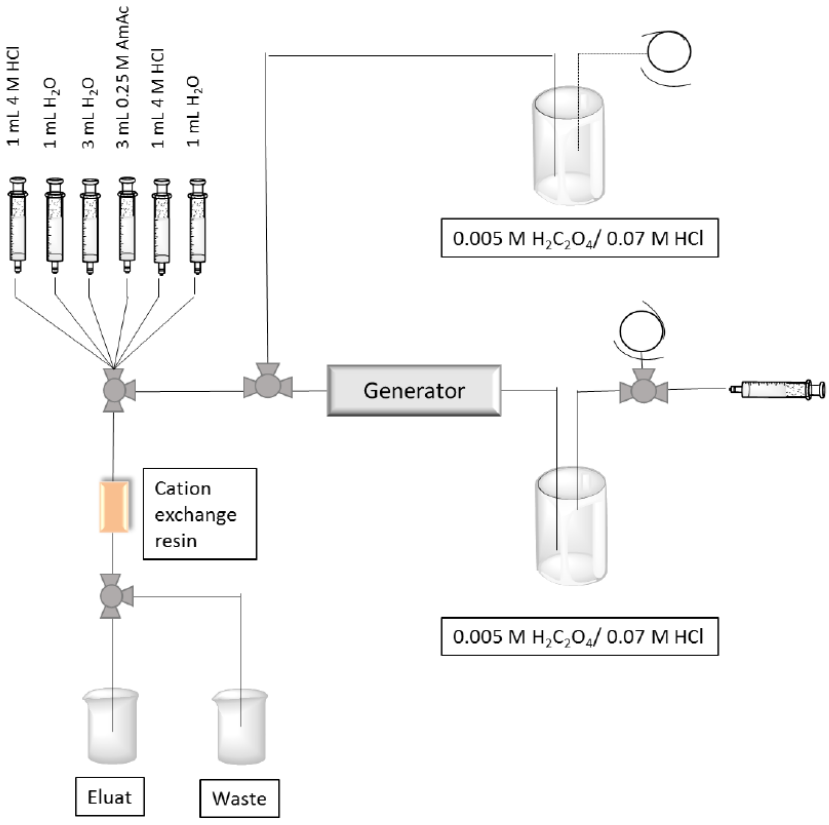


Abbildung 4: Elutionsschema eines ^{44}Ti/^{44}Sc-Nuklidgenerators. [34]

Durch die lange Halbwertszeit des Mutternuklides ^{44}Ti kann ein solcher Generator bei optimalen Durchbruchsraten über mehrere Jahre benutzt werden. Voraussetzung ist hierbei eine gute Pflege des Systems und striktes Einhalten des reversen Elutionsschemas. Wichtig ist die Rückelution des Generators, welche das ^{44}Ti immer wieder neu auf der Säule stabilisiert [43]. Regelmäßige Kontrolle des ^{44}Ti-Durchbruchs gewährleistet, dass Probleme an der Säule erkannt und behoben werden können. Da die Hauptsäule und die darin enthaltene Matrix konstant einer relativ hohen Strahlenbelastung ausgesetzt ist, kann erwartet werden, dass diese nach mehreren Jahren Benutzung degradiert und einen höheren ^{44}Ti-Durchbruch zulässt. Ist dies der Fall muss das komplette System neu aufgebaut werden.

1.4 Radionuklide für die Therapie

Für die Radionuklidtherapie (auch Endoradiotherapie genannt) werden bis auf einige Ausnahmen ($^{89}Sr^{2+}$ oder $^{223}Ra^{2+}$ welche direkt injiziert werden) Radiopharmaka appliziert, welche mit einem Therapienuklid markiert sind. Nuklide für die Therapie emittieren im Gegensatz zu den diagnostischen Nukliden deutlich stärker gewebeschädigende Strahlungsarten. Unterschieden werden hier die "diagnostische" Strahlung, γ-Emission und β^+-Emission, von der für die Therapie verwendeten β^-- und α-Strahlung, welche das umliegende Gewebe ionisiert und dadurch zerstört. Die β^-- und α-Strahlung hat eine geringere Reichweite, wobei α-Strahlung noch deutlich weniger Strecke zurücklegen kann, bevor es zur Wechselwirkung mit dem Gewebe kommt. Dies ist besonders wichtig um zu gewährleisten, dass nur das Targetgewebe zerstört wird und umliegendes gesundes Gewebe möglichst unversehrt bleibt. Der erwünschte Effekt ist Ionisierung von Wasser zu Radikalen und ein daraus folgender DNA-Doppel-Strangbruch, welcher für die Zelle irreparabel ist und zum Zelltod führt [46, 47].

Heutzutage bereits klinisch angewendete Therapienuklide sind ^{90}Y und ^{177}Lu, welche beide β^--Strahler sind. Mit einer Halbwertszeit von 64,1 Stunden und 6,7 Tagen, respektive, können durch Applikation in den Patienten Tumore über mehrere Tage hinweg zerstört werden. Angewendet werden beide beispielweise gebunden an DOTA-TOC/NOC für neuroendokrine Tumore oder an PSMA-617 für Prostatakrebs [48–50]. Neben ^{213}Bi und ^{223}Ra ist das ^{225}Ac einer bisher der im Menschen getesteten α-Strahler. ^{225}Ac setzt mit einer Halbwertszeit von 10 Tagen und diversen Töchtern in einer längeren Zerfallsreihe sowohl α- als auch β^--Strahlung frei [14].

1.4.1 Lutetium-177

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ^{177}Lu als eines der am häufigsten verwendeten Therapienuklide verwendet. Mit seiner Halbwertszeit von 6,7 Tagen und einer maximalen β^--Energie von nur 497 keV eignet es sich für die Radionuklidtherapie [51]. Eine klassische Methode zur Herstellung des ^{177}Lu nutzt die Kernreaktion ^{176}Lu (n,γ)^{177}Lu, wobei natürliches Lu_2O_3 (2,6 % ^{176}Lu) oder angereichertes Lu_2O_3 (60,6 % ^{176}Lu) mit thermischen Neutronen beschossen wird. Als Nebenprodukt tritt hierbei das ^{177m}Lu mit einer Halbwertszeit von 160 Tagen auf. Der Anteil von < 0,5 % ist gering, muss aber dennoch in der Dosimetrie berücksichtigt werden. Weiterhin ist das erhaltene ^{177}Lu geträgert mit natürlichem ^{175}Lu bzw. ^{176}Lu, was für die Markierung berücksichtigt werden muss, da auch die natürlichen Isotope komplexiert werden.

Eine neuere Variante, die Herstellung von ^{177}Lu aus ^{176}Yb über eine ^{176}Yb(n,γ,b)^{177}Lu-Kernreaktion, liefert das Produkt nach Abtrennung von dem ^{176}Yb trägerfrei ohne den Zusatz von natürlichem Lutetium. Hierbei wird durch den Beschuss eines ^{176}Yb-Targets mit thermischen Neutronen ^{177}Yb gebildet, welches mit einer relativ kurzen Halbwertszeit von 1,9 Stunden durch β^--Umwandlung in das ^{177}Lu umwandelt. ^{177}Lu kann anschließend abgetrennt werden. Im Jahr 2000 wurde eine Methode zur Abtrennung vorgestellt, welche das radioaktive ^{177}Lu von dem kalten ^{176}Yb und den Resten an intermediärem ^{177}Yb trennt [52]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde n.c.a. ^{177}Lu von ItG verwendet, welches über diesen Produktionsweg gewonnen wird.

Lutetium liegt in Lösung als dreiwertiges Ion vor und unterstützt Koordinationszahlen zwischen 6 und 12. Klinisch wird ^{177}Lu vorwiegend mit dem Chelator DOTA eingesetzt, welcher durch 8 Ligationsatome das ^{177}Lu-Ion in einer quadratisch-antiprismatischen Koordinationsgeometrie bindet [53]. Sobald der DOTA-Chelator an einen Target-Vektor gebunden ist, kann er nur noch 7 Ligationsatome stellen, wodurch eine Bindungsstelle in der Koordinationsgeometrie mit Wasser besetzt wird.

1.5 Chalatoren für dreiwertige Metalle

1.5.1 Komplexchemie

Ein Komplex besteht aus einem Koordinationszentrum, häufig einem Metall-Ion, und der Ligandenhülle. In der Nuklearmedizin werden Komplexe verwendet, um radioaktive Isotope von Metallen, welche nicht durch kovalente Bindung an Targetvektoren gebunden werden können, durch ionische Bindungen mit dem Targetvektor zu verknüpfen. Da ionische Bindungen generell deutlich instabiler sind als kovalente Bindungen, müssen Chelatoren verwendet werden, um stabile Komplexe zu bilden und das Metall damit fest zu binden. Hierbei wird der Chelateffekt genutzt, durch welchen die Komplexbildungskonstante und die Stabilitätskonstante umso höher sind, je mehr Bindungsstellen ein Ligandatom zur Verfügung stellt [54]. Wichtig hierfür ist entsprechend, wie viele Koordinationsstellen das Metall-Ion hat. Für ^{68}Ga sind es 6 Koordinationsstellen und für ^{177}Lu bis zu 12. Weiterhin muss beachtet werden, in welcher Koordinationsgeometrie die Koordinationsstellen vorliegen. Ein Chelator mit passender Anzahl an Koordiantionsstellen muss zudem dynamisch genug sein, um die vom Metall geforderte Koordinationsgeometrie zu erreichen.

Die Komplexbildungskonstante, welche die Lege des Gleichgewichtes während einer Radiomarkierung beschreibt, hängt von verschiedenen Faktoren ab. Allgemein wird diese mit der thermodynamischen Stabilitätskonstante K_{MeL} gleichgesetzt, welche sich nach $K_{MeL} = \frac{c_{MeL}}{c_{Me} \cdot c_L}$ berechnet. Je größer die Komplexbildungskonstante ist, desto stabiler ist der Komplex. Multidentate Liganden besitzen generell deutlich höhere Komplexbildungskonstanten und sind damit deutlich stabiler [54]. Ein weiterer Faktor ist der pH-Wert, da alle Donoratome eines Chelators passend protoniert oder deprotoniert vorliegen müssen. Häufig werden Carboxylgruppen, welche zur Komplexbildung deprotoniert sein müssen, oder Amine, welche nicht protoniert vorliegen dürfen, verwendet. Weiterhin können auch die Metalle selbst bei bestimmten pH-Werten starke Hydrathüllen ausbilden oder sogar ausfallen, wodurch die Wahl des pH-Wertes die Geschwindigkeit einer Komplexierung stark beeinflusst. Neben der thermodynamischen Stabilität muss auch die kinetische Stabilität berücksichtigt werden. Die kinetische Stabilität beschreibt den Liganden-Austausch, wodurch ein Komplex mit niedriger thermodynamischer Stabilität dennoch kinetisch stabil in einem Medium sein kann, da er nur sehr langsam seine Liganden mit den im Medium vorliegenden anderen Liganden austauscht [54, 55]. Ein solcher Zustand wird als Metastabil beschrieben. Zu beachten ist, dass sowohl die thermodynamische als auch die kinetische Stabilität mediumbezogen sind [55].

1.5.2 Bifunktionelle Chelatoren

Die in der Nuklearmedizin verwendeten Chelatoren werden in zwei Klassen unterteilt: (makro)-zyklische und azyklische Chelatoren. Unabhängig davon kann man Chelatoren auch unterteilen in reine Chelatoren und deren funktionalisierte Varianten, also bifunktionelle Chelatoren (BFC). Hierbei wird am Rückgrat des Chelators eine weitere funktionelle Gruppe eingeführt, welche die Kopplung eines Targetvektors ermöglicht. Eine andere Möglichkeit ist die unsymmetrische Schützung von einer der Ligationsfunktionalitäten, wodurch diese selektiv entschützt und zur Kopplung eines Targetvektors benutzt werden kann. Für letztere Variante muss der Chelator trotz Verlust einer der Ligationsfunktionalitäten noch in der Lage sein, einen stabilen Komplex mit dem Radiometall auszubilden. Häufig wird zwischen dem Chelator und der Bifunkionalität noch ein Spacer eingefügt, welcher einen Abstand zwischen Targetvektor und Chelator erzeugt, um ungewollte Wechselwirkungen zu vermeiden (Abbildung 5).

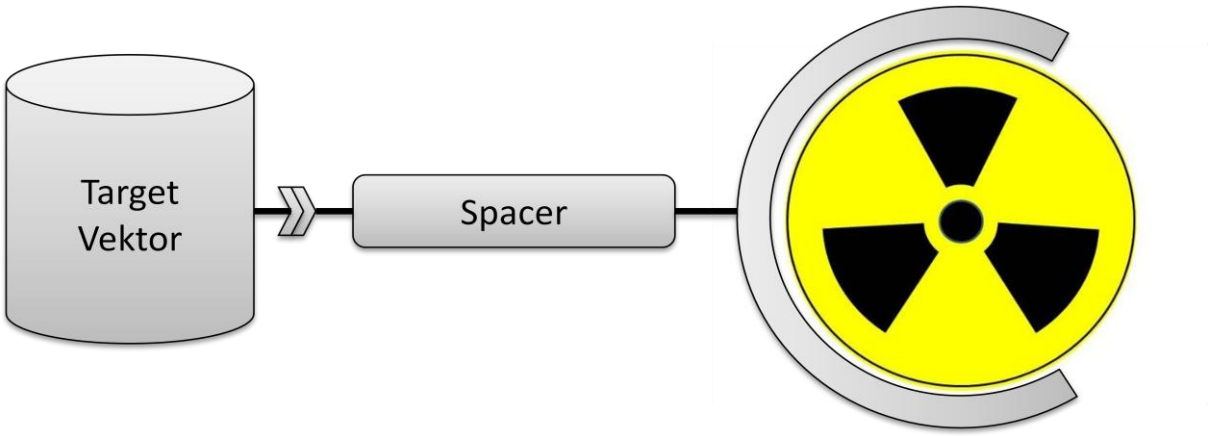


Abbildung 5: Modell eines bifunktionellen Chelators gebunden an einen Targetvektor über einen Spacer

1.5.3 Azyclische Chelatoren

Einer der ersten und am häufigsten verwendeten azyclischen Chelatoren für dreiwertige Radiometalle ist das DTPA (Diethylentriaminpentaacetat; Abbildung 6). Mit seinem N_3O_5-Ligandenfeld ermöglicht dieser Chelator die Radiomarkierung von ^{68}Ga, ^{90}Y, ^{111}In oder ^{177}Lu [10, 56]. Eine kürzere Variante ist das EDTA, welches mit seinem N_2O_4-Ligandenfeld ebenfalls die Radiomarkierung dreiwertiger Radiometalle ermöglicht, aber vorwiegend für kleinere Nuklide wie

68Ga und 44Sc geeignet ist. Bifunktionelle Varianten, wie das p-SCN-Bz-DTPA (Abbildung 6), ermöglichen die Anbindung eines TV ohne Verlust einer Säurefunktion für die Komplexierung.

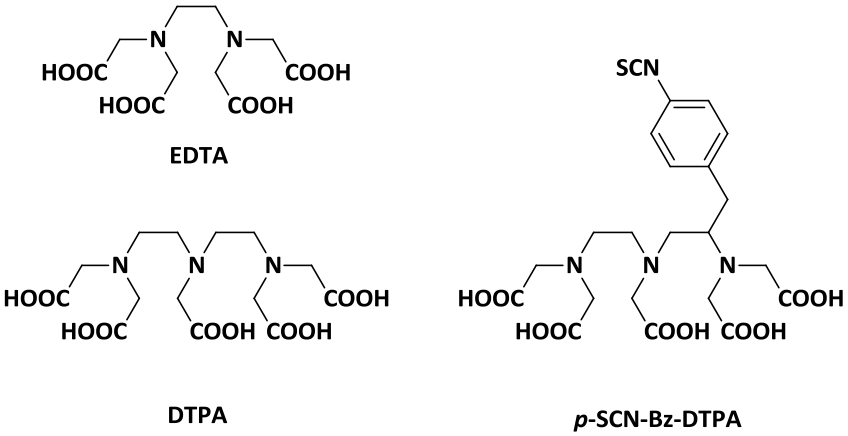


Abbildung 6: Struktur des freien EDTA, DTPA und dem bifunktionellen *p*-SCN-Bz-DTPA

Heutzutage finden EDTA und DTPA hauptsächlich Anwendung in der Co-Injektion ihrer nicht bifunktionellen Form, um freie Radiometallionen in nicht-quantitativen Markierungen zu komplexieren. Für ^{68}Ga wurden in den vergangen Jahren verschiedenen azyklische Chelatoren veröffentlicht: Allen voran wurde 1992 das HBED-CC [57] für milde Radiomarkierungen mit ^{67}Ga und ^{111}In beschrieben und auch neuere Veröffentlichen benutzen diesen Chelator für ^{68}Ga [58, 59]. Neuere Chelatoren sind das H_2dedpa [60, 61] und Trihydropyridon Derivate (CP256, YM103) [62] als milde Chelatoren für ^{68}Ga (Abbildung 7).

Ein weiterer häufig eingesetzter azyclischer Chelator ist das Desferrioxamin für die Radiomarkierung von ^{89}Zr [26, 63]. Durch seine harten Hydroxamat-Gruppen eignet er sich perfekt für ^{89}Zr, weist aber trotzdem keine optimale Stabilität auf, da er über zu wenig Bindungsstellen verfügt. Eine neuere Variante ist das Desferrioxamin*, welches durch eine einfache Kettenverlängerung um eine weitere Hydroxamat-Einheit deutlich höhere Stabilitäten aufweist [64].

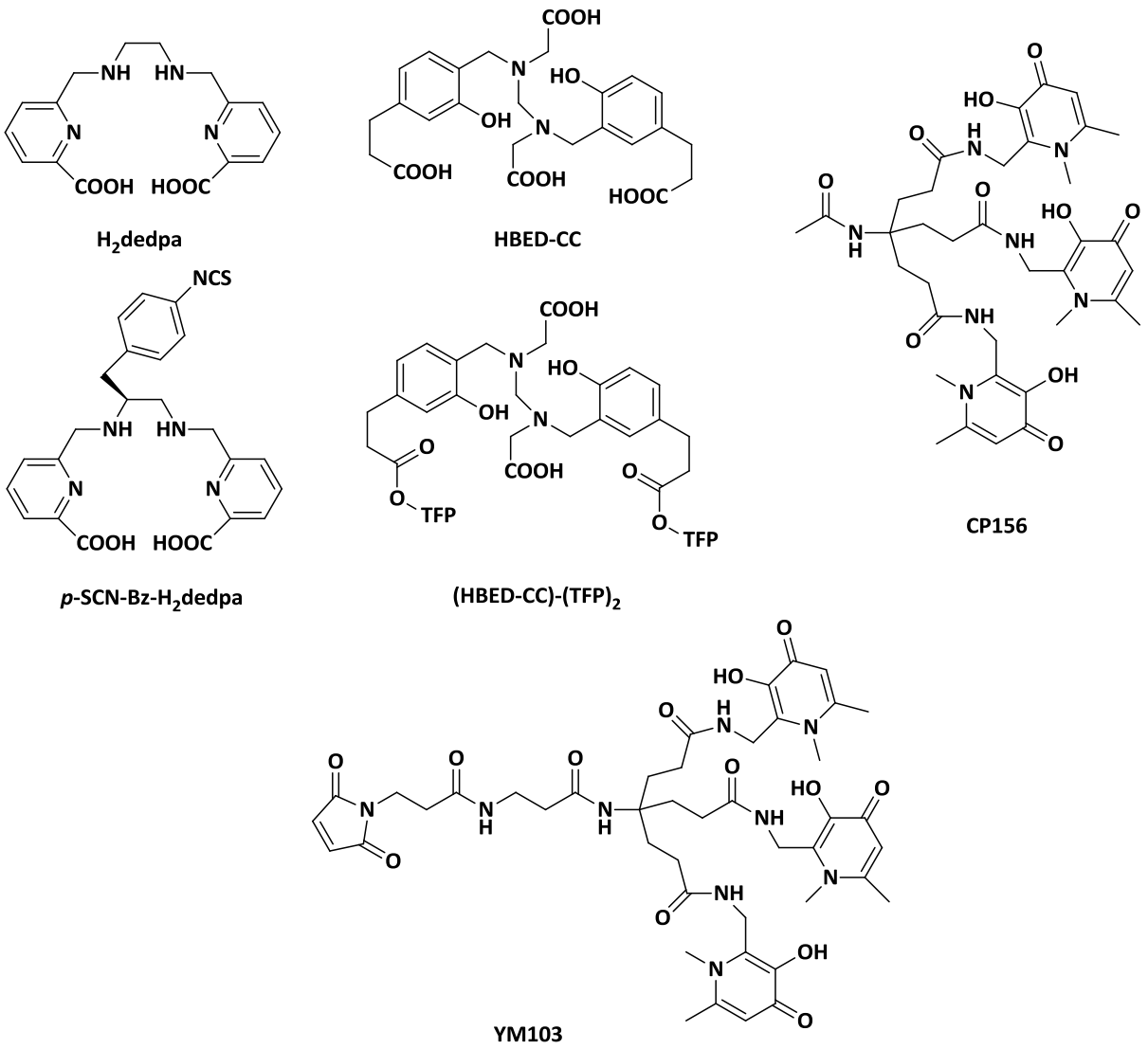


Abbildung 7: Struktur der freien Chelatoren H_2dedpa, HBED-CC und THP (CP156) und einer ihrer bifunktionellen Varianten

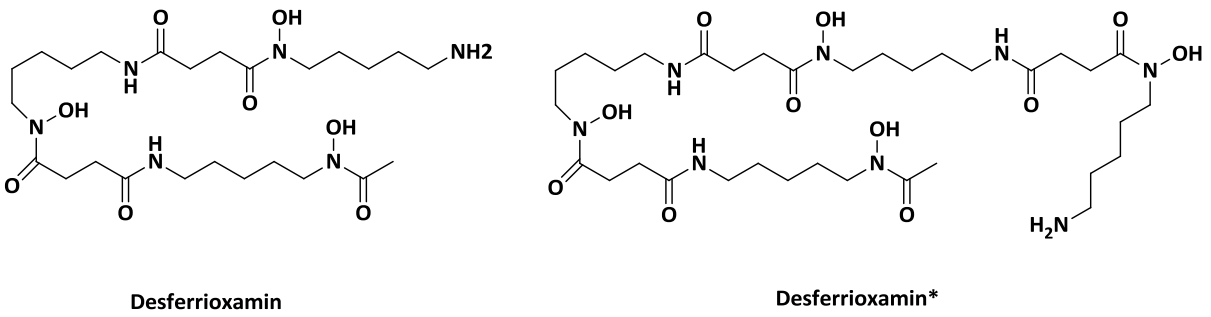


Abbildung 8: Struktur des Desferrioxamin und Desferrioxamin*

1.5.4 Makrozyclische Chelatoren

Der wichtigste makrozyclische Chelator für dreiwertige Radiometalle ist das DOTA (1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure, Abbildung 9). DOTA bietet durch sein N_4O_4-Komplexierungsgerüst eine ausreichende Anzahl an Ligandatomen zur Komplexierung verschiedenster Radionuklide wie ^{68}Ga, $^{44/47}$Sc oder ^{177}Lu [10, 28, 44, 65–68]. Bei der am weitesten verbreiteten bifunktionellen Variante des DOTA wird eine der vier Säureeinheiten für die Kopplung am Biomolekül verwendet, wobei diese Acetatgruppe nicht mehr für die Komplexierung zur Verfügung steht (Abbildung 9). Zur Anwendung mit Therapienukliden mit hohen Ordnungszahlen, wie mit ^{225}Ac, werden vorzugsweise *p*-SCN-Bz-DOTA gekoppelte Derivate eingesetzt, da diese über eine Seitenkette bifunktionalisiert werden und somit über das volle N_4O_4-Komplexierungsgerüst verfügen [69].

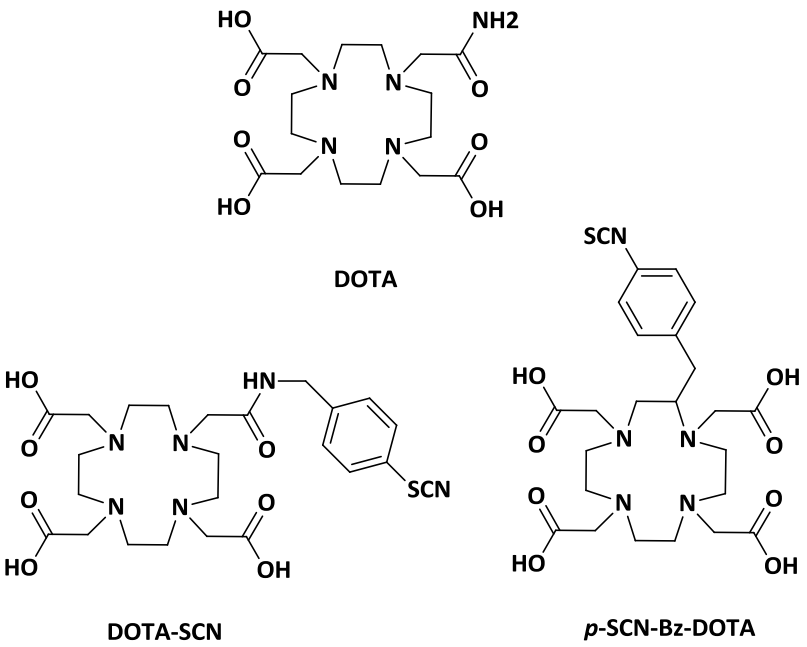


Abbildung 9: Struktur des DOTA und seiner bifunktionellen Varianten DOTA-SCN und *p*-SCN-Bz-DOTA

Die etwas kleinere Triaza-Variante, das NOTA, findet deutlich weniger Anwendung durch ihre Beschränkung auf kleinere Nuklide wie ^{68}Ga. NOTA zeigt mit seinem N_3O_3-Komplexierungsgerüst hervorragende Markierungseigenschaften mit ^{64}Cu und ^{68}Ga [70, 71]. Eine direkte Bifunktionalisierung über eine der Acetatgruppen ist nicht möglich, da sonst die Markierungseigenschaften verloren gehen. Zwei Möglichkeiten zur Bifunktionalisierung (Abbildung 10) findet man analog zum *p*-SCN-Bz-DOTA in *p*-SCN-Bz-NOTA, wobei das Rückgrat des NOTA

funktionalisiert wird [72], und im NODAGA-NHS, wo eine der Acetatgruppen gegen Glutaminsäure ausgetauscht wird [73]. Eine vielversprechende Variante des NOTA ist TRAP (1,4,7-triazacyclononan-1,4,7-tris[methyl(2-carboxyethyl)phosphinsäure], Abbildung 10). Dieser Chelator weist eine hohe Spezfität gegenüber ^{68}Ga auf und eignet sich besonders für multivalente Ansätze zur Synthese von Trimeren [74, 75].

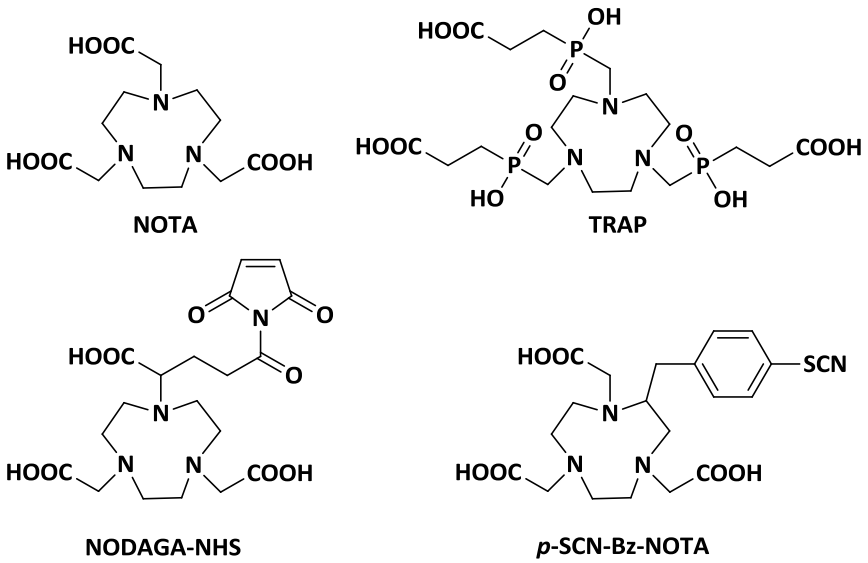


Abbildung 10: Struktur des NOTA und seiner bifunktionellen Varianten *p*-SCN-Bz-NOTA und NODAGA-NHS und des multivalenten TRAP

1.5.5 Hybridische Chelatoren

Als hybridische oder chimäre Chelatoren bezeichnet man Chelatoren, welche aus (makro)-cyclischen und azyclischen Untereinheiten bestehen. Sie verbinden damit die Vor- und Nachteile beider Chelator-Kategorien. Allgemein gelten acyclische Chelatoren für die Radiomarkierung als besonders schnell in ihrer Kinetik und sind temperaturunabhängig, wodurch diese bereits bei niedrigen Temperaturen quantitative Markierungsausbeuten aufweisen können. Negative Eigenschaften sind häufig die geringe kinetische Stabilität, wie beispielweise beim EDTA oder DTPA beobachtet werden konnte. Dem entgegen stehen die macrocyclischen Chelatoren, welche besonders stabil sind (siehe DOTA), aber höhere Markierungstemperaturen (>80 °C) benötigen und langsamere Kinetiken ausweisen. Die hybridischen Chelatoren sollen nun die positiven Eigenschaften in sich vereinen: schnelle Markierungskinetiken bei Raumtemperatur und eine hohe kinetische Stabilität.

Der neuste und erste hybridische Chelator zur Markierung von ^{68}Ga ist das DATA^{m}/DATA^{5m} (Abbildung 11) [76–78]. Es komplexiert mit den selben Bindungsatomen wie das NODAGA (Tabelle 2),

wobei aber eines der Amine exocyclisch sitzt und auch eine der Carboxylgruppen an dem Amin angebracht ist. Entsprechend ist der entstehende Komplex mit Gallium, wie beim NODAGA, ungeladen. Die Stabilität ist nicht so hoch wie beim NODAGA, wie auch zu erwarten durch den jetzt azyclischen Anteil, aber immer noch in einem guten Rahmen für eine mögliche *in vivo*-Anwendung. Dafür ist die Markierung bei Raumtemperatur deutlich schneller als beim NODAGA und kann mit geringeren Precursormengen durchgeführt werden. Andere Chelatoren für ^{68}Ga sind schwer zu vergleichen (Tabelle 2), da TRAP primär für multivalente Anwendungen geeignet ist und HBED bzw. H_2dedpa über einen geladenen Komplex mit Gallium verfügen. Nur THP zeigt ähnlich gute Markierungseigenschaften, wobei hier aber auch noch nicht geklärt ist, was die mesomer entstehende Ladung auf den Armen für einen Einfluss auf die *in vivo* Verteilung hat [79].

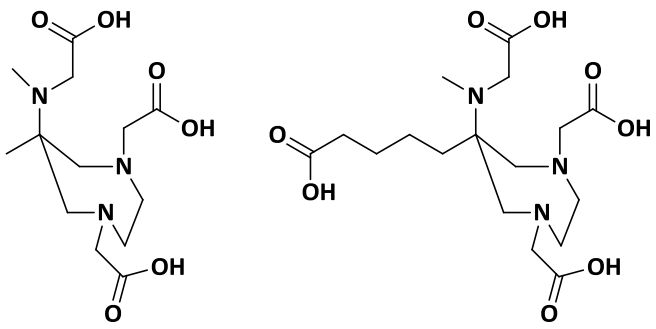


Abbildung 11: Struktur des DATA^m und der bifunktionellen Variante DATA^{5m}

Tabelle 2: Übersicht aktuelle "milde" Gallium-Chelatoren, Bindungsatome: N = Amin, O = Carboxyl, PO = Phosphat, PhO = Phenol. [10, 79]

	Aufbau			**Markierung**		**Stabilität**
	Valenz	Bindungsatome	Ladung	T *	pH	log K_{ML}
NODAGA	6	N_3 O_3	0	RT/80-95°C	3-5,5	31
TRAP	6	N_3 $(PO)_3$	0	RT/80-95°C	1-5	26
HBED	6	N_2 O_2 $(PhO)_2$	-1	RT/80-95°C	4-4,5	39,6
H_2dedpa	6	N_4 O_2	+1	RT/80-95°C	4,5	28
THP	6	O_6	0	RT	3,5-6,5	-
DATA^{5m}	6	N_3 O_3	0	RT	4-6	22

* Temperaturangaben sind stark von der Precursormenge abhängig. Alle Chelatoren sind bei hohen Einwaagen mild markierbar. Diese Angabe repräsentiert die in der Literatur vorwiegend verwendete Temperatur; genaue Daten unter [79].

1.6 Targetvektoren

Als Targetvektoren, kurz TV, werden biologisch aktive Moleküle bezeichnet, welche radioaktiv markiert appliziert werden können, um an physiologischen Prozessen im menschlichen Körper teilzunehmen. Es kann sich hierbei um "small molecules" wie PSMA-617 oder Bisphosphonate, kleinere Peptide oder cyclische Peptide wie TOC und auch größere Moleküle wie Antikörper handeln. In dieser Arbeit wurden primär zwei TV verwendet: Das TOC als Somatostatin-Analogon, welches neuroendokrine Tumore adressiert, und das PSMA-617, welches nach seinem *in vivo*-Target benannt wurde, dem prostataspezifischen Membranantigen. Ein weiterer in zwei Teilprojekten verwendeter TV ist das Bisphosphonat, welches als $DOTA^{ZOL}$ (Anwendung für Knochenmetastasen) und als TCO (*in vivo*-Click-Vorläufer für Knochenmetastasen) zum Einsatz kommt.

1.6.1 Somatostatin

Die erste Isolation des Somatostatin gelang im Jahr 1972 aus Hypothalamus-Fragmenten von Schafen. Nach der Abtrennung wurde 1973 die Strukturaufklärung des Polypeptids veröffentlicht und der Name Somatostatin (SST, SST-28) vergeben [80, 81]. Hierbei handelt es sich um einen Antagonisten des Wachstumshormons Somatropin. Die Targetrezeptor-Struktur wurde im Jahr 1992 aufgeklärt mit der Bestimmung von fünf membrangebundenen, G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ($sstr_{1\text{-}5}$), welche hauptsächlich für die Bindung verantwortlich sind [82, 83]. Für die Entwicklung von Radiopharmaka bzw. von Pharmaka allgemein, stellte sich das reine SST-28 als ungeeignet heraus, da es eine geringe Blutzirkulationszeit und schnellen enzymatischen Abbau zeigte. Um dieses zu umgehen wurden kleinere und stabilere Derivate entwickelt. Eine Subgruppe dieser Derivate stellen die Octreotide dar, welche eine hohe Affinität gegenüber den Rezeptoren ausweisen und mit einer hohen *in vivo*-Stabilität dem enzymatischen Abbau und dem schnellen Auswaschen über die Nieren widerstehen [82]. Das auch in dieser Arbeit verwendete SMS201-995 Octreotid (kurz TOC oder [$DPhe^1$][Tyr^3]-Octreotid; Abbildung 12) zeigte unter anderem eine hohe Affinität zu den Rezeptoren 2, 3 und 5 ($sstr_{135}$) und eine deutlich höhere biologische Halbwertszeit im Verhältnis zu SST-28 [84]. Weitere häufig verwendete Octreotide neben dem TOC sind das TATE und NOC (Abbildung 12). Erste Evaluierungen als Radiopharmakon erfolgten im Jahr 2000, als DOTA-TOC mit ^{68}Ga für die PET auf seine *in vitro*-Affinität und sein *in vivo*-Verhalten hin untersucht wurde [85]. Erstes für die Nuklearmedizin zugelassenes Octreotid war das [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC im Jahr 2014, welches für die

diagnostische Anwendung mittels PET zugelassen wurde [86]. 2017 folgten die für die Diagnostik und Therapie zugelassenen Radiopharmaka [^{68}Ga]Ga-DOTA-TATE (NETSPOT®) und [^{177}Lu]Lu-DOTA-TATE (LUTATHERA®) von AAA®.

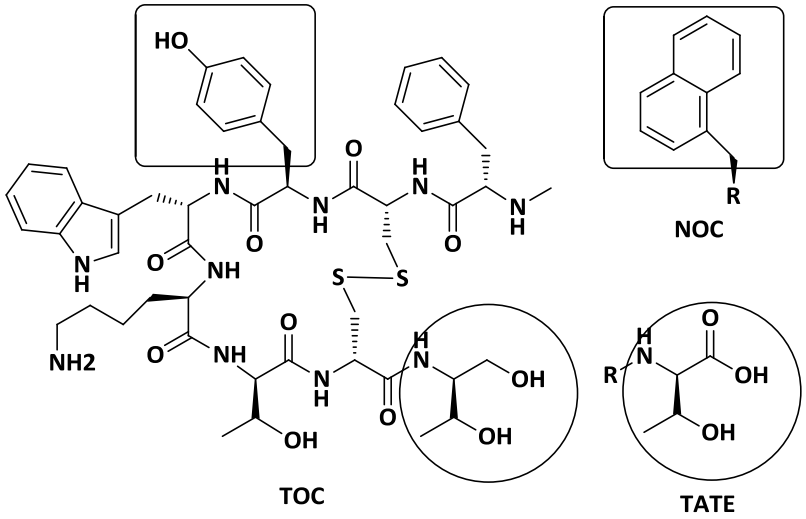


Abbildung 12: Struktur der Octreotide: TOC (Primärstruktur ohne Variation), TATE (Kreis-Variation; Endständige Carboxylgruppe) und NOC (Viereck-Variation; Austausch des Phenols gegen ein Naphthalin)

Für alle Octreotide ist zu beachten, dass sie nicht wie das SST-28 zu allen humanen Somatostatin-Rezeptoren 1 bis 5 ($hsst_{1-5}$) eine hohe Affinität aufweisen. Zu dem auf neuroendokrinen Tumoren primär überexprimierte $hsst_2$ weisen alle Octreotide eine hohe Affinität auf, aber auch hier ist die Affinität geringer als die des SST-28 und die Derivate mit DOTA zeigen eine nochmals verringerte Affinität [85]. Hier treten besonders die Derivate des TATE in den Vordergrund, da diese die beste Affinität zu $hsst_2$ aufweisen.

1.6.2 PSMA

Das Prostata-Spezifisches-Membran-Antigen (PSMA) ist ein membrangebundenes Glycoprotein, welches in der Nuklearmedizin als Target für Prostatakrebs eingesetzt wird. Seine Aufgabe im Körper ist die Spaltung des C-terminalen Glutamats von *N*-Acetyl-aspartyl-glutamat (NAAG) und Folsäure-(poly)-γ-glutamat [87]. PSMA wird nur von Prostata-Krebszellen in hoher Dichte überexpremiert.

Damit bietet das PSMA als Target beste Voraussetzungen für ein gutes Tumor zu Hintergrund-Verhältnis bei Visualisierung seines Stoffwechsels. Weiterhin besteht ein direkter Zusammenhang zwischen dem PSMA-Level (PSMA-Konzentration *in vivo*) und dem Krankheitsstadium [88, 89].

Die aktive Bindungstasche des PSMA besteht aus zwei Untereinheiten. In der inneren Tasche befinden sich zwei Zn^{2+}-Ionen und mehrere Arginin/Asparagin-Bindungsstellen, während die zweite äußere Bindungstasche eine hohe Affinität zu aromatischen Strukturen ausweist [90]. Eine der stärksten PSMA-Inhibitoren ist die 2-(Phosphonomethyl)-glutarsäure (2-(Phosphonomethyl)-pentanedioic acid; 2-PMPA). 2-PMPA (Abbildung 12) besitzt eine Glutamat-Einheit zur Bindung, welche mit einer Phosphat-Gruppe gekoppelt ist, wodurch eine enzymatische Spaltung verhindert wird. Damit bindet das 2-PMPA an das PSMA und blockt die Bindungstasche, da keine Abspaltung oder enzymatische Spaltung der Glutamat-Bindung möglich ist.

Eine andere Gruppe von PSMA-Inhibitoren, auf Basis einer Urea-Einheit (Abbildung 13), hat in den vergangenen Jahren großes klinisches Interesse geweckt [91]. Für die Anwendung in der Radiopharmazie wurde die Urea-Einheit an den Chelator HBED gekoppelt und so das PSMA-11 und dessen Dimer das PSMA-10 synthetisiert [92, 93]. Da der Chelator keine optimale Stabilität mit ^{68}Ga zeigt und keine Möglichkeit zur Therapie erlaubt, wurde versucht das Bindungmotiv auf den am weitesten verbreiteten Chelator DOTA zu übertragen. Hierbei wurde festgestellt, dass aromatische Einheiten des Chelators HBED an der Bindung des PSMA-11 beteiligt sind. Es konnte das PSMA-617 synthetisiert werden, welches durch einen 2-Naphthyl-L-Alanin-Linker zwischen Chelator und Urea-Einheit eine Bindung zur aromatischen Tasche des PSMA ausbilden kann [28]. Das PSMA-617 ist mit der großen Zahl an Prostatakrebs-Erkrankungen [94] in kürzester Zeit einer der am weitesten verbreiteten Radiotracer für die PET geworden. Aktuell wird das PSMA-617 von ABX® in klinischen Studien der Stufe 3 evaluiert.

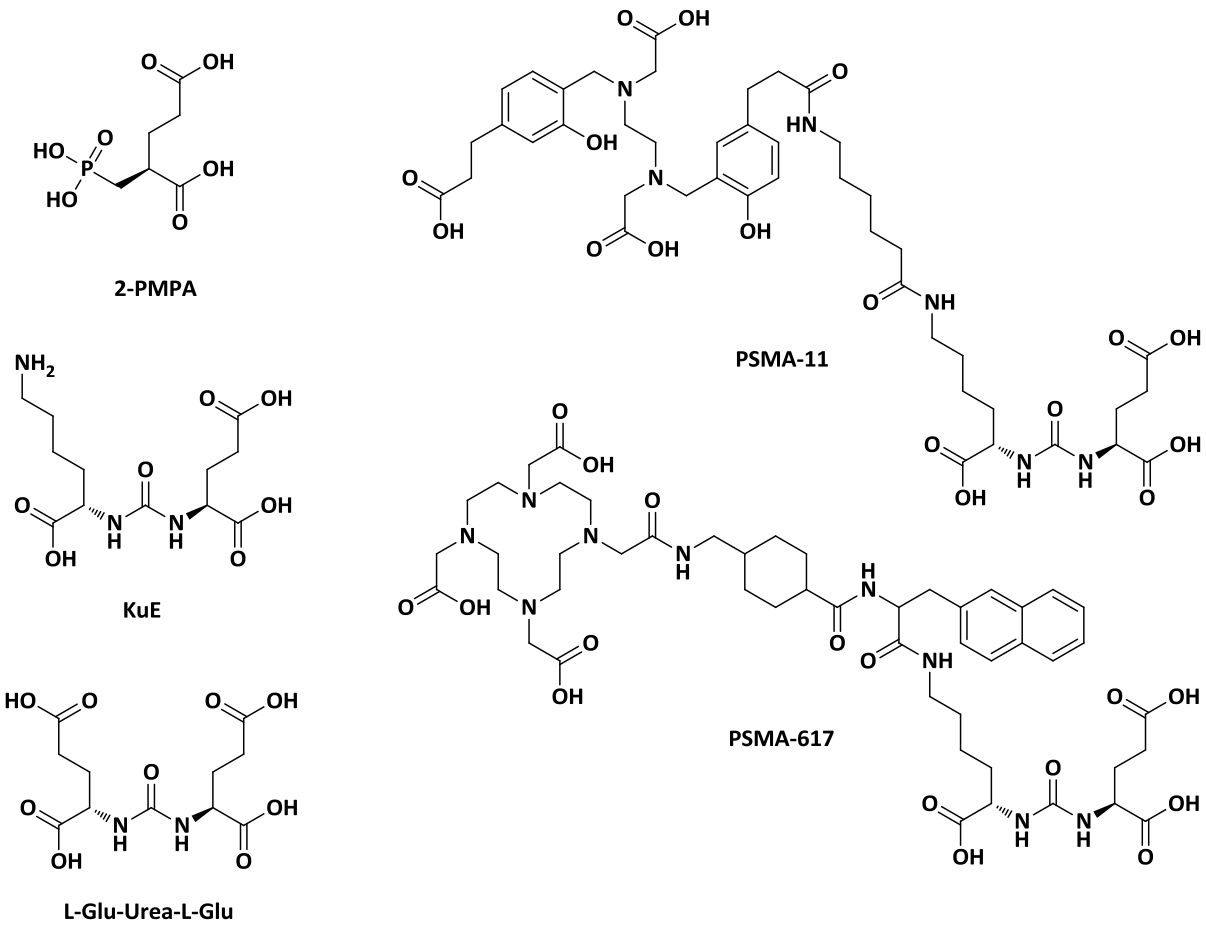


Abbildung 13: Wichtige PSMA-Strukturen: PSMA-Inhibitor 2-PMPA links oben, KuE-Bindungsmotiv für PSMA-10/11 links Mitte, L-Glu-Urea-L-Glu-Bindungsmotiv für PSMA-617 links unten; Radiotracer PSMA-11 (rechts oben) und PSMA-617 (rechts unten)

2.0 Problemstellung und Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit unterteilt sich in drei Hauptabschnitte, welche die Radiomarkierung von verschiedenen Chelatoren und deren Derivaten mit ^{68}Ga, ^{44}Sc, ^{18}F, ^{177}Lu und ^{225}Ac umfasst. In den ersten beiden Hauptabschnitten wurden die bifunktionellen Chelatoren DATA^{5m} und AAZTA^{5} und ihre TOC- bzw. PSMA-Konjugate radiochemisch sowie *in vitro* und *in vivo* evaluiert. Der dritte Hauptabschitt umfasst kleinere Projekte, welche sich mit dem Mainzer ^{44}Ti/^{44}Sc-Generator, [^{18}F]AlF^{2+}-Markierungen, *in vivo*-Click-Versuchen und Tierversuchen mit ^{225}Ac befassen.

Hauptabschnitt 1: DATA^{5m}

In vitro- und in vivo-Evaluation des DATA^{5m}-TOC mit ^{68}Ga und erste klinische Studien

In diesem Abschnitt wird das [$^{68/nat}$Ga]Ga-DATA^{5m}-TOC auf seine Affinität zum humanen Somatostatinrezeptor 2, 3 und 5 (hsstr$_{235}$) in direktem Vergleich zum [$^{68/nat}$Ga]Ga-DOTA-TOC untersucht. Aufbauend auf den *in vitro*-Ergebnissen wurde das [^{68}Ga]Ga-DATA^{5m}-TOC innerhalb von *in vivo*-Studien mit tumortragenden und gesunden Mäusen auf seine Bioverteilung und *in vivo*-Stabilität hin untersucht. In einer ersten Humanapplikation konnte weiterhin ein direkter Vergleich zwischen [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC und [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC erzielt werden, welcher in weiterführenden Patientenstudien bestätigt wurde.

Hauptabschnitt 2: AAZTA^{5}

Radiochemische Evaluation des AAZTA^{5} und seiner Derivate: AAZTA^{5}-TOC und AAZTA^{5}-PSMA mit ^{68}Ga, ^{44}Sc und ^{177}Lu; in vitro-Affinitäts- und Internalisierungsstudien der ^{68}Ga-, ^{44}Sc- und ^{177}Lu-Komplexe des AAZTA^{5}-PSMA

Um die radiochemischen Möglichkeiten des AATZA-Chelators zu evaluieren, wurde das AAZTA^{5} mit einer zum DATA^{5m} analogen Bifunktionaliät synthetisiert, mit ^{68}Ga, ^{44}Sc und ^{177}Lu in Markierungsstudien untersucht und auf seine Komplexstabilität mit allen drei Nukliden getestet. Aufbauend auf den Ergebnissen wurde das AAZTA^{5}-TOC und AAZTA^{5}-PSMA analog radiochemisch evaluiert und sein Einfluss auf die Pharmakologie der zwei Targetvektoren untersucht. Für das AAZTA^{5}-PSMA konnten mit allen drei Nukliden *in vitro*-Affinitäts- und Internalisierungsstudien in

Heidelberg durchgeführt werden. Weiterhin wurden analoge *in* vitro Studien mit dem $^{nat/68}$Ga-Komplex des DATA^{5m}-PSMA durchgeführt.

Für die Anwendung des AAZTA^5 zur Kopplung an Antikörper wurden verschiedene Derivate (AAZTA^5-Bz-NCS, AAZTA^5-en-QS, AAZTA^5-TEG-N_3) synthetisiert. Diese ermöglichen eine milde Kopplung. Sie wurden mit ^{177}Lu radiochemisch evaluiert und bezüglich ihrer Komplexstabilität untersucht. Als *proof-of-concept* wurde zusätzlich das AAZTA^5-Bz-NCS mit dem monoklonalen Antikörper GGSK-1/30 gekoppelt, radiomarkiert und hinsichtlich seiner *in vitro* Stabilität untersucht.

Hauptabschnitt 3: kleinere Projekte und Kooperationen

3.1/3.2 ^{44}Sc als Dosimetrie-Isotop für Theranostics

Im Rahmen von zwei klinischen Studie zur Bestimmung der Dosimetrie von [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 mittels [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 wurde in der Arbeitsgruppe Rösch die ^{44}Sc-Markierung von PSMA-617 durchgeführt. Der in Mainz installierte ^{44}Ti/^{44}Sc-Generator wurde verwendet und nach radiochemischer Aufreinigung und Qualitätskontrolle in Mainz wurde das [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 in Bonn für Dosimetrie-Studien an Patienten angewendet.

3.3 Aufarbeitung und Refixierung des ^{44}Ti/^{44}Sc-Generators

Der ^{44}Ti/^{44}Sc-Generator ist mit einer Halbwertszeit des Mutternuklides von 60 Jahren über lange Jahre nutzbar. Nach fast 10 Jahren der Nutzung des ^{44}Ti/^{44}Sc-Generators in Mainz zeigte dieser einen erhöhten ^{44}Ti-Durchbruch, welcher auf Schäden am Tauschermaterial bzw. die konstante Nutzung der vergangenen Jahre zurückzuführen ist. Das ^{44}Ti wurde von der alten Generatorsäule eluiert und nach Verdünnung auf einer neuen Säule fixiert. Die neue Säule wurde frisch hergestellt und durch 4 Wochen andauernde regelmäßige Elutions- und Fixierungsschritte wurden > 90% des ^{44}Ti erfolgreich fixiert.

3.4 In vivo-Click-Versuche mit Tetrazin-Derivaten des DATA^{5m} und proof-of-principle Tierstudien mit DOTA-PEG$_{10}$-Tz / TCO

Im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Jason Lewis aus New York wurde DATA^{5m} zur Synthese des DATA^{5m}-PEG$_{10}$-Tetrazin zur Verfügung gestellt. Dieses wurde erfolgreich mit ^{68}Ga markiert und für *in vivo*-Versuche an tumortragenden Mäusen mit Vorabinjektion (72 Stunden) des präparierten Antikörpers verwendet.

Weiterhin wurden in Kooperation mit Prof. Herth aus Koppenhagen *proof-of-principle* Tierstudien zur *in vivo*-Click-Anwendung durchgeführt, wobei Ratten das Bisphosphonat TCO injiziert wurde, welches einen gespannten Aromaten zur Clickreaktion mit Tetrazinen trägt. Eine Stunde nach Injektion des TCO wurde das ^{44}Sc-markierte DOTA-PEG$_{10}$-Tz injiziert und die Anreicherung in Schulter- und Oberschenkelknochen untersucht.

3.5 Radiochemische Evaluation von möglichen [^{18}F]AlF^{2+}-Chelatoren: DATA^{5m}, DADA^{5dm} und DADA^{A4m}

Der für ^{68}Ga bereits vielversprechende Chelator DATA^{5m} wurde mit [^{18}F]AlF^{2+} radiochemisch evaluiert und hinsichtlich seiner Stabilität untersucht. Aufgrund mangelnder Stabilität wurde versucht, durch Anpassung des Chelators an andere aktuell vorgestellte [^{18}F]AlF^{2+}-Chelatoren, wie NODA, die Stabilität zu erhöhen.

3.6 Ergänzende Tierstudien mit [^{225}Ac]Ac-DOTA^{ZOL}: Unterdrückung der Leberanreicherung mittels erhöhter Precursormenge und Zugabe von DTPA

Ergänzend zu den Daten aus der Veröffentlichung von Pfannkuchen *et al.* wurden 6 gesunde, junge Ratten in der Wachstumsphase mit [^{225}Ac]Ac-DOTA^{ZOL} behandelt, wobei drei Tiere [^{225}Ac]Ac-DOTA^{ZOL} aus einer Markierung mit erhöhter Menge an Precursor erhielten und den anderen drei Tieren [^{225}Ac]Ac-DOTA^{ZOL} aus einer normalen Markierung mit DTPA-Zusatz injiziert wurde. Die erhaltenen Daten aus der Biodistribution wurden mit Augenmerk auf die Leberanreicherung und Femuranreicherung mit den Daten von Pfannkuchen *et al.* verglichen. Weiterhin wurden alle Organproben direkt nach Entnahme gemessen, um den Verbleib des ^{221}Fr und ^{213}Bi aus dem Zerfall des ^{225}Ac genauer zu bestimmen.

3.0 Literaturverzeichnis

1. Siegel R, Miller K, Jemal A. Cancer statistics , 2015 . CA Cancer J Clin. 2015;65(1):29.

2. Stewart BW, CP W. World Cancer Report 2014. (BW S, CP W, eds.). IARC Publications; 2014.

3. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer Statistics, 2008. CA Cancer J Clin. 2008;58(2):71-96.

4. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. CA Cancer J Clin. 2016;66(1):7-30.

5. Hevesy G de. Nobel Lecture. 1943.

6. Phelps ME. Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes. Proc Natl Acad Sci. 2000;97(16):9226-9233.

7. Czernin J, Phelps ME. Positron Emission Tomography Scanning: Current and Future Applications. Annu Rev Med. 2002;53(1):89-112.

8. Fischer B, Lassen U, Mortensen J, et al. Preoperative Staging of Lung Cancer with Combined PET–CT. N Engl J Med. 2009;361(1):32-39.

9. Shim SS, Lee KS, Kim B-T, et al. Non–Small Cell Lung Cancer: Prospective Comparison of Integrated FDG PET/CT and CT Alone for Preoperative Staging. Radiology. 2005;236(3):1011-1019.

10. Price EW, Orvig C. Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals. Chem Soc Rev. 2014;43(1):260-290.

11. Baum RP, Söldner J, Schmöcking M, Niesen A. Peptidrezeptorvermittelte Radiotherapie (PRRT) neuroendokriner Tumoren. Der Onkol. 2004;10(10):1098-1110.

12. Bergsma H, van Vliet EI, Teunissen JJM, et al. Peptide receptor radionuclide therapy (PRRT) for GEP-NETs. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2012;26(6):867-881.

13. Zovato S, Kumanova A, Demattè S, et al. Peptide Receptor Radionuclide Therapy (PRRT) with ^{177}Lu-DOTATATE in Individuals with Neck or Mediastinal Paraganglioma (PGL). Horm Metab Res. 2012;44(05):411-414.

14. Kratochwil C, Bruchertseifer F, Giesel FL, et al. ^{225}Ac-PSMA-617 for PSMA-Targeted -Radiation Therapy of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. J Nucl Med. 2016;57(12):1941-1944.

15. Ache HJ. Chemistry of the Positron and of Positronium. Angew Chemie Int Ed English. 1972;11(3):179-199.

16. Sandhöfer B. Untersuchungen zum Aufnahmemechanismus von O-(2-[^{18}F]Fluorethyl)-L-tyrosin; Synthese und Evaluierung von ^{68}Ga-markierten Tyrosin-Derivaten: Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz. 2010.

17. Herzog H, Rösch F. PET- und SPECT-Technik: Chemie und Physik der Bildgebung. Pharm Unserer Zeit. 2005;34(6):468-473.

18. Rösch F. Nuclear and Radiochemistry. Berlin ; Boston : Walter de Gruyter; 2016.

19. Roesch F. Maturation of a Key Resource – The Germanium-68 / Gallium-68 Generator : Development and New Insights. 2012:202-211.

20. Rösch F, Qaim SM, Stöcklin G. Production of the positron emitting radioisotope ^{86}Y for nuclear medical application. Appl Radiat Isot. 1993;44(4):677-681.

21. Yu AR, Kim H-J, Lim SM, Kim JS. Comparison of Imaging Characteristics of ^{124}I PET for Determination of Optimal Energy Window on the Siemens Inveon PET. Biomed Res Int. 2016;2016:1-8.

22. Baum EM. Nuclides and Isotopes : Chart of the Nuclides. Schenectady, NY : KAPL : Bechtel; 2010.

23. Ito K, Matsuda H, Kubota K. Imaging Spectrum and Pitfalls of ^{11}C-Methionine Positron Emission Tomography in a Series of Patients with Intracranial Lesions. Korean J Radiol. 2016;17(3):424.

24. Cher LM, Murone C, Lawrentschuk N, et al. Correlation of hypoxic cell fraction and angiogenesis with glucose metabolic rate in gliomas using 18F-fluoromisonidazole, ^{18}F-FDG PET, and immunohistochemical studies. J Nucl Med. 2006;47(3):410-418.

25. Araz M, Aras G, Küçük ÖN. The role of ^{18}F–NaF PET/CT in metastatic bone disease. J Bone Oncol. 2015;4(3):92-97.

26. van de Watering FCJ, Rijpkema M, Perk L, et al. Zirconium-89 Labeled Antibodies: A New Tool for Molecular Imaging in Cancer Patients. Biomed Res Int. 2014;2014:1-13.

27. AIPES. European Observatory on the supply of medical radioisotopes. Eur Obs. 2012.

28. Benešová M, Schäfer M, Bauder-Wüst U, et al. Preclinical Evaluation of a Tailor-Made DOTA-

Conjugated PSMA Inhibitor with Optimized Linker Moiety for Imaging and Endoradiotherapy of Prostate Cancer. J Nucl Med. 2015;56(6):914-920.

29. Hollemann AF, Wiberg N. Lehrbuch Der Anorganischen Chemie.; 1995.

30. Wadas TJ, Wong EH, Weisman GR, Anderson CJ. Coordinating Radiometals of Copper, Gallium, Indium, Yttrium, and Zirconium for PET and SPECT Imaging of Disease. Chem Rev. 2010;110(5):2858-2902.

31. IAEA. Production of Long Lived Parent Radionuclides for Generators: ^{68}Ge, ^{82}Sr, ^{90}Sr and ^{188}W. IAEA Radioisot Radiopharm Ser No 2.

32. Roesch F, J. Riss P. The Renaissance of the ^{68}Ge/^{68}Ga Radionuclide Generator Initiates New Developments in ^{68}Ga Radiopharmaceutical Chemistry. Curr Top Med Chem. 2010;10(16):1633-1668.

33. Zhernosekov KP, Filosofov D V, Baum RP, et al. Processing of generator-produced ^{68}Ga for medical application. J Nucl Med. 2007;48(10):1741-1748.

34. Ana de la Fuente Joaniquet. Radiolabelling, in vitro and in vivo evaluation of metal-labelled biomolecules for PET imaging. Dissertation. 2016.

35. USGS. MINERAL COMMODITY SUMMARIES 2015. US Dep Inter. 2015.

36. Krajewski S, Cydzik I, Abbas K, et al. Cyclotron production of ^{44}Sc for clinical application. Radiochim Acta. 2013;101(5):333-338.

37. Deilami-nezhad L, Moghaddam-Banaem L, Sadeghi M, Asgari M. Production and purification of Scandium-47: A potential radioisotope for cancer theranostics. Appl Radiat Isot. 2016;118(March):124-130.

38. Huclier-Markai S, Alliot C, Sebti J, Brunel B, Aupiais J. A comparative thermodynamic study of the formation of scandium complexes with DTPA and DOTA. RSC Adv. 2015;5(121):99606-99617.

39. Umbricht CA, Benešová M, Schmid RM, et al. ^{44}Sc-PSMA-617 for radiotheragnostics in tandem with ^{177}Lu-PSMA-617—preclinical investigations in comparison with ^{68}Ga-PSMA-11 and ^{68}Ga-PSMA-617. EJNMMI Res. 2017;7(1):9.

40. Roesch F. Scandium-44: benefits of a long-lived PET radionuclide available from the ^{44}Ti/^{44}Sc generator system. Curr Radiopharm. 2012;5(3):187-201.

41. Greene M, Hillman MA. A scandium generator. Int J Appl Radiat Isot. 1967;18:540-541.

42. Mirza M, A A. A scandium generator. Radiochim Acta. 1969;11:43-44.

43. Filosofov BD V, Loktionova NS, Rösch F. A ^{44}Ti/^{44}Sc radionuclide generator for potential application of ^{44}Sc-based PET-radiopharmaceuticals. 2010;156:149-156.

44. Pruszyński M, Majkowska-Pilip A, Loktionova NS, Eppard E, Roesch F. Radiolabeling of DOTATOC with the long-lived positron emitter 44Sc. Appl Radiat Isot. 2012;70(6):974-979.

45. Pruszyński M, Loktionova NS, Filosofov D V., Rösch F. Post-elution processing of ^{44}Ti/^{44}Sc generator-derived ^{44}Sc for clinical application. Appl Radiat Isot. 2010;68(9):1636-1641.

46. Zoller F, Eisenhut M, Haberkorn U, Mier W. Endoradiotherapy in cancer treatment — Basic concepts and future trends. Eur J Pharmacol. 2009;625(1-3):55-62.

47. Baum RP, Kulkarni HR, Albers P. Theranostik. Der Onkol. 2017;23(8):597-608.

48. Esser JP, Krenning EP, Teunissen JJM, et al. Comparison of [^{177}Lu-DOTA0,Tyr3]octreotate and [^{177}Lu-DOTA0,Tyr3]octreotide: which peptide is preferable for PRRT? Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2006;33(11):1346-1351.

49. Baum RP, Kulkarni HR, Schuchardt C, et al. ^{177}Lu-Labeled Prostate-Specific Membrane Antigen Radioligand Therapy of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: Safety and Efficacy. J Nucl Med. 2016;57(7):1006-1013.

50. Weineisen M, Schottelius M, Simecek J, et al. ^{68}Ga- and ^{177}Lu-Labeled PSMA I&T: Optimization of a PSMA-Targeted Theranostic Concept and First Proof-of-Concept Human Studies. J Nucl Med. 2015;56(8):1169-1176.

51. Pillai MRA, Chakraborty S, Das T, Venkatesh M, Ramamoorthy N. Production logistics of ^{177}Lu for radionuclide therapy. Appl Radiat Isot. 2003;59(2-3):109-118.

52. Lebedev NA, Novgorodov A, Misiak R, Brockmann J, Rösch F. Radiochemical separation of no-carrier-added Lu-177 as produced via the Yb-176 (n ,γ) Yb-177 → ^{177}Lu process. Appl Radiat Isot. 2000;53:421-425.

53. Aime S, Barge A, Botta M, et al. Crystal structure and solution dynamics of the lutetium(III) chelate of DOTA. Inorganica Chim Acta. 1996;246(1-2):423-429.

54. Riedel. Anorganische Chemie. Vol 6. Auflage. de Gruyter; 2004.

55. Mortimer CE, Müller U, eds. 30.2 Stabilität von Komplexen. In: *Chemie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2010.

56. Seifert JK, Görges R, Bockisch A, Junginger T. Indium-111-DTPA-Octreotid-Szintigraphie bei kolorektalen Lebermetastasen. Langenbecks Arch Chir. 1997;382:332-336.

57. Schuhmacher J, Klivenyi G, Hull WE, et al. A bifunctional HBED-derivative for labeling of antibodies with ^{67}Ga, ^{111}In and ^{59}Fe. Comparative biodistribution with ^{111}In-DPTA and ^{131}I-labeled antibodies in mice bearing antibody internalizing and non-internalizing tumors. Nucl Med Biol. 1992;19(8):809-824.

58. Eder M, Wängler B, Knackmuss S, et al. Tetrafluorophenolate of HBED-CC: A versatile conjugation agent for ^{68}Ga-labeled small recombinant antibodies. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2008;35(10):1878-1886.

59. Eder M, Krivoshein A V., Backer M, et al. ScVEGF-PEG-HBED-CC and scVEGF-PEG-NOTA conjugates: comparison of easy-to-label recombinant proteins for [^{68}Ga]PET imaging of VEGF receptors in angiogenic vasculature. Nucl Med Biol. 2010;37(4):405-412.

60. Boros E, Ferreira CL, Cawthray JF, et al. Acyclic Chelate with Ideal Properties for ^{68}Ga PET Imaging Agent Elaboration. J Am Chem Soc. 2010;132(44):15726-15733.

61. Boros E, Ferreira CL, Yapp DTT, et al. RGD conjugates of the H_2dedpa scaffold: Synthesis, labeling and imaging with ^{68}Ga. Nucl Med Biol. 2012;39(6):785-794.

62. Berry DJ, Ma Y, Ballinger JR, et al. Efficient bifunctional gallium-68 chelators for positron emission tomography: tris(hydroxypyridinone) ligands. Chem Commun (Camb). 2011;47(25):7068-7070.

63. Perk LR, Vosjan MJWD, Visser GWM, et al. p-Isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine: a new bifunctional chelate for facile radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for immuno-PET imaging. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2010;37(2):250-259.

64. Patra M, Bauman A, Mari C, et al. An octadentate bifunctional chelating agent for the development of stable zirconium-89 based molecular imaging probes. Chem Commun. 2014;50(78):11523-11525.

65. Mukai T, Namba S, Arano Y, et al. Synthesis and evaluation of a monoreactive DOTA derivative for indium-111-based residualizing label to estimate protein pharmacokinetics. J Pharm Pharmacol. 2002;54(8):1073-1081.

66. Huclier-Markai S, Kerdjoudj R, Alliot C, et al. Optimization of reaction conditions for the radiolabeling of DOTA and DOTA-peptide with $^{44m/44}$Sc and experimental evidence of the feasibility of an in vivo PET generator. Nucl Med Biol. 2014;41:e36-e43.

67. Gabriel M, Decristoforo C, Kendler D, et al. ^{68}Ga-DOTA-Tyr3-octreotide PET in neuroendocrine tumors: comparison with somatostatin receptor scintigraphy and CT. J Nucl Med. 2007;48(4):508-518.

68. Breeman WAP, Jong M, Visser TJ, Erion JL, Krenning EP. Optimising conditions for radiolabelling of DOTA-peptides with ^{90}Y, ^{111}In and ^{177}Lu at high specific activities. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2003;30(6):917-920.

69. Mcdevitt MR, Ma D, Simon J, Frank RK, Scheinberg DA. Design and synthesis of ^{225}Ac radioimmunopharmaceuticals. 2002;57:841-847.

70. Bevilacqua A, Gelb RI, Hebard WB, Zompa LJ. Equilibrium and thermodynamic study of the aqueous complexation of 1,4,7-triazacyclononane-N,N',N''-triacetic acid with protons, alkaline-earth-metal cations, and copper(II). Inorg Chem. 1987;26(16):2699-2706.

71. Sun Y, Anderson CJ, Pajeau TS, et al. Indium(III) and Gallium(III) Complexes of Bis(aminoethanethiol) Ligands with Different Denticities: Stabilities, Molecular Modeling, and in Vivo Behavior. J Med Chem. 1996;39(2):458-470.

72. McMurry TJ, Brechbiel M, Wu C, Gansow OA. Synthesis of 2-(p-thiocyanatobenzyl)-1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid: Application of the 4-methoxy-2,3,6-trimethylbenzenesulfonamide protecting group in the synthesis of macrocyclic polyamines. Bioconjug Chem. 1993;4(3):236-245.

73. Eisenwiener KP, Prata MIM, Buschmann I, et al. NODAGATOC, a new chelator-coupled somatostatin analogue labeled with [$^{67/68}$Ga] and [^{111}In] for SPECT, PET, and targeted therapeutic applications of somatostatin receptor (hsst2) expressing tumors. Bioconjug Chem. 2002;13(3):530-541.

74. Šimeček J, Zemek O, Hermann P, Wester HJ, Notni J. A Monoreactive Bifunctional Triazacyclononane Phosphinate Chelator with High Selectivity for Gallium-68. ChemMedChem. 2012;7(8):1375-1378.

75. Notni J, Šimeček J, Hermann P, Wester HJ. TRAP, a powerful and versatile framework for gallium-68 radiopharmaceuticals. Chem - A Eur J. 2011;17(52):14718-14722.

76. Seemann J, Waldron BP, Roesch F, Parker D. Approaching “kit-type” labelling with ^{68}Ga: The DATA chelators. ChemMedChem. 2015;10(6):1019-1026.

77. Waldron BP, Parker D, Burchardt C, et al. Structure and stability of hexadentate complexes of ligands based on AAZTA for efficient PET labelling with gallium-68. Chem Commun (Camb). 2013;49(Scheme 2):579-581.

78. Seemann J, Waldron B, Parker D, Roesch F. DATATOC: a novel conjugate for kit-type ^{68}Ga labelling of TOC at ambient temperature. EJNMMI Radiopharm Chem. 2017;1(1):4.

79. Tsionou MI, Knapp CE, Foley CA, et al. Comparison of macrocyclic and acyclic chelators for gallium-68 radiolabelling. RSC Adv. 2017;7(78):49586-49599.

80. Brazeau P, Vale W, Burgus R, et al. Hypothalamic Polypeptide That Inhibits the Secretion of Immunoreactive Pituitary Growth Hormone. Science (80-). 1973;179(4068):77-79.

81. Burgus R, Ling N, Butcher M, Guillemin R. Primary structure of somatostatin, a hypothalamic peptide that inhibits the secretion of pituitary growth hormone. Proc Natl Acad Sci USA. 1973;70(3):684-688.

82. Patel YC. Somatostatin and its receptor family. Front Neuroendocrinol. 1999;20(3):157-198.

83. Yamada, Post, Wang, et al. Cloning and functional characterization of a family of human and mouse somatostatin receptors expressed in brain, gastrointestinal tract, and kidney. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992;89(1):251-255.

84. Modlin IM, Pavel M, Kidd M, Gustafsson BI. Review article: Somatostatin analogues in the treatment of gastroenteropancreatic neuroendocrine (carcinoid) tumours. Aliment Pharmacol Ther. 2010;31(2):169-188.

85. Reubi JC, Schär J-C, Waser B, et al. Affinity profiles for human somatostatin receptor subtypes SST1-SST5 of somatostatin radiotracers selected for scintigraphic and radiotherapeutic use. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2000;27(3):273-282.

86. Graham M, Mailman J. FDA Grants Orphan Drug Designation for ^{68}Ga-DOTATOC. J Nucl Med. 2014;55(1):10N.

87. Pillai MRA, Nanabala R, Joy A, Sasikumar A, Russ Knapp FF. Radiolabeled enzyme inhibitors and binding agents targeting PSMA: Effective theranostic tools for imaging and therapy of prostate cancer. Nucl Med Biol. 2016;43(11):692-720.

88. Perner S, Hofer MD, Kim R, et al. Prostate-specific membrane antigen expression as a predictor of prostate cancer progression. Hum Pathol. 2007;38(5):696-701.

89. Silver A, Fair R. Prostate-specific Membrane Antigen Expression in Normal and Malignant Human Tissues. 1997;3(January):81-85.

90. Zhang AX, Murelli RP, Barinka C, et al. A Remote arene-binding site on prostate specific membrane antigen revealed by antibody-recruiting small molecules. J Am Chem Soc. 2010;132(36):12711-12716.

91. Witkowska-Patena E, Mazurek A, Dziuk M. ^{68}Ga-PSMA PET/CT imaging in recurrent prostate cancer: Where are we now? Cent Eur J Urol R Cent Eur J Urol. 2017;70:37-43.

92. Schäfer M, Bauder-Wüst U, Leotta K, et al. A dimerized urea-based inhibitor of the prostate-specific membrane antigen for ^{68}Ga-PET imaging of prostate cancer. EJNMMI Res. 2012;2(1):23.

93. Eder M, Schäfer M, Bauder-Wüst U, et al. ^{68}Ga-complex lipophilicity and the targeting property of a urea-based PSMA inhibitor for PET imaging. Bioconjug Chem. 2012;23(4):688-697.

94. Hsing AW, Chokkalingam AP. Prostate cancer epidemiology. Front Biosci. 2006;11:1388-1413.

4.0 Hauptabschnitt 1: DATA[5m]

4.1 Instant kit-preparation of ^{68}Ga-radiopharmaceuticals via the chimeric chelator DATA: Clinical translation of [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC

Jean-Philippe Sinnes[1], Johannes Nagel[1], Bradley Waldron[1], Theodosia Maina[2], Berthold A. Nock[2], Ralf K. Bergmann[3], Martin Ullrich[3], Jens Pietzsch[3,4], Michael Bachmann[3,5,6], Richard P. Baum[7], Frank Rösch[1*]

Author details:

[1]Johannes Gutenberg-University Mainz, Institute of Nuclear Chemistry, Germany

[2]NCSR "Demokritos", Molecular Radiopharmacy, INRASTES, Athens, Greece

[3]Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf, Institute of Radiopharmaceutical Cancer Research, Dresden, Germany

[4]Technische Universität Dresden, School of Science, Faculty of Chemistry and Food Chemistry, Dresden, Germany

[5]Technische Universität Dresden, Universitätsklinikum 'Carl Gustav Carus', UniversitätsKrebsCentrum (UCC), Tumorimmunology, Dresden, Germany

[6]Technische Universität Dresden, National Center for Tumor Diseases (NCT), Dresden, Germany

[7]Zentralklinik Bad Berka GmbH, Clinic for Molecular Radiotherapy, Bad Berka, Germany

Correspondence: frank.roesch@uni-mainz.de / Tel. +49 6131 39 25302

ORCID ID´s:

Ralf K. Bergmann: 0000-0002-8733-4286; Berthold A. Nock: 0000-0002-6028-9112; Theodosia Maina: 0000-0002-1123-2486; Jens Pietzsch: 0000-0002-1610-1493

Acknowledgements The authors greatly acknowledge the excellent technical assistance of Andrea Suhr, Regina Herrlich, Sebastian Meister, Ulrike Gesche, Christian Jentschel as well as the contribution of Dr. Aikaterini Kaloudi in receptor binding assays included in this manuscript. MPC 4/30PRR cells were kindly provided by Prof. Arthur S. Tischler.

Angenommen bei EJNMMI - Research

Abstract

Purpose The widespread use of ^{68}Ga for positron emission tomography (PET) depends on the ability to develop radiopharmaceuticals that can be prepared in a simple, quick and convenient manner. The DATA (6-amino-1,4-diazapine-triacetate) scaffold represents a novel hybrid chelator type possessing both cyclic and acyclic character, that may allow for facile access to ^{68}Ga-radiotracers in the clinic. We report the first bifunctional DATA chelator conjugated to [Tyr^3]octreotide (TOC), a somatostatin subtype 2 receptor (SST_2)-targeting vector for imaging and functional characterisation of neuroendocrine tumours (NETs).

Methods DATA-TOC was synthesised as previously described and labelled with both ^{nat}Ga and ^{68}Ga. Competition binding assays with [^{nat}Ga]Ga-DATA-TOC and [^{nat}Ga]Ga-DOTA-TOC against [^{125}I-Tyr^{25}]LTT-SS28 were conducted in membranes of HEK293 cell to stably express one of the h$SST_{2,3,5}$ receptor subtypes (HEK293-h$SST_{2/3/5}$ cells). First *in vivo* studies were performed in female NMRI-nude mice bearing SST_2-positive mouse phaeochromocytoma cells stably expressing mCherry (MPC-mCherry) tumours to compare the *in vivo* SST_2- specific tumour-targeting capacity of [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC and its overall pharmacokinetics *vs*. the [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC reference. A direct comparison of [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC with the well-established PET radiotracer [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC was performed in a 46-year-old male patient with a well-differentiated NET.

Results DATA-TOC was labelled with ^{68}Ga in a yield >95 % in less than 10 min at ambient temperature. A molar specific activity up to 35 MBq/nmol was achieved. The hSST_2-affinities of [^{nat}Ga]Ga-DATA-TOC and [^{nat}Ga]Ga-DOTA-TOC were found comparable with only sub-nanomolar differences in the respective IC_{50} values (IC_{50} = 1.03±0.08 nM and 0.21±0.01 nM, respectively). In mice, [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC was able to visualize the tumour lesions, showing standardised uptake values (SUVs) similar to [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC. Direct comparison of the two PET-tracers in a NET patient revealed matching tumour uptake with higher tumour-to-liver contrast for [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC.

Conclusion [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC performed comparably well to [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC in all preclinical tests and achieved higher tumour-to-liver contrast in a NET-patient, illustrating the great potential of the DATA-chelator for easy access to ^{68}Ga-radiotracers in a routine clinical environment.

Keywords Gallium-68, DATA-TOC, neuroendocrine tumour, somatostatin receptor, PET-CT, molecular imaging

Introduction

There has been a surge in the development of ^{68}Ga-radiopharmaceuticals over the last decade initiated by the clinical success of [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC (TOC: DPhe-c[Cys-Tyr-DTrp-Lys-Thr-Cys]-Thr-ol) and [^{68}Ga]Ga-DOTA-TATE (TATE: DPhe-c[Cys-Tyr-DTrp-Lys-Thr-Cys]-Thr-OH), as well as by significant improvements in the provision of ^{68}Ga generators now fulfilling pharmaceutical standards [1-6].

As a result, [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC and [^{68}Ga]Ga-DOTA-TATE are currently being used in clinical settings for the diagnosis of neuroendocrine tumours (NETs). Furthermore, last year [^{68}Ga]Ga-DOTA-TATE acquired FDA approval as a diagnostic PET-radiopharmaceutical for the visualisation of NET lesions (FDA News Release, June 1, 2016), following the "orphan drug" designation to [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC by FDA [7]. Due to the availability of ^{68}Ga *via* commercial ^{68}Ge/^{68}Ga-generators and its favourable emission characteristics for PET imaging (β^+ = 89 %, $E_{\beta,max}$ = 1.9 MeV) the easy and fast *in situ* access to ^{68}Ga-radiopharmaceuticals is expected to boost the use of ^{68}Ga in PET centres [1, 8-11]. A key step in this direction is related to labelling protocols, which essentially depend on the type of the bifunctional chelator (BFC) attached to the vector of interest. Hitherto established BFCs for ^{68}Ga require relatively harsh conditions (high temperatures and/or low pH) or, if milder conditions become necessary, relatively high amounts of precursor for full incorporation of the radio-metal [2, 12]. This restriction inherently limits the portfolio of ^{68}Ga-radiopharmaceuticals.

At the same time, several promising peptide, protein and antibody-based pharmaceuticals for application in nuclear oncology are temperature and/or pH sensitive [13] and the radiolabelling of such molecules imposes new stringent requirements on the BFC, i.e. >95 % labelling efficiency at ambient temperatures and pH in high specific activities. Moreover, in the case of short-lived radionuclides, like ^{68}Ga ($t_{1/2}$= 67.7 min), short labelling times are highly desirable as well as formation of a high quality ready-for-injection radiolabelled product, not requiring further purification prior to use. The development of such labelling protocols would be of excellent added-value to the aforementioned advantages of ^{68}Ga, but presents significant challenges, especially in the design of suitable BFCs [14].

In general, chelators (Supporting information, Figure S1) can be distinguished as predominantly cyclic (DOTA, NOTA, TRAP), associated with high thermodynamic and kinetic stability, or acyclic (DFO, DTPA and more recently THP), linked to fast, mild and high labelling efficiency [12, 15-19]. Newer investigations proved the THP to be superior in terms of labelling kinetics [20], whereas the complete new structure of THP and complexation still has to be evaluated and prove their full viability *in vivo* for different TVs. Stability wise chelators like HBED promise a more stable

complex with ^{68}Ga then DOTA or NOTA with a log K_1 of 39.6, but with a negative charge of -1 HBED do not offer the best predisposition for *in vivo* application. Special chelators like TRAP bring good predispositions in general, but as shown in [20] do not improve on options like NOTA, while been more focused on multivalent applications. To improve on the most known and best evaluated binding motive of DOTA and NOTA, with N_4O_3 and N_3O_3, respectively, the new DATA-scaffold represents a novel approach to chelator design in that the DATA chelators are essentially hybrids, possessing both cyclic and acyclic character. It is assumed that flexibility of the acyclic portion facilitates rapid complexation, whilst the preorganised cyclic portion minimises the energy-barrier to complexation and inhibits decomplexation processes [21, 22]. The favourable radiolabelling kinetics of the DATA chelators, radiolagelling at room temperature and pH 4 - 6.5, along with the stability of the forming ^{68}Ga-chelates, been fully stable over two hours against human serum and PBS buffer, motivated us to develop a bifunctional version of DATA suitable for coupling to vectors of clinical interest. We recently reported on the synthesis and ^{68}Ga-radiolabelling of the first DATA peptide conjugate, DATA-TOC (Figure 1) [23].

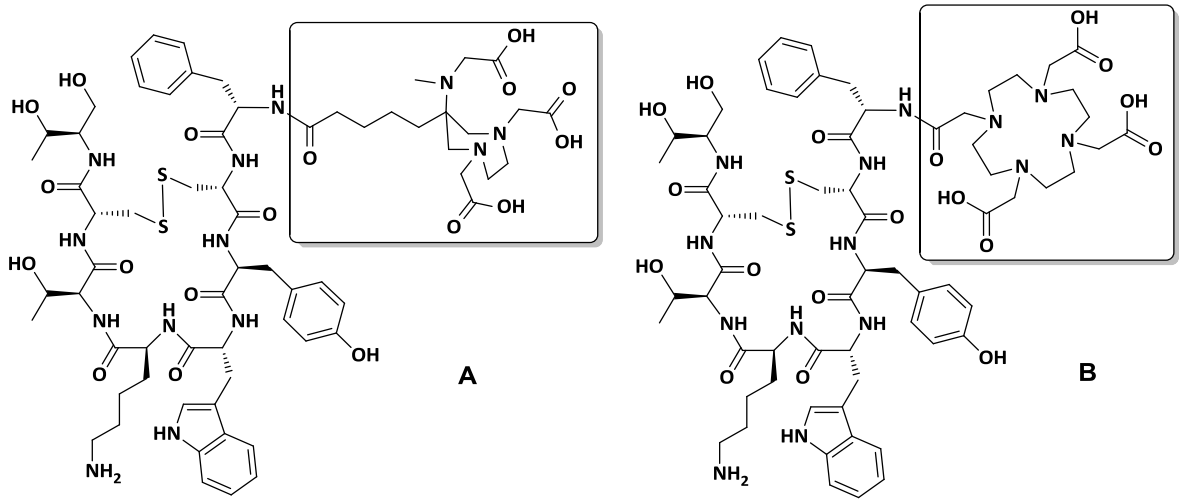


Fig 1. Structures of [Tyr^3]octreotide coupled with (A) DATA and (B) DOTA; chelator structures are highlighted.

In the present work, we were interested to evaluate the suitability of DATA-based ^{68}Ga-radiolabelling with well tested molecular vectors, using [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC as our first paradigm. Specifically, we compared [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC with the clinically established reference [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC in a series of biological *in vitro* and *in vivo* models expressing the somatostatin subtype 2 receptor ($hSST_2$), namely: (i) competition binding assays in human $SST_{2/3/5}$-positive cell membranes, (ii) biodistribution and small animal PET imaging in a preclinical mCherry-expressing mouse phaeochromocytoma (MPC-mCherry) model with high SST_2 density [24, 25] and (iii) clinical studies in

a NET-patient. This direct comparison will reveal the influence of DOTA-to-DATA chelator-switching on the biological behaviour of resulting ^{68}Ga-radiotracers.

Methods

Peptides and Radiolabelling

DATA-TOC was synthesised as previously described [23], while DOTA-TOC was purchased from ABX GmbH. The ^{nat}Ga-metallated species [^{nat}Ga]Ga-DATA-TOC and [^{nat}Ga]Ga-DOTA-TOC were obtained after treatment of the respective peptide conjugates with excess $^{nat}GaCl_3$ and HPLC-purification (Luna 10 µm (C18) 100 A (250 mm × 10 mm, 10 µm); A: H_2O, B: MeCN). The retention time (t_R) of [^{nat}Ga]Ga-DOTA-TOC was 18.6 min and 19.9 min for [^{nat}Ga]Ga-DATA-TOC (linear gradient: 5 % MeCN to 50 % MeCN in 20 min).

LTT-SS28 (H-Ser-Ala-Asn-Ser-Asn-Pro-Ala-Leu-Ala-Pro-Arg-Glu-Arg-Lys-Ala-Gly-c[Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-DTrp-Lys-Thr-Tyr-Thr-Ser-Cys]-OH) was purchased from Bachem.

Gallium-68 was eluted from a ^{68}Ge/^{68}Ga-generator (iThemba Labs, or IDB Holland) with 1 M HCl. The final HCl concentration in the eluates from both generators was approximately 1 M. The pH of the fractionated ^{68}Ga-eluate (300 µL containing 555 MBq (15 mCi) ^{68}Ga at start of synthesis) was adjusted to pH 4.0–4.5 using 2 M NH_4OAc. A solution of $^{68}Ga(OAc)_3$ in acetate buffer was added to 20 nmol of each peptide. The reaction mixture was shaken for 15 min at 80 °C to afford [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC or at 25 °C to afford [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC. Reaction mixtures were analysed by radio-HPLC.

HPLC was performed on a Series 1200 device (Agilent) equipped with the Ramona ß/γ-ray detector (Raytest). Eluent A: 0.1 % (v/v) TFA in H_2O; eluent B: 0.1 % (v/v) TFA in MeCN; HPLC system: Zorbax (Agilent) SB-C18, 300 Å, 4 µm, 250 mm × 9.4 mm; linear gradient elution using 95 % eluent A to 95 % eluent B in 10 min, 50 °C. Radiolabelled conjugates with radiochemical purity higher than 95 % were used for subsequent biological experiments after filtering the labelling reaction mixture (45 µm pore size, REZIST 13/0.45 PTFE, Schleicher & Schuell). Filtrates were diluted with 0.1 mL electrolyte solution E-153 (Serumwerk Bernburg AG) to a final concentration of about 80 MBq/mL [26, 27].

Radiotracer stability was assessed separately for trans-chelation (against apotransferrin and DTPA) and trans-metalation (against Fe^{III}) at 37 °C and pH 7 in phosphate-buffered saline (PBS), applying radio-HPLC [23].

For the preparation of [^{125}I-Tyr^{25}]LTT-28, [^{125}I]NaI was provided by PerkinElmer in dilute sodium hydroxide solution pH 8-11 in an activity concentration of 13.52 GBq (365.4 mCi)/mL. Radioiodination was performed according to the chloramine-T method using 0.1 M D,L-methionine to quench the reaction and the radioligand was isolated by HPLC, as previously described [28-30].

Cell Culture and in Vitro Assays

The HEK293 cell line transfected to stably express each of the hSST$_{2/3/5}$ (HEK293-hSST$_{2/3/5}$) and used for receptor affinity assessments was a kind gift of Prof. S. Schultz (Institute of Pharmacology and Toxicology, University Hospital, Friedrich Schiller University Jena, Germany). Cells were cultured at 37 °C and 5 % CO_2 in Dulbecco's modified eagle medium containing 10 % fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, and 500 mg/mL G418, as previously described [28, 30]. All culture reagents were from Gibco BRL, Life Technologies or from Biochrom KG Seromed.

The genetically modified MPC-mCherry cells [25] derived from MPC cells (clone 4/30PRR [30]) characterised by a high density expression of mouse SST$_2$ [24] were cultured and prepared for *in vivo* application as previously described [24, 25].

Competition binding experiments were performed for [^{nat}Ga]Ga-DATA-TOC and [^{nat}Ga]Ga-DOTA-TOC in HEK293-hSST$_{2/3/5}$ cell membranes, harvested as previously described [29]. [^{125}I-Tyr^{25}]LTT-SS-28 served as radioligand and [LTT]SS-28 ([Leu^8,DTrp^{22},Tyr^{25}]SS-28) as reference compound [28, 30, 32]. In brief, radioligand (70 µL, 50 pM corresponding to ≈ 40,000 cpm), test peptide (30 µL solution of increasing concentrations, 10^{-5}-10^{-13} M) and membrane homogenates (200 µL) were added in each assay tube (total volume of 300 µL in binding solution: 50 mM HEPES pH 7.4, 1 % BSA, 5.5 mM $MgCl_2$, 35 µM bacitracin); triplicates for each concentration point were used. Samples were incubated for 60 min at 22 °C in an Incubator-Orbital Shaker unit, (MPM Instr. Srl). Ice-cold washing buffer (10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl) was added, followed by rapid filtration over glass fiber filters (Whatman GF/B, pre-soaked for 2 h in a 1 % polyethyleneimine (PEI) aqueous solution) on a Brandel Cell Harvester (Adi Hassel Ingenieur Büro) and by rinsing the filters with ice-cold washing buffer. Filters were collected and their activity was counted in a γ-counter (automated well-type multi-sample gamma counter; NaI(Tl) 3´´ crystal, Canberra Packard Auto-Gamma 5000 series instrument). The half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values were calculated by nonlinear regression according to a one-site model applying the PRISM 2 program (Graph Pad Software) and represent mean IC_{50}±sd from n experiments performed in triplicate; [^{nat}Ga]Ga-DATA-TOC (n =3), [^{nat}Ga]Ga-DOTA-TOC (n =2) and LTT-SS-28 (n =3).

Animal experiments

A number of 2 x 10^6 MPC-mCherry cells were transplanted subcutaneosly into the right shoulder of 8 to 10 weeks old female NMRI-nude mice (RjOrl:NMRI-Foxn1^{nu} /Foxn1^{nu}, Janvier Labs). Tumour growth was monitored by fluorescence imaging using the In-vivo Xtreme optivcal imaging system (Bruker) [24] under anaesthesia that was induced and maintained with inhalation of 12 % and 9 % (v/v) desflurane in 30/10 % (v/v) oxygen/air, respectively. Animals were studied when the tumour diameter reached 6 to 9 mm.

For biodistribution studies with [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC were 17 (control n = 9, blocked n = 8) and with [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC 12 (control n = 5, blocked n = 7) female mice (body weight 36.3 ± 2.1 g) injected intravenously into a tail vein with approximately 2.3 MBq (62 µCi) / 0.35 nmol peptide (DATA-TOC 11.2 nmol/kg body weight and DOTA-TOC 10.5 nmol/kg body weight) in 0.1 mL electrolyte solution E-153 (Serumwerk Bernburg AG) without (control) or with simultaneous injection of 100 µg/mouse [Nal^3]octreotide acetate (blocked). Animals were sacrificed at 60 min post-injection (p.i.). Blood, tumour and the major organs were collected, weighed, and counted in a cross-calibrated γ-counter (Isomed 1000, Isomed GmbH) and Wallac WIZARD Automatic Gamma Counter (PerkinElmer). The activity of the tissue samples was decay-corrected and calibrated by comparing the counts in tissue with the counts in aliquots of the injected radiotracer that had been measured in the γ-counter at the same time. The activity in the selected organs was expressed as percent-injected dose per organ (%ID) and the activity concentration in tissues and organs as standardised uptake value (SUV in [MBq activity/g tissue] / [MBq injected activity/g body weight]). Values are quoted as mean ± standard deviation for each group of four animals.

PET scans were performed using a dedicated rodent PET/CT scanner (NanoPET/CT, Mediso). Anesthetized mice (two animals per group) bearing subcutaneous MPC-mCherry-tumours on the right shoulder were positioned on a warmed bed along the scanner axis. The 68Ga-labeled radio tracer, 10 MBq/0.26 nmol/300 µL (8.6 nmol DATA-TOC/kg body weight) and 10 MBq/0.26 nmol/300 µL (14.1 nmol DOTA-TOC/kg body weight), was infused over one minute into a tail vein. PET images were acquired beginning with the injection on a Mediso NanoPET/CT camera and were reconstructed in dynamic mode with 38 frames and 0.5 mm3 voxel size. Region-of-interest quantification was performed with ROVER (ABX GmbH). The ROI values were not corrected for recovery and partial volume effects. For each NanoPET/CT scan, 3D regions of interest (ROIs) were drawn over tumour, heart, muscle, liver and kidney in decay-corrected whole-body orthogonal images.

Statistical analyses were carried out with GraphPad Prism version 6 (GraphPad Software). The data are expressed as mean ± SEM, and were submitted to one-way analysis of variance

(ANOVA) with *post hoc* Tukey´s multiple comparisons test, with a single pooled variance. Values of $P<0.05$ were considered statistically significant and indicated by an asterisk (*).

Human Studies

A direct comparison between [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC and [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC was performed in a 46-year-old male patient with a well-differentiated NET in the body and tail of the pancreas as well as peritumoural lymph node metastases, first diagnosed in November 2012. The large primary tumour involving the stomach, the spleen and the left adrenal gland was surgically resected (R2) by distal pancreatectomy, partial gastrectomy, splenectomy, left adrenalectomy and omentectomy. Despite octreotide therapy, the disease was progressing and in 2015 the patient was treated by peptide receptor radionuclide therapy (PRRT), administering 5 GBq of [^{90}Y]Y-DOTA-TOC. Before the second cycle, restaging was performed on a Biograph mCT FLOW 64 PET/CT from the vertex until mid-thigh exactly 50 min after injection of 117 MBq of [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC (~5 µg peptide) and 120 MBq of [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC (~5 µg peptide), respectively (Figure 2). Written informed consent was obtained from the patient in accordance with paragraph 37 of the updated Declaration of Helsinki, "Unproven Interventions in Clinical Practice", and in accordance with the German Medical Products Act AMG §13 2b.

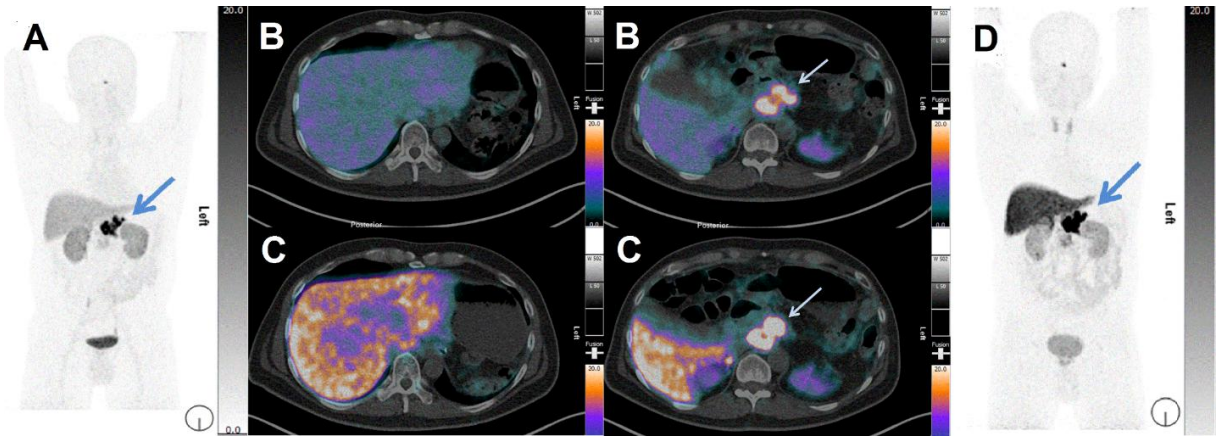


Fig 2: [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC PET/CT images – (**A**) PET MIP, (**B**) transverse PET/CT fusion. [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC PET/CT images – (**C**) transverse PET/CT fusion, (**D**) PET MIP. Arrows demonstrate high uptake in the primary pancreatic NET. The [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC PET/CT images show slightly higher physiological uptake in the kidneys as compared to the [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC PET/CT study in the same patient. There is significantly higher uptake in normal liver after injection of [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC in comparison with PET/CT images obtained after using [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC.

Results

Affinity of [^{nat}Ga]Ga-DATA-TOC and [^{nat}Ga]Ga-DOTA-TOC for the hSST$_{2/3/5}$

The metallated peptide-conjugates [^{nat}Ga]Ga-DATA-TOC and [^{nat}Ga]Ga-DOTA-TOC were tested for their ability to displace the pansomatostatin radioligand [^{125}I-Tyr^{25}]LTT-SS-28 from hSST$_{2/3/5}$-binding sites in HEK293-hSST$_{2/3/5}$ cell membranes using the pansomatostatin ligand LTT-SS28 as reference [28-30]. As shown in Figure 3, both octapeptide analogs exhibited high affinity for the hSST$_2$ ([^{nat}Ga]Ga-DATA-TOC, IC$_{50}$ = 1.03±0.08 nM and [^{nat}Ga]Ga-DOTA-TOC, IC$_{50}$ = 0.21±0.01 nM), which compared to LTT-SS28 showed only sub-nanomolar differences in the respective IC$_{50}$ values (IC$_{50}$ = 0.05±0.01 nM) [32]. It should be noted, that while LTT-SS28 displayed sub-nM affinity also for hSST$_3$ (IC$_{50}$= 1.03±0.08 nM) and hSST$_5$ (IC$_{50}$= 1.03±0.08 nM), [^{nat}Ga]Ga-DATA-TOC and [^{nat}Ga]Ga-DOTA-TOC were found to be hSST$_2$-prefering, showing indistinguishable specific from non-specific binding in the concentration range applied.

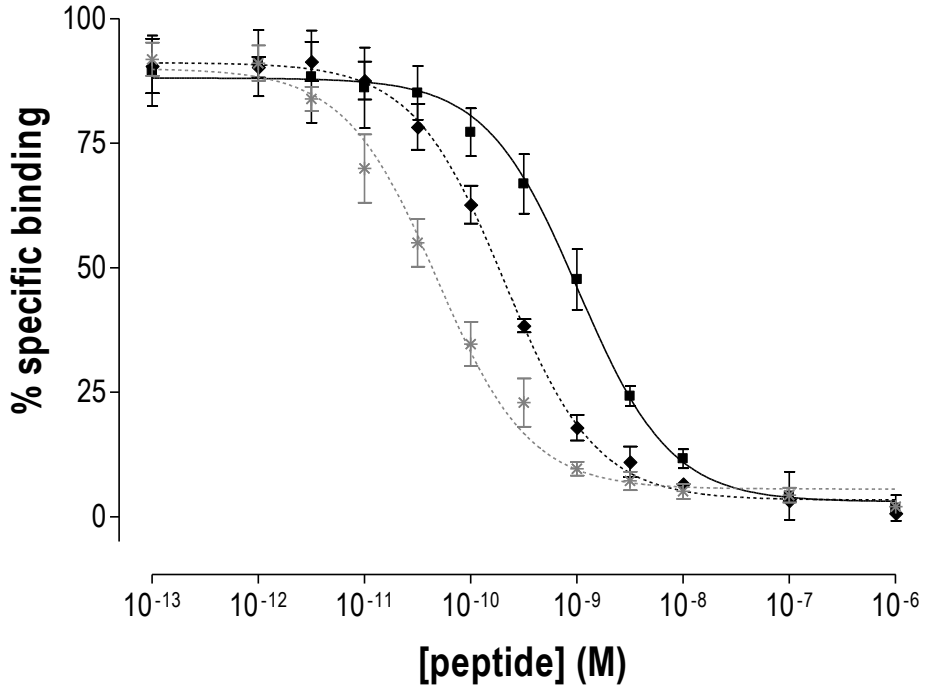
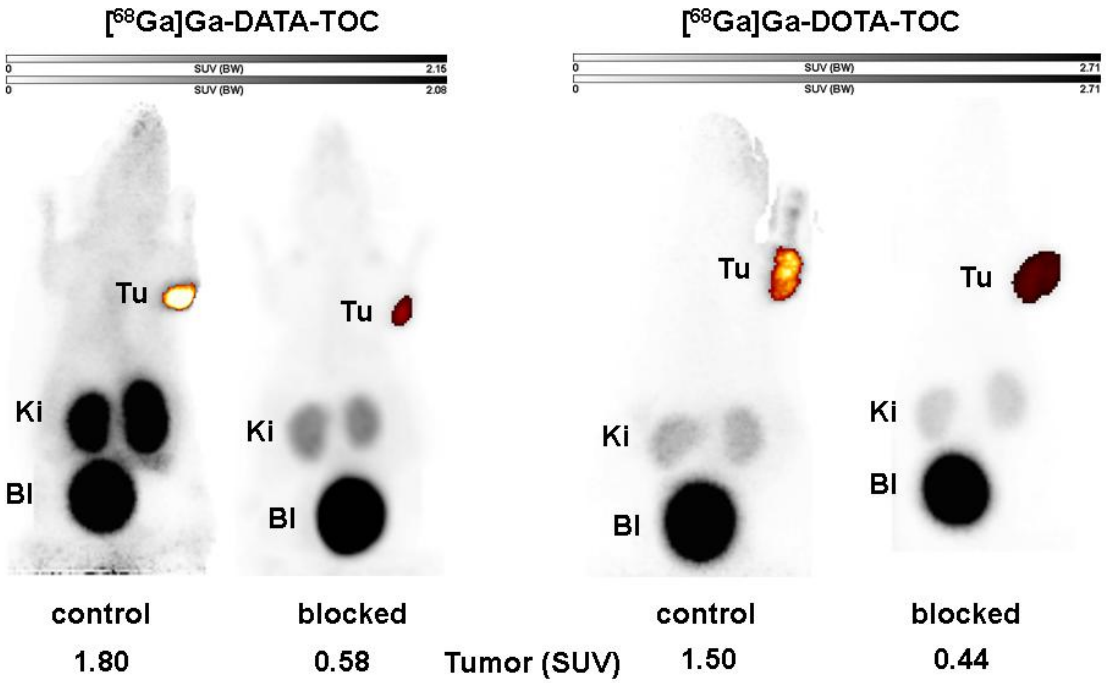


Fig 3. Displacement of [^{125}I-Tyr^{25}]LTT-SS-28 from hSST$_2$ binding sites in HEK293-hSST$_2$ cell membranes by increasing concentrations of: ■ [^{nat}Ga]Ga-DATA-TOC (IC$_{50}$ = 1.03±0.08 nM, n = 3); ◆ [^{nat}Ga]Ga-DOTA-TOC (IC$_{50}$ = 0.21±0.01 nM, n = 2); control: ✳ LTT-SS-28 (IC$_{50}$ = 0.05±0.01 nM, n = 3). Results represent the average IC$_{50}$ values±sd of independent experiments performed in triplicate.

Small Animal PET and biodistribution

In dynamic PET studies in NMRI-nude mice, the implanted allogenic subcutaneous MPC-mCherry tumour was clearly visible with both radiotracers (Figure 4), while the uptake could be almost completely blocked by simultaneous injection of the potent somatostatin analogue [Nal^3]octreotide acetate (100 µg/mouse). The kinetic tumour-to-blood ratios of [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC and [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC (Figure 5) showed a similar linear shape and values (Figure 6). At 2 h p.i. the tumour-to-blood ratios (standard uptake ratio, SUR) of the control and blocking experiments with both compounds reached similar levels between of 31.6±16.0 (n = 2), 28.1±1.3 (n = 3) and 3.6±0.0 (n = 2), 0.7±0.3 (n = 2) for [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC, [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC in control and blocking, respectively.



Fig

Fig 4. Maximum intensity projections of PET images of (A/B) [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC and (C/D) [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC measurements from 1 to 2 h (midframe time 90 min) after single intravenous injection of the radiotracer in MPC-mCherry tumour-bearing NMRI-nude mice as control and blocked by coinjection of [Nal^3]octreotide acetate (100 µg/mouse). The images A–D are individually scaled to visualise the tumours (yellow circle) (Bl-bladder, Ki-kidney, Tu-tumour).

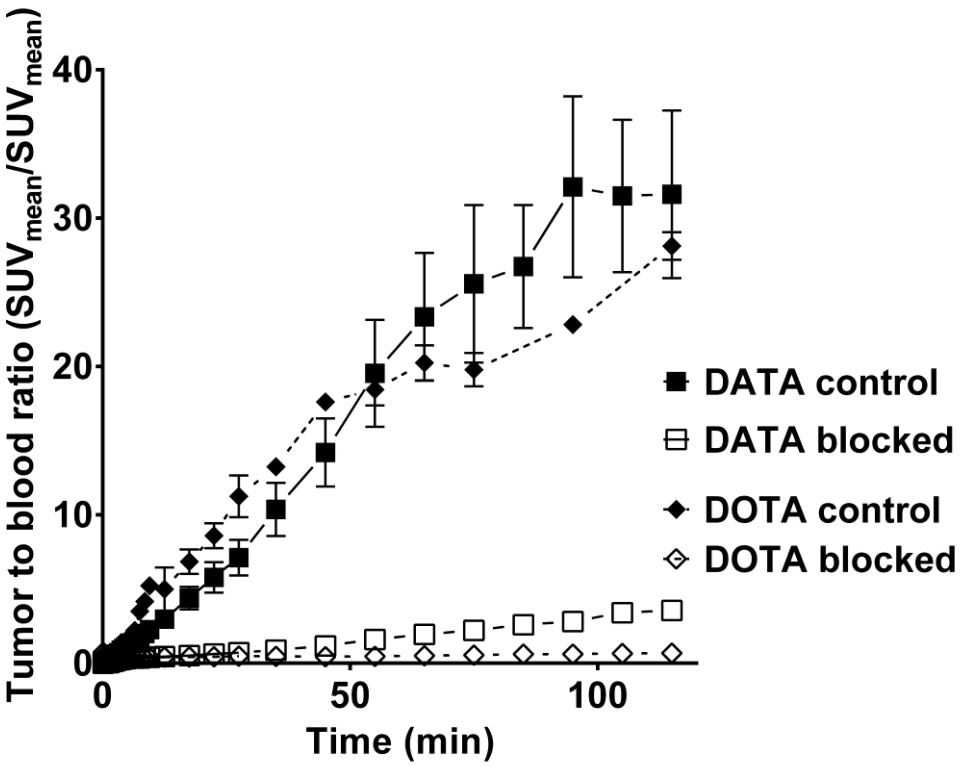


Fig 5. Tumour-to-blood ratios of [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC and [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC calculated from dynamic PET studies with two animals per group (values are mean±SEM).

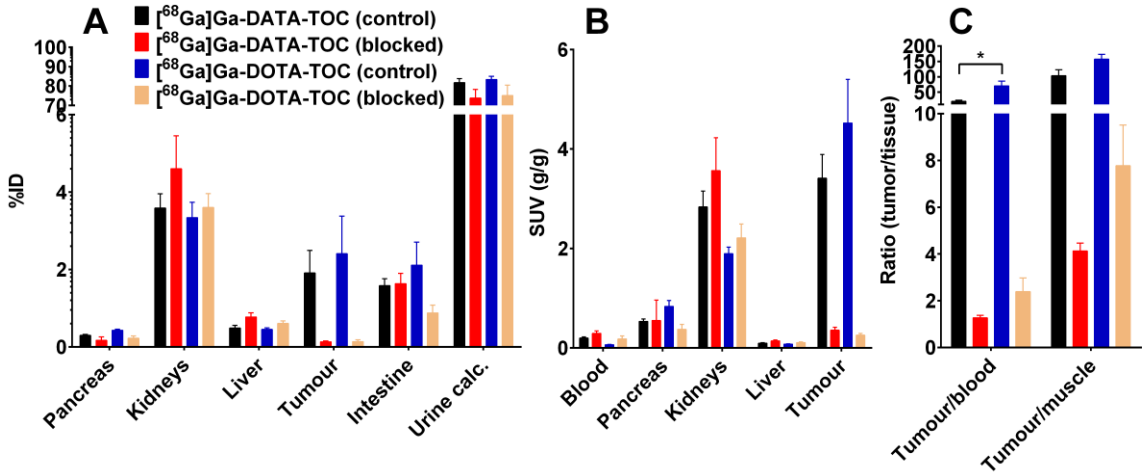


Fig 6. Biodistribution of [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC and [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC in selected organs and tissues expressed as (**A**) percent of injected activity (%ID), (**B**) SUV in g/g and (**C**) tumour-to-tissue ratios (SUV/SUV) 60 min after single intravenous injection of [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC (control n = 9, blocked n = 8) and [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC (control n = 5, blocked n = 7) in MPC-mCherry tumour-bearing NMRI-nude mice; blocked animals additionally received 100 µg/mouse [Nal^{3}]octreotide acetate together with the radiotracer.

Biodistribution of [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC and [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC in subcutaneous MPC-mCherry tumour-bearing mice was analyzed at 1 h pi (Figure 6, tabular results are presented in the Supporting Information in Tables S1 and S2) for quantitative comparison of tumour accumulation, distribution and elimination in control and blocked state. The tumour uptake of both [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC and [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC at 1 h after injection was in the same range with SUVs of 3.41±1.43 and 4.52±1.96 (P=0.2838), respectively. The higher blood concentration of the [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC (0.19±0.08 SUV) in comparison to [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC (0.06±0.01 SUV; P<0.01) resulted in a lower tumour-to-blood ratio 20.2±11.9 vs. 70.5±34.3; P<0.01. However, the tumour-to-muscle ratios for both radiotracers were not statistically different with 103.0±57.2 for [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC and 157.0±34.6 for [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC (P=0.1027). A significant difference was the higher uptake of [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC in the pancreas with 0.836±0.267 SUV compared to [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC with 0.534±0.152 SUV, P<0.05. The simultaneous injection of excess [Nal^{3}]octreotide distinctly blocked the tumour accumulation of both radiotracers. The resulting activity concentrations were not different with 0.358±0.169 SUV [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC and 0.256±0.094 SUV [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC, P=0.2145. The [Nal^{3}]octreotide acetate injection decreased also the accumulation of the [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC in the pancreas from 0.836±0.267 to 0.374±0.268 SUV, P<0.05. On the other hand the uptake of [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC increased in the spleen by coinjection of excess [Nal^{3}]octreotide. Both radiotracers were predominantly excreted via the kidneys in comparable fractions with 85.3±7.4 %ID of the [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC and 86.6±4.7 %ID of the [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC that were not influenced by excess [Nal^{3}]octreotide coinjection. The hepatobiliary excretion of both radiotracers was low and comparable with 2.07±0.72 %ID ([^{68}Ga]Ga-DATA-TOC) and 2.76±1.15 %ID ([^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC), respectively. The elimination of [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC via the liver was found decreased by excess [Nal^{3}]octreotide injection to 1.36±0.63 %ID.

Patient Study

Compared with [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC PET/CT before PRRT, post-PRRT [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC PET/CT demonstrated partial disease remission according to molecular imaging criteria (65% decrease of uptake in the primary pancreatic tumour based on the target-to-pituitary ratio). PET/CT with [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC, performed 24 h later at the same time post tracer injection, demonstrated a similar, very intense hSST_2-expression in the primary pancreatic tumour (Figure 2). Preeminent was the relatively low uptake in normal liver (Table 1) in comparison to [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC.

TABLE 1 Comparison of SUVs between [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC and [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC in 46-year-old male patient with a well-differentiated NET in the body and tail of the pancreas

Location	SUV	
	[^{68}Ga]Ga-DATA-TOC	**[^{68}Ga]Ga -DOTA-TOC**
Target lesion	46.9	71.1
Liver	9.1	23.1
Ratio (target-to-liver)	5.2	3.1
Pituitary	14.6	23.7
Ratio (target-to-pituitary gland)	3.2	3.0

Discussion

The newly presented bifunctional DATA chelator and its conjugate to TOC, DATA-TOC, showed the potential to establish an instant kit-type labelling routine of clinically relevant vectors with ^{68}Ga [23, 33]. To show that the DATA chelator does not negatively affect the receptor affinity and the *in vivo* performance of the targeting vector, [$^{68/nat}$Ga]Ga-DATA-TOC was evaluated in a series of *in vitro*- and *in vivo*-studies and directly compared with [$^{68/nat}$Ga]Ga-DOTA-TOC.

Radiolabelling with ^{68}Ga for animal studies was completed quantitatively at 25 °C for DATA-TOC, whereas for DOTA-TOC a higher temperature was required to achieve comparable labelling efficiency. This finding corroborates previously reported radiochemical data for convenient instant kit-type labelling of DATA-TOC with ^{68}Ga [23]. It should be stressed that upscaling the radiolabelling for animal experiments (in average 555 MBq/15 mCi on 20 nmol precursor at start of synthesis) was successfully achieved without applying temperatures higher than 25 °C.

The $hSST_2$-affinities of [^{nat}Ga]Ga-DATA-TOC and [^{nat}Ga]Ga-DOTA-TOC were found comparable with only sub-nanomolar differences in the pertinent IC_{50} values (Figure 3), revealing that the exchange of DOTA with the DATA chelator was well tolerated by the receptor-target.

Furthermore, first animal studies comparing [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC to [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC showed similar biodistribution and kinetic profiles. The uptake in the tumours was specific, reaching comparable values and following similar kinetics. The tumour accumulation of both radiotracers was blocked by [Nal^{3}]octreotide acetate to all about the same activity concentration, proving no

unspecific binding was involved. The pancreatic [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC uptake in mice was also blocked by excess [Nal^{3}]octreotide injection, supporting mSST_2 specificity of physiological uptake. The baseline uptake of the [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC in the pancreas was lower and therefore showed no significant difference between the control and blocking experiments. The tumour-to-tissue ratios during biodistribution or small animal PET were in good agreement with hSST_2-affinities of the two analogues. Similarly, the first comparison of [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC and [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC in a 46-year old NET patient showed comparable uptake in the tumour lesions. Although [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC resulted in a lower overall tumour uptake (SUV: 46.9), a significantly better tumour-to-liver ratio of 5.2 (compared to 3.1 for [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC) could be achieved, which might enable better visualisation of liver metastases [34]. The above-mentioned small animal studies as well as the first in human study showed [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC equally capable to visualise NET lesions compared to [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC. Combining these results with the *in vitro* data, the chelator-switch from DOTA to DATA did not affect the biological efficiency of the radioligand, while improving the labelling with ^{68}Ga. Thus, this proof-of-principle study demonstrated the practical advantages of DATA for instant kit-type labelling without negatively affecting the efficacy of the forming radioligand. While the instant kit-type labelling is no *chemical* challenge for peptides like TOC, there are *technical* issues of an instant kit-type labelling protocol, which make routine synthesis of those ^{68}Ga-labelled radiopharmaceuticals more easy and efficient in the clinical routine. There is no need of heating modules and due to the quantitative labelling yields there may be no need for purification procedures.

As a future perspective, the instant-kit type labelling of DATA-based molecular vectors will be broadened to include other medically interesting molecules, such as antibody fragments. In this case the development of instant kit-type chelators, like DATA, becomes mandatory in view of the low temperature and pH >5 radiolabelling restrictions.

Conclusion

Clinical translation of [$^{68/nat}$Ga]Ga-DATA-TOC achieved results similar to [$^{68/nat}$Ga]Ga-DOTA-TOC in preclinical receptor affinity and animal experiments as well as in a first-in-human study, yet maintaining the considerable advantage of fast radiolabelling under mild and instant-kit conditions (pH 4.5 – 6 and 25 °C). This advantage reveals the DATA chelator as a promising tool for ^{68}Ga-radiolabelling of heat- and/or pH-sensitive vectors and towards convenient, quick and reliable access to modern PET ^{68}Ga-radiopharmaceuticals in a clinical setting.

Compliance with ethical standards

Ethical approval Written informed consent was obtained from the patient in accordance with paragraph 37 of the updated Declaration of Helsinki, "Unproven Interventions in Clinical Practice", and in accordance with the German Medical Products Act AMG §13 2b. All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed, in particular were all animal experiments carried out according to the guidelines of German Regulations for Animal Welfare and have been approved by the Landesdirektion Dresden.

Conflicts of interest The authors declare that they have no conflict of interest regarding this article.

Financing source This study was partly supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG; grants BE-2607/1-1 and 1-2 (R.B., J.P.) and within the CRC/Transregio 205/1 “The Adrenal: Central Relay in Health and Disease“ (M.U., J.P.)).

Supporting Information

Table S1. Uptake of [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC or [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC in selected organs of MPC-mCherry tumour-bearing female NMRI nu/nu mice 1 h pi (218 ± 57 MBq (11.2 nmol peptide/kg) and 441 ± 109 MBq (10.5 nmol peptide)/kg body weight, respectively; blocking after coinjection of 100 µg/mouse [NaI^{3}]octreotide acetate)); values are presented as mean %ID ± SD with P-values from *post hoc* Tukey´s multiple comparisons test indicating statistical significance between two values when P < 0.05 (only values < 0.05 displayed: P1 = control and blocked comparison for [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC; P2 = control and blocked comparison for [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC; Comparison between the [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC and the [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC values for control as P3 and blocked as P4).

%ID	**[^{68}Ga]Ga-DATA-TOC**			**[^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC**			**Comparison**	
Type	Control n=9	Blocked n=8	P1	Control n=7	Blocked n=5	P2	P3	P4
Brain	0.02±0.01	0.01±0.00		0.00±0.00	0.02±0.01			
Ovaries	0.03±0.03	0.05±0.02		0.00±0.00	0.02±0.01			
Uterus	0.17±0.31	0.13±0.08		0.02±0.00	0.08±0.02			
Pancreas	0.29±0.07	0.16±0.26		0.42±0.06	0.22±0.16		<0.05	
Spleen	0.03±0.01	0.05±0.02		0.01±0.00	0.03±0.01			
Adrenal	0.01±0.00	0.01±0.00		0.00±0.00	0.00±0.00			
Kidneys	3.58±1.11	4.60±2.41		3.34±0.87	3.60±0.95			
Heart	0.04±0.03	0.08±0.05		0.01±0.00	0.06±0.07			
Lung	0.16±0.07	0.21±0.10		0.12±0.01	0.19±0.14			
Thyroid	0.01±0.00	0.02±0.01		0.00±0.00	0.01±0.00		<0.05	
Gall bladder	0.00±0.01	0.02±0.03		0.00±0.00	0.00±0.00			
Liver	0.48±0.21	0.77±0.30	<0.05	0.45±0.09	0.60±0.16			
Femur	0.04±0.01	0.06±0.03		0.04±0.04	0.04±0.02			
Tumour	1.90±1.74	0.13±0.05	<0.05	2.40±1.94	0.13±0.12	<0.05		
Intestine	1.58±0.53	1.63±0.75		2.11±1.33	0.87±0.49			
Stomach	0.55±0.18	0.25±0.14	<0.01	1.34±0.39	0.67±0.42	<0.05	<0.001	<0.05
Urine calc.	81.7±6.26	73.7±12.6		83.3±3.73	75.0±14.2			

Table S2. Radioactivity concentration of [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC or [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC in selected organs of MPC-mCherry tumour-bearing female NMRI nu/nu mice 1 h pi (218 ± 57 MBq (11.2 nmol peptide) and 441 ± 109 MBq (10.5 nmol peptide)/kg body weight, respectively; blocking after coinjection of 100 µg/mouse [Nal^{3}]octreotide acetate); values are presented as mean SUV ± SD with P-values from *post hoc* Tukey´s multiple comparisons test indicating statistical significance between two values when P < 0.05 (only values < 0.05 displayed: P1 = control and blocked comparison for [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC; P2 = control and blocked comparison for [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC; Comparison between the [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC and the [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC values for control as P3 and blocked as P4).

SUV	**[^{68}Ga]Ga-DATA-TOC**			**[^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC**			**Comparison**	
Type	Control n=9	Blocked n=8	P1	Control n=7	Blocked n=5	P2	P3	P4
Blood	0.19±0.08	0.29±0.14		0.06±0.01	0.17±0.16		<0.01	
BAT	0.08±0.04	0.15±0.08		0.03±0.01	0.10±0.06			
Skin	0.19±0.13	0.31±0.17		0.09±0.01	0.21±0.12			
Brain	0.01±0.01	0.01±0.00		0.00±0.00	0.01±0.00			
Ovaries	0.16±0.13	0.20±0.11		0.03±0	0.13±0.22			
Uterus	0.24±0.36	0.18±0.07		0.05±0	0.21±0.15			
Pancreas	0.53±0.15	0.55±1.16		0.83±0.26	0.37±0.26	<0.05	<0.05	
Spleen	0.06±0.02	0.11±0.03	<0.05	0.04±0.01	0.06±0.03			
Adrenals	0.19±0.14	0.19±0.07		0.09±0.10	0.16±0.18			
Kidneys	2.83±0.95	3.56±1.87		1.89±0.29	2.21±0.74			
WAT	0.04±0.14	0.38±0.72		0.04±0.02	0.06±0.02			
Muscle	0.04±0.04	0.09±0.05		0.03±0.01	0.05±0.05			
Heart	0.09±0.05	0.14±0.09		0.03±0.00	0.09±0.11			
Lung	0.20±0.08	0.29±0.15		0.16±0.03	0.22±0.13			
Liver	0.09±0.04	0.14±0.05		0.07±0.01	0.10±0.04			
Femur	0.06±0.02	0.12±0.06		0.06±0.04	0.09±0.05			
Tumour	3.41±1.43	0.35±0.16	<0.001	4.52±1.96	0.25±0.09	<0.001		
Tumour/blood	20.2±11.9	1.26±0.30	<0.001	70.5±34.3	2.38±1.55	<0.001	<0.01	
Tumour/muscle	103.±57.2	4.12±0.96	<0.001	157.±34.6	7.77±4.61	<0.001		

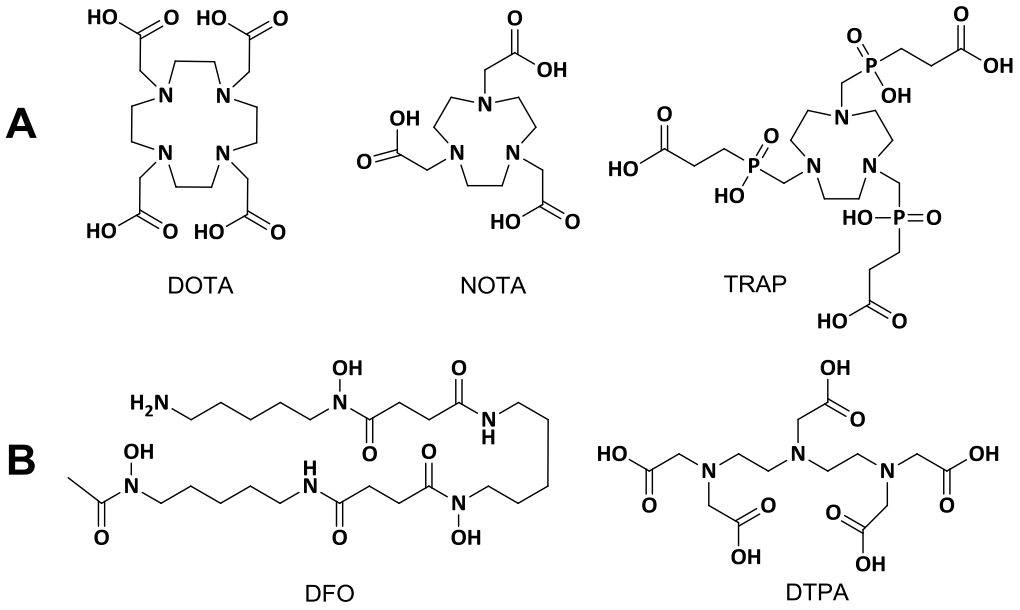


FIGURE S1 (**A**) Cyclic chelators used for ^{68}Ga: DOTA, NOTA, TRAP and (**B**) acyclic chelators used for ^{68}Ga: DFO, DTPA

References

1. Smith DL, Breeman WAP, Sims-Mourtada J. The untapped potential of Gallium 68-PET: The next wave of ^{68}Ga-agents. Appl Radiat Isot. 2013;76:14-23.

2. Boros E, Ferreira CL, Cawthray JF, et al. Acyclic chelate with ideal properties for ^{68}Ga PET imaging agent elaboration. J Am Chem Soc. 2010;132(44):15726-15733.

3. Eppard E, Wuttke M, Nicodemus PL, Rosch F. Ethanol-Based Post-processing of Generator-Derived ^{68}Ga Toward Kit-Type Preparation of ^{68}Ga-Radiopharmaceuticals. J Nucl Med. 2014;55(6):1023-1028.

4. Mueller D, Klette I, Baum RP, et al. Simplified NaCl based ^{68}Ga concentration and labeling procedure for rapid synthesis of ^{68}Ga radiopharmaceuticals in high radiochemical purity. Bioconjug Chem. 2012;23(8):1712-1717.

5. Zhernosekov KP, Filosofov D V, Baum RP, et al. Processing of generator-produced 68Ga for medical application. J Nucl Med. 2007;48(10):1741-1748.

6. Breeman WAP, De Jong M, De Blois E, et al. Radiolabelling DOTA-peptides with ^{68}Ga. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2005;32(4):478-485.

7. Graham M, Mailman J. FDA Grants Orphan Drug Designation for ^{68}Ga-DOTATOC. J Nucl Med. 2014;55(1):10N.

8. Fani M, André JP, Maecke HR. ^{68}Ga-PET: a powerful generator-based alternative to cyclotron-based PET radiopharmaceuticals. Contrast Media Mol Imaging. 2008;3(2):53-60.

9. Buchmann I, Henze M, Engelbrecht S, et al. Comparison of ^{68}Ga-DOTATOC PET and ^{111}In-DTPAOC (Octreoscan) SPECT in patients with neuroendocrine tumours. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2007;34(10):1617-1626.

10. Tran K, Khan S, Taghizadehasl M, et al. Gallium-68 dotatate PET/CT is superior to other imaging modalities in the detection of medullary carcinoma of the thyroid in the presence of high serum calcitonin. Hell J Nucl Med. 2015;18(1):19-24.

11. Mukherjee A, Pandey U, Chakravarty R, Sarma H, Dash A. Single vial kit formulation for preparation of PET radiopharmaceutical: ^{68}Ga-DOTA-TOC. J Radioanal Nuc Chem. 2014;302:1253-1258.

12. Notni J, Šimeček J, Hermann P, Wester HJ. TRAP, a powerful and versatile framework for gallium-68 radiopharmaceuticals. Chem - A Eur J. 2011;17(52):14718-14722.

13. Wangler C, Wangler B, Lehner S, et al. A Universally Applicable ^{68}Ga-Labeling Technique for Proteins. J Nucl Med. 2011;52(4):586-591.

14. Rösch F. Past, present and future of ^{68}Ge/^{68}Ga generators. Appl Radiat Isot. 2013;76:24-30.

15. Fani M, Tamma ML, Nicolas GP, et al. In vivo imaging of folate receptor positive tumor xenografts using novel ^{68}Ga-NODAGA-folate conjugates. Mol Pharm. 2012;9:1136-1145.

16. Simecek J, Zemek O, Hermann P, Wester HJ, Notni J. A Monoreactive Bifunctional Triazacyclononane Phosphinate Chelator with High Selectivity for Gallium-68. ChemMedChem. 2012;7:1375-1378.

17. Boros E, Ferreira CL, Yapp DTT, et al. RGD conjugates of the H_2dedpa scaffold: Synthesis, labeling and imaging with ^{68}Ga. Nucl Med Biol. 2012;39(6):785-794.

18. Berry DJ, Ma Y, Ballinger JR, et al. Efficient bifunctional gallium-68 chelators for positron emission tomography: tris(hydroxypyridinone) ligands. Chem Commun (Camb). 2011;47(25):7068-7070.

19. Eder M, Wängler B, Knackmuss S, et al. Tetrafluorophenolate of HBED-CC: A versatile conjugation agent for ^{68}Ga-labeled small recombinant antibodies. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2008;35(10):1878-1886.

20. Tsionou MI, Knapp CE, Foley CA, et al. Comparison of macrocyclic and acyclic chelators for gallium-68 radiolabelling. RSC Adv. 2017;7(78):49586-49599.

21. Waldron BP, Parker D, Burchardt C, et al. Structure and stability of hexadentate complexes of ligands based on AAZTA for efficient PET labelling with gallium-68. Chem Commun (Camb). 2013;49:579-581.

22. Parker D, Waldron BP. Conformational analysis and synthetic approaches to polydentate perhydro-diazepine ligands for the complexation of gallium(III). Org Biomol Chem. 2013;11(17):2827.

23. Seemann J, Waldron B, Parker D, Roesch F. DATATOC: a novel conjugate for kit-type ^{68}Ga labelling of TOC at ambient temperature. EJNMMI Radiopharm Chem. 2017;1(1):4.

24. Ullrich M, Bergmann R, Peitzsch M, et al. Multimodal Somatostatin Receptor Theranostics Using [^{64}Cu]Cu-/[^{177}Lu]Lu-DOTA-(Tyr(3))octreotate and AN-238 in a Mouse Pheochromocytoma Model. Theranostics. 2016;6(5):650-665.

25. Ullrich M, Bergmann R, Peitzsch M, et al. In vivo fluorescence imaging and urinary monoamines as surrogate biomarkers of disease progression in a mouse model of pheochromocytoma. Endocrinology. 2014;155(11):4149-4156.

26. Kilian T-M, Klöting N, Bergmann R, et al. Rational Design of Dual Peptides Targeting Ghrelin and Y2 Receptors to Regulate Food Intake and Body Weight. J Med Chem. 2015:4180-4193.

27. Chollet C, Bergmann R, Pietzsch J, Beck-Sickinger AG. Design, evaluation, and comparison of ghrelin receptor agonists and inverse agonists as suitable radiotracers for PET imaging. Bioconjug Chem. 2012;23(4):771-784.

28. Tatsi A, Maina T, Cescato R, et al. [^{111}In-DOTA]Somatostatin-14 analogs as potential pansomatostatin-like radiotracers - first results of a preclinical study. EJNMMI Res. 2012;2(1):25.

29. Maina T, Nock B, Nikolopoulou A, et al. [^{99m}Tc]Demotate, a new ^{99m}Tc-based [Tyr_3]octreotate analogue for the detection of somatostatin receptor-positive tumours: Synthesis and preclinical results. Eur J Nucl Med. 2002;29(6):742-753.

30. Maina T, Cescato R, Waser B, et al. LTT-SS28, a first pansomatostatin radioligand for in vivo targeting of somatostatin receptor-positive tumors. J Med Chem. 2014;57(15):6564-6571.

31. Powers JF, Evinger MJ, Tsokas P, et al. Pheochromocytoma cell lines from heterozygous neurofibromatosis knockout mice. Cell Tissue Res. 2000;302(3):309-320.

32. Patel YC, Srikant CB. Subtype selectivity of peptide analogs for all five cloned human somatostatin receptors ($hsstr_{1-5}$). Endocrinology. 1994;135(6):2814-2817.

33. Seemann J, Waldron BP, Roesch F, Parker D. Approaching “kit-type” labelling with ^{68}Ga: The DATA chelators. ChemMedChem. 2015;10(6):1019-1026.

34. Wild D, Fani M, Fischer R, et al. Comparison of Somatostatin Receptor Agonist and Antagonist for Peptide Receptor Radionuclide Therapy: A Pilot Study. J Nucl Med. 2014;55(8):1248-1252.

4.2 Novel bifunctional DATA chelator for quick access to site-directed PET ^{68}Ga-radiotracers: Preclinical proof-of-principle with [Tyr^3]octreotide

B. A. Nock [1], A. Kaloudi[1], J. Nagel[2], J.-P. Sinnes[2], F. Rösch[2], T. Maina[1]

[1]Molecular Radiopharmacy, INRASTES, NCSR "Demokritos", GR-15310 Athens, Greece

[2]Institute of Nuclear Chemistry, Johannes Gutenberg-University of Mainz, D-55126 Mainz, Germany

Published in Dalton Transactions, Issue 42, 2017

Doi: 10.1039/C7DT01684K

ABSTRACT

Molecular imaging of tumors with the PET radionuclide ^{68}Ga has gained momentum in clinical oncology due to the expanding availability of commercial ^{68}Ge/^{68}Ga-generators in combination with state-of-the-art PET/CT and PET/MRI hybrid imaging systems. Concurrently, interesting peptide-based or small-size vectors have been developed for theranostic use in cancer patients. Owing to the short half-life of ^{68}Ga ($t_{1/2}$=67.7 min) and the sensitivity of many targeting biomolecules, labeling and kit reconstitution in mild conditions allowing for quick access to ready-for-injection PET-tracers are highly desirable. The novel DATA^{5M} ((6-pentanoic acid)-6-(amino(methyl))-1,4-diazepinetriacetate) chelator previously showing pro-mising qualities for kit type labeling, was coupled to TOC ([Tyr^3]octreotide). We herein report results from a first proof-of-principle study directly comparing of [^{67}Ga]Ga-DATA-TOC with the well-established [^{67}Ga]Ga-DOTA-TOC in a series of preclinical models. Both analogs were shown to be sst_2-preferring and specifically internalized in AR42J and HEK293-$hsst_2$ cells, with [^{67}Ga]Ga-DOTA-TOC internalizing faster in both cell lines. Similarly, after injection in mice bearing either AR42J or HEK293-$hsst_2$ tumors, both tracers efficiently and specifically localized in the implants. Whereas [^{67}Ga]Ga-DOTA-TOC exhibited higher tumor values, [^{67}Ga]Ga-DATA-TOC cleared faster from background tissues. These findings support the suitability of newly introduced bifunctional chelator DATA^{5m} as reliable, quick and convenient means for labeling of medically relevant vectors with the PET radiometal ^{68}Ga.

Keywords: Gallium-67, Octreotide, DATA-TOC, DOTA-TOC, Somatostatin,

INTRODUCTION

Recent advances in the field of nuclear medicine involve the use of peptide-based vectors radiolabelled with diagnostic (suitable for SPECT or PET imaging) or particle emitting radiometals (suitable for radionuclide therapy) in an integrated theranostic approach, allowing for personalized management of cancer patients [1–5]. Molecular imaging of tumors with the PET radionuclide ^{68}Ga has gained momentum in clinical oncology due to the expanding availability of commercial ^{68}Ge/^{68}Ga-generators in combination with state-of-the-art PET/CT and PET/MRI hybrid imaging systems [6–10]. Furthermore, functionalization of clinically relevant vectors with the universal chelator DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid) has facilitated labeling of the same radiopharmaceutical-precursor with theranostic radiometal pairs, such as ^{68}Ga and ^{177}Lu or ^{90}Y for PET imaging and radionuclide therapy, respectively [11]. In this respect, the recent approval by FDA of [^{68}Ga/^{177}Lu]Ga/Lu-DOTA-TATE (TATE: DPhe-c[Cys-Tyr-DTrp-Lys-Thr-Cys]-Thr-OH) as a theranostic pair in the management of neuroendocrine tumors (NETs) represents a significant success.

The application of ^{68}Ga-based PET radiotracers in the clinic will be further propagated by the availability of freeze-dried formulations of the radiopharmaceutical precursor, “kits”, in analogy to the widely popular ^{99m}Tc-kits dominating diagnostic nuclear medicine in the previous decades. Owing to the short half life of ^{68}Ga ($t_{1/2}$=67.7 min) on one hand and the sensitivity of many targeting biomolecules on the other, labeling and kit reconstitution at ambient temperature to quickly provide a ready-for-injection ^{68}Ga-radiotracer are highly desirable. For such purposes, chelators other than DOTA would be preferable for ^{68}Ga-labeling, especially when taking into account a few recent findings. First, the distinct coordination chemistries of Ga and Lu with DOTA have often led to significant differences in biological responses, especially with regards to pharmacokinetics, tumor targeting efficacy and retention [11]. Then, accumulating experience has shown that diagnostic imaging and radionuclide therapy may be best served by a pair of a diagnostic and a therapeutic version of the vector, each addressing distinct application requirements [12,13].

As a result, several new chelators more appropriate for ^{68}Ga-labeling of clinically attractive vectors have been introduced over the past few years. These predominantly display either acyclic behavior, associated with better labeling kinetics (e.g. DFO, deferoxamine), or cyclic characteristics, resulting in higher thermodynamic stability of the forming metal-chelate (e.g. NOTA, 1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid) [11,14–23]. In an innovative approach, chimeric-type tri-anionic chelators have been lately introduced, based on the 6-amino-1,4-diazepine-triacetic acid (DATA)-scaffold and exhibiting both cyclic and acyclic features [24–26]. The novel DATA chelators have shown promising properties for kit-type labeling of state-of-the-art ^{68}Ga-radiopharmaceuticals over existing alternatives, because they allow for fast and quantitative labeling within a wider

labeling pH range at ambient temperature. Furthermore, the forming ^{68}Ga-chelates are stable towards trans-chelation (DTPA and apo-transferrin) and trans-metalation (Fe^{III}).

In a next critical step, the first bifunctional pro-chelator DATA^{5M}-(^{t}Bu)$_3$ (5-[1,4-Bis-*tert*-butoxycarbonyl-methyl-6-(*tert*-butoxycarbonylmethylmethylamino)-[1,4]diazepan-6-yl]-pentanoic acid) was developed for convenient conjugation to selected primary amines of clinically interesting vectors. As a first paradigm, DATA^{5M}-(^{t}Bu)$_3$ was coupled to the primary amine of DPhe^{1} of [Tyr^{3}]octreotide (TOC, DPhe-c[Cys-Tyr-DTrp-Lys-Thr-Cys]-Thr-ol) to yield DATA-TOC. Excessive study on the ^{68}Ga-labeling of DATA-TOC has shown that a high quality radiopharmaceutical can be prepared in excellent radiochemical yield from a lyophilized solid at room temperature and within a short time that does not require post-labeling purification to meet pharmacopeia standards [26,27].

In the present preclinical proof-of-principle study we aimed to further explore the suitability of the new semi-cyclic bifunctional chelator DATA for ^{68}Ga-labeling of clinically interesting vectors. For this purpose, the effects of the new coordination chemistry on the responses of the resulting radiopharmaceutical in the biological milieu were investigated for the first time using as paradigm-vector the somatostatin receptor subtype 2 (sst2)-specific TOC. Specifically, the biological profiles of [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC and the well-established [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC [10,28] (figure 1) were directly compared in a series of *in vitro* and *in vivo* models using the respective surrogates labeled with longer-lived and practically more convenient ^{67}Ga ($t_{1/2}$=3.3 d).

RESUTLS AND DISSCUSION

Ligands and Radioligands

The DATA pro-chelator DATA^{5M}-3^{t}Bu was synthesized and coupled to TOC, as previously described [26,27]. The [^{67}Ga]Ga-DATA-TOC and [^{67}Ga]Ga-DOTA-TOC surrogates were used for convenience in all biological evaluations in AR42J and HEK-293-hsst$_x$ (x: 2, 3 and 5) cells and tumor-bearing mice [29], in view of the longer half life of the gamma emitter ^{67}Ga ($t_{1/2}$=3.3 d) compared to ^{68}Ga ($t_{1/2}$=67.7 min). Labeling with ^{67}Ga was quantitative after 15 min at room temperature (pH 4.0) for DATA-TOC and after 30 min at 90 ^{o}C (pH 4.0) for DOTA-TOC at a specific activity 3.7 MBq/nmol, as verified by radioanalytical HPLC. Both radiotracers were used in all subsequent biological experiments without further purification.

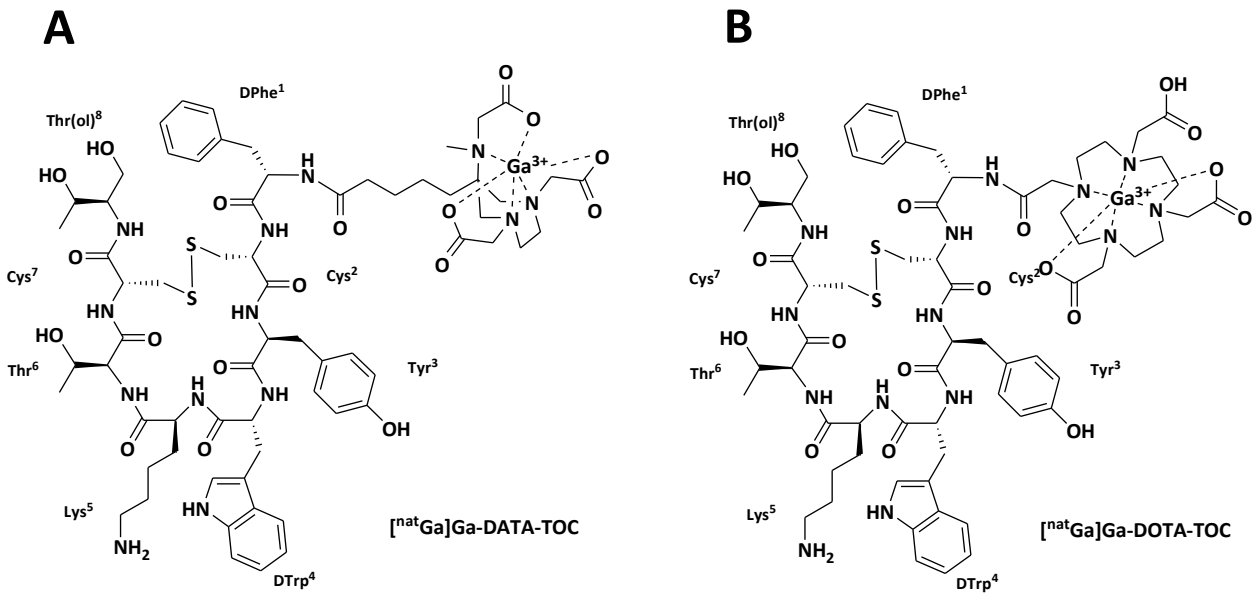


Figure 1: Chemical structure of [^{nat}Ga]Ga-DATA-TOC (**A**) and [^{nat}Ga]Ga-DOTA-TOC (**B**)

In Vitro Comparison of [^{67}Ga]Ga-DATA-TOC and [^{67}Ga]Ga-DOTA-TOC

The binding affinity of the ^{nat}Ga-peptide conjugates for the hsst$_2$ has been determined by competition binding assays against the pansomatostatin radioligand [^{125}I-Tyr^{25}]LTT-SS28 in HEK293-hsst$_2$ cell membranes using LTT-SS28 (H-Ser-Ala-Asn-Ser-Asn-Pro-Ala-Leu-Ala-Pro-Arg-Glu-Arg-Lys-Ala-Gly-c[Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-DTrp-Lys-Thr-Tyr-Thr-Ser-Cys]-OH) as a pansomatostatin reference [30–32]. The *IC$_{50}$* values measured previously from these assays were 1.03±0.08 nM for [^{nat}Ga]Ga-DATA-TOC, 0.21±0.01 nM for [^{nat}Ga]Ga-DOTA-TOC and 0.05±0.01 nM for LTT-SS28 [33]. It should be noted that

LTT-SS28 displayed sub-nM affinity also for $hsst_3$ (IC_{50}=0.09±0.01 nM) and $hsst_5$ (IC_{50}=0.17±0.03 nM), determined in HEK293-$hsst_3$ and HEK293-$hsst_5$ cell membranes. In contrast, [^{nat}Ga]Ga-DATA-TOC and [^{nat}Ga]Ga-DOTA-TOC were found to be $hsst_2$-prefering, showing indistinguishable specific from non-specific binding in the concentration range applied.

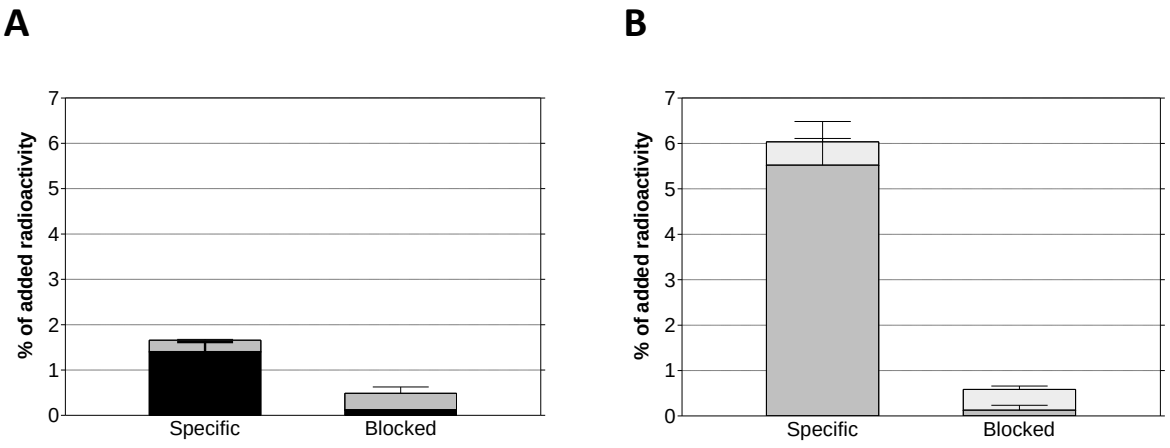


Figure 2: Percentage of cell-associated vs. total-added radioactivity, comprising internalized (solid bars) and membrane-bound fractions (checkered bars) after 1 h incubation at 37 °C of (**A**) [^{67}Ga]Ga-DATA-TOC and (**B**) [^{67}Ga]Ga-DOTA-TOC in AR42J cells; results represent average of two independent experiments performed in triplicate±sd; the first bars in each diagram represent specific values, followed by lower bars of non-specific values determined in the presence of excess TATE (1 µM).

The internalization and overall cell-binding capacity of [^{67}Ga]Ga-DATA-TOC and [^{67}Ga]Ga-DOTA-TOC were compared in AR42J cells spontaneously expressing the rat sst_2 [34] as well as in HEK293-$hsst_x$ cells (x: 2, 3 and 5) during 1 h incubation at 37 °C. As shown in figure 2, within this period the percentage of AR42J cell-bound activity reached 1.66±0.19 % for [^{67}Ga]Ga-DATA-TOC, while for [^{67}Ga]Ga-DOTA-TOC this value was 6.04±1.03 % (P<0.05). In both cases the bulk of cell-bound radioactivity was found within the cells with a small fraction still found on the cell membrane, as consistent with a receptor-agonist profile. In the presence of excess TATE in the medium cell-binding was 0.49±0.14 % and 0.59±0.17 %, respectively, suggesting an sst_2-mediated process.

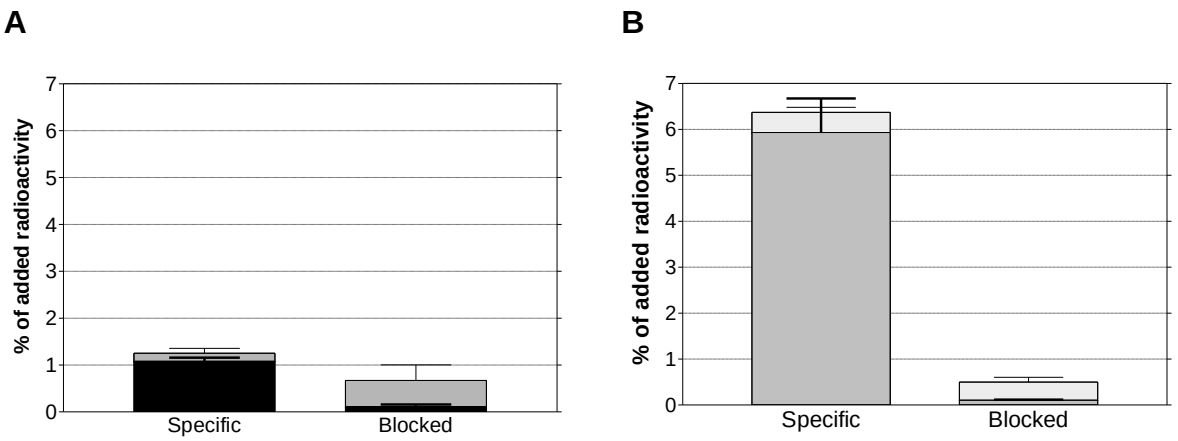


Figure 3: Percentage of cell-associated vs. total-added radioactivity, comprising internalized (solid bars) and membrane-bound fractions (checkered bars) after 1 h incubation at 37 °C of (**A**) [^{67}Ga]Ga-DATA-TOC and (**B**) [^{67}Ga]Ga-DOTA-TOC in HEK293-hsst$_2$ cells; results represent average of four independent experiments performed in triplicate±sd; the first bars in each diagram represent specific values, followed by lower bars of non-specific values determined in the presence of excess TATE (1 µM).

A very similar pattern was acquired from the same series of experiments in HEK293-hsst$_2$ cells. As shown in figure 3, the percentage of cell-associated activity of [^{67}Ga]Ga-DATA^{5M}-TOC amounted to 1.23±0.16 %, while again [^{67}Ga]Ga-DOTA-TOC well surpassed this value with 6.34±0.78 % (P<0.05). The bulk of radioactivity was found internalized in the cells, whereas overall cell-binding was banned in the presence of excess TATE in the medium. It should be noted that in the case of HEK293-hsst$_3$ or HEK293-hsst$_5$ cells, specific cell-binding was indistinguishable from non-specific (in the presence of 1 µM KE108: Tyr-c[D-diaminobutyric acid-Arg-Phe-Phe-DTrp-Lys-Thr-Phe]) [35] for either radioligand. This finding is in line with the lack of measurable binding affinity for the hsst$_3$ or hsst$_5$ of the two metalated peptide-conjugates, assessed during competition binding assays in the respective cell membranes.

Comparative Biodistribution of [^{67}Ga]Ga-DATA-TOC and [^{67}Ga]Ga-DOTA-TOC in Tumor-Bearing Mice

The tissue distribution of [^{67}Ga]Ga-DATA^{5M}-TOC and [^{67}Ga]Ga-DOTA-TOC was compared in male SCID mice bearing subcutaneous AR42J tumors or HEK293-hsst$_2$ xenografts. No further biodistribution experiments were performed in mice bearing HEK293-hsst$_3$ or HEK293-hsst$_5$ xenografts due to the lack of hsst$_3$/hsst$_5$-affinity displayed by the metalated peptide-conjugates as well as due to the inability of either ^{67}Ga-radioligand to specifically bind to HEK293-hsst$_3$ or HEK293-hsst$_5$ cells *in vitro*.

Table 1: Comparative biodistribution data of [^{67}Ga]Ga-DATA-TOC and [^{67}Ga]Ga-DOTA-TOC in AR42J tumor-bearing SCID mice at 1 h and 4 h p.i.; a: For *in vivo* sst$_2$-blockade 50 nmol TATE were co-injected together with the radioligand and this group included 3 animals in total; b: *in vivo* sst$_2$-blockade mice groups not included.

%ID/g tissue±sd, n=5

Organs	[^{67}Ga]Ga-DATA-TOC			[^{67}Ga]Ga-DOTA-TOC	
	1 h	4 h	4 h+ TATE[a]	1 h	4 h[b]
Blood	1.13±0.19	0.42±0.04	0.56±0.05	0.67±0.13	0.12±0.01
Liver	0.73±0.08	0.46±0.05	0.51±0.08	0.89±0.12	0.75±0.02
Heart	0.54±0.10	0.20±0.03	0.20±0.04	0.53±0.11	0.19±0.03
Kidneys	12.62±2.72	7.21±1.83	9.38±0.70	10.83±2.39	10.97±3.30
Stomach	4.21±0.91	3.48±0.68	0.51±0.12	11.25±1.60	7.47±1.62
Intestines	2.11 ±0.16	2.62±0.40	0.65±0.09	3.66±0.34	3.57±0.54
Spleen	0.91±0.15	0.61±0.12	0.47±0.11	1.65±0.26	1.24±0.54
Muscle	0.22±0.07	0.06±0.03	0.06±0.01	0.16±0.04	0.06±0.02
Femur	0.86±0.13	0.61±0.04	0.62±0.05	0.76±0.20	0.43±0.10
Pancreas	3.50±0.79	1.00±0.17	0.27±0.05	11.92±2.79	5.61±0.83
Tumor	**22.31±1.87**	**15.10±1.98**	**0.76±0.09**	**37.10±10.37**	**33.62±7.56**

Biodistribution data in AR42J tumor-bearing mice is summarized in table 1. Thus, [^{67}Ga]Ga-DATA-TOC showed a high tumor uptake of 22.31±1.87 %ID/g at 1 h p.i., declining to 15.10±1.98 %ID/g at 4 h p.i. Tumor values dropped to as low as 0.76±0.09 %ID/g at 4 h p.i. after coinjection of 50 nmol TATE, as expected for a sst$_2$-specific uptake. The corresponding values for [^{67}Ga]Ga-DOTA-TOC in the AR42J tumors were higher, reaching 37.10±10.37 %ID/g at 1 h p.i. and 33.62±7.56 %ID/g at 4 h p.i. This finding is in line with the faster internalization rate of [^{67}Ga]Ga-DOTA-TOC *vs*. [^{67}Ga]Ga-DATA-TOC in AR42J cells observed *in vitro*. Both tracers cleared rapidly from background tissues predominantly via the kidneys and the urinary tract. It should be noted that [^{67}Ga]Ga-DATA-TOC cleared more rapidly from most physiological tissues than [^{67}Ga]Ga-DOTA-TOC, showing lower radioactivity levels e.g. in the pancreas, the stomach and in the kidneys.

Table 2: Comparative biodistribution data of [^{67}Ga]Ga-DATA-TOC and [^{67}Ga]Ga-DOTA-TOC in HEK293-hsst$_2$ xenograft-bearing SCID mice at 1 h and 4 h p.i.; a: For *in vivo* sst$_2$-blockade 50 nmol TATE were co-injected together with the radioligand and this group included 3 animals in total; b: *in vivo* sst$_2$-blockade mice groups not included

%ID/g tissue±sd, n=5

Organs	[^{67}Ga]Ga-DATA-TOC			[^{67}Ga]Ga-DOTA-TOC	
	1 h	4 h	4 h+ TATE[a]	1 h	4 h[b]
Blood	1.11±0.29	0.40±0.05	0.70±0.05	0.66±0.21	0.10±0.02
Liver	0.66±0.10	0.43±0.10	0.54±0.09	0.77±0.16	0.40±0.01
Heart	0.52±0.16	0.19±0.03	0.25±0.06	0.50±0.14	0.17±0.02
Kidneys	15.45±2.71	6.35±1.39	14.11±1.91	12.47±2.76	9.73±1.82
Stomach	2.96±0.94	2.35±0.69	0.19±0.03	12.30±2.88	7.89±2.39
Intestines	1.59 ±0.28	2.12±0.60	0.99±0.15	3.08±0.69	3.68±0.44
Spleen	1.04±0.37	0.50±0.09	0.41±0.07	1.99±0.57	1.32±0.06
Muscle	0.17±0.05	0.07±0.04	0.08±0.01	0.15±0.05	0.06±0.04
Femur	0.81±0.18	0.77±0.07	0.55±0.04	1.21±0.73	1.09±0.12
Pancreas	2.42±0.64	0.63±0.10	0.21±0.02	9.89±2.21	4.45±0.22
Tumor	**18.78±5.91**	**11.79±3.04**	**0.60±0.12**	**25.69±9.38**	**20.85±5.60**

The respective biodistribution data for [^{67}Ga]Ga-DATA-TOC and [^{67}Ga]Ga-DOTA-TOC in SCID mice bearing HEK293-hsst$_2$ xenografts are included for comparison in table 2 for the 1 h and 4 h p.i. time intervals. Similarly, [^{67}Ga]Ga-DATA-TOC showed a high uptake of 18.78±5.91 %ID/g at 1 h p.i., declining to 11.79±3.04 %ID/g at 4 h p.i. in the HEK293-hsst$_2$ xenografts. This uptake dropped to as low as 0.60±0.12 %ID/g at 4 h after coinjection of 50 nmol TATE, suggesting again hsst$_2$-specific accumulation. The corresponding values for [^{67}Ga]Ga-DOTA-TOC in the HEK293-hsst$_2$ xenografts were likewise higher, reaching 25.69±9.38 %ID/g at 1 h p.i. and 20.85±5.60 %ID/g at 4 h p.i. Differences in the uptake of [^{67}Ga]Ga-DATA-TOC and [^{67}Ga]Ga-DOTA-TOC in HEK293-hsst$_2$ xenografts in mice were in line with differences observed during the *in vitro* internalization and overall cell-binding of the two radiotracers in HEK293-hsst$_2$ cells.

It should be noted that in both AR42J and HEK293-hsst$_2$ tumor models, differences of tumor uptake between [^{67}Ga]Ga-DATA-TOC and [^{67}Ga]Ga-DOTA-TOC were statistically significant despite the rather broad variation of individual values. The latter may be attributed to variations in tumor size, growth-rate and vascularization as well as to the inconsistent extent of necrotic areas across tumors. Undesirable deviations of uptake were observed as a result of tumor non-homogeneity, even though double-tumors were induced in five animals per time point for each analog. This allowed for including a total number of 10 tumors in uptake-calculations to improve statistics. Interestingly, broad tumor uptake differences could be observed as well between tumors grown in the same animal. Of particular interest is the fact that [^{67}Ga]Ga-DATA-TOC showed considerably high and sst$_2$-

specific uptake in both AR42J and HEK293-hsst$_2$ tumor models, although localization was found lower in comparison to [^{67}Ga]Ga-DOTA-TOC. On the other hand, [^{67}Ga]Ga-DATA-TOC consistently displayed lower accumulation in several physiological tissues, including kidneys, liver, intestines, stomach and pancreas (tables 1 and 2). These findings are in agreement with first results acquired from a NET patient of an ongoing clinical comparison of [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC and [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC, revealing higher tumor-to-background ratios for [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC during PET/CT [33]. It should be expected that introduction of suitable linkers will further improve the in vivo tumor targeting and overall pharmacokinetics of ^{68}Ga-DATA-derivatized TOC-analogs, as observed during the development of several peptide-radiopharmaceuticals.

CONCLUSION

In this proof-of-principle work, a first head-to-head preclinical comparison of the newly introduced [^{67}Ga]Ga-DATA-TOC with the well-established [^{67}Ga]Ga-DOTA-TOC in biological models was presented. First of all, quantitative labeling with ^{67}Ga was concluded faster and in milder conditions for [^{67}Ga]Ga-DATA-TOC than for [^{67}Ga]Ga-DOTA-TOC, corroborating previous reports. This finding bears significant consequences for the application of “kit”-like formulations for easy, fast and reproducible preparation of ^{68}Ga-radiopharmaceuticals in PET clinical units. Most importantly, it was demonstrated in a first paradigm application using TOC that after replacement of the DOTA chelator in DOTA-TOC by the new DATA chelator the interaction capacity of the end [^{67}Ga]Ga-DATA-TOC radiopharmaceutical with the sst$_2$ was highly preserved. In view of the above, it is reasonable to assume that the new DATA chelator system representing aspects of new Ga(III)-coordination chemistry can be successfully “translated” in molecular radiopharmaceutical design with attractive perspectives to promote PET imaging with ^{68}Ga in a clinical setting.

ACKNOWLEDGEMENT

This work has been partially supported by the Greek General Secretariat for Research and Technology and the European Regional Development Fund under the Action “Development Grants for Research Institutions—KRIPIS” of OPCE II (to T. M. N. and B. A. N.).

SUPPORTING INFORMATION

Ligands and Radioligands

The DATA pro-chelator DATA^{5M}-3^{t}Bu was synthesized and coupled to TOC, as previously reported [26,27]. DOTA-TOC was purchased by ABX Advanced Biochemical Compounds, GmbH, whereas LTT-SS28 and KE108 were provided by Bachem. TATE used for sst_2-blocking experiments was synthesized as previously described [32].

Lyophilized DATA^{5M}-TOC and DOTA-TOC were dissolved in HPLC-grade H_2O and 50 µL aliquots thereof were stored in Eppendorf Protein LoBind tubes at –20 °C. For labeling, $^{67}GaCl_3$ in dilute HC1 at an activity concentration of 1,100-1,500 MBq/mL was provided by IDB Holland. [^{67}Ga]Ga-DATA^{5M}-TOC and [^{67}Ga]Ga-DOTA-TOC were obtained at specific activities of ≈ 3.7 MBq/nmol peptide-conjugate. Briefly, 5 nmol of each conjugate was mixed with 17-20 MBq of $^{67}GaCl_3$; 1 M sodium acetate was used to adjust the pH of the reaction mixture to 4.0. The mixture was incubated at room temperature for 15 min for [^{67}Ga]Ga-DATA-TOC and at 90 ^{o}C for 30 min for [^{67}Ga]Ga-DOTA-TOC. Sodium EDTA (0.1 M, pH 4.0) was added to a final concentration of 1 mM to scavenge traces of "free" $^{67}Ga^{3+}$. For HPLC analysis, a Waters Chromatograph with a 600 solvent delivery system coupled to a Gabi gamma detector (Raytest RSM Analytische Instrumente GmbH) controlled by the Millennium Software was used. A Symmetry Shield RP18 (5 µm, 3.9 mm × 20 mm, Waters) cartridge column was eluted at 1 mL/min flow rate with a linear gradient of 0.1 % aqueous trifluoroacetic acid (TFA) solution and acetonitrile (MeCN), starting from 0 % MeCN with 2 % increase of MeCN/min. Under these conditions [^{67}Ga]Ga-DATA-TOC eluted with a t_r=15.1 min and [^{67}Ga]Ga-DOTA-TOC with a t_r=14.4 min.

Cell-Binding Assays with [^{67}Ga]Ga-DATA^{5M}-TOC and [^{67}Ga]Ga-DOTA-TOC

Cell Lines and Cell Culture

The rat pancreatic tumor cell line AR42J endogenously expressing the sst_2 [34] was kindly provided by S. Mather (St. Bartholomew's Hospital, London, UK) and cultured as previously described [30,32,36]. The HEK293 cell line expressing the human T7-epitope-tagged sst_2 receptor (HEK293-hsst_2) or the human sst_3 or sst_5 receptor (HEK293-hsst_3, HEK293-hsst_5) were a kind gift of S. Schultz (Jena, Germany) and were cultured as previously described [30]. All culture reagents were from Gibco BRL, Life Technologies or from Biochrom KG Seromed.

Radioligand Internalization Assays in AR42J Cells

AR42J cells were seeded in six-well plates (0.7×10^6 cells/well) and left to grow for 48 h. On the day of the experiment cells were washed twice with ice-cold internalization medium (F-12K with 1 % FBS). They were supplied with fresh medium (1.2 mL) and each of [^{67}Ga]Ga-DATA-TOC or [^{67}Ga]Ga-DOTA-TOC (150 µL, 50,000 cpm, 0.5 pmol peptide) was added per well, followed by 0.5 % BSA PBS alone (150 µL, total series) or by a 1 µM TATE solution (0.5 % BSA-PBS; 150 µL, nonspecific series). Cells were incubated at 37 °C for 60 min and incubation was interrupted by removal of the medium and rapid rinsing with ice-cold 0.5 % BSA-PBS. Cells were incubated (2x5 min) at ambient temperature in acid wash buffer (50 mM glycine in 0.1 M NaCl, pH 2.8). Supernatants were collected (membrane-bound radioligand fraction). Cells were rinsed with 0.5 % BSA-PBS, lyzed with 1 M NaOH and collected (internalized radioligand fraction). Collected fractions were measured for their radioactivity content in an automated well-type γ-counter (NaI(Tl)-3´´-crystal, Canberra Packard Auto-Gamma 5000 series model) and the percentage of internalized plus membrane-bound (specific and non-specific) fractions was calculated using the Microsoft Excel program; results represent average±sd values from 2 independent experiments conducted in triplicates.

Radioligand Internalization Assays in HEK293-sst$_{2/3/5}$ Cells

The internalization of [^{67}Ga]Ga-DATA-TOC or [^{67}Ga]Ga-DOTA-TOC was additionally studied in confluent monolayers of HEK293 cells transfected to stably express either the hsst$_2$, the hsst$_3$ or the hsst$_5$ 24 h after seeding the cells (10^6 cells/well) in poly-lysine coated six-well plates. Cells were rinsed twice with ice-cold internalization medium (DMEM Glutamax-I supplemented by 1 % (v/v) FBS). Fresh medium was added (1.2 mL) followed by ^{67}Ga-DATA-TOC or ^{67}Ga-DOTA-TOC (50,000 cpm corresponding to 0.5 pmol total peptide in 150 µL 0.5 % BSA PBS). Non-specific internalization was determined by a parallel series containing 1 µM TATE (HEK293-hsst$_2$ cells), or 1 µM KE108 (HEK293-hsst$_3$ and HEK293-hsst$_5$ cells) and the same procedure was followed as described above. Results represent average±sd values from four independent experiments conducted in triplicates.

Biodistribution Experiments in Tumor-Bearing Mice

Biodistribution in AR42J Tumor-Bearing Mice

For biodistribution experiments, SCID mice of 7 weeks of age (15-20 g) on arrival day (NCSR ‘‘Demokritos’’ Animal House) were subcutaneously injected in both flanks with a suspension of AR42J cells (150 µL inocula of 6.7×10^6 cells in normal saline). Animals were kept under aseptic conditions for 12 d until well-palpable tumors (200-800 mg) were grown at the inoculation sites. At the day of the biodistribution mice were injected in the tail vein in groups of five with [^{67}Ga]Ga-DATA-TOC or [^{67}Ga]Ga-DOTA-TOC (100 µL, 37 kBq, 10 pmol total peptide); three further animals were co-injected with excess TATE (50 nmol) together with the radioligand (blocked animals). Mice were euthanized at

1 and 4 h p.i. and tumors and tissue samples were collected, weighed and measured for radioactivity in the γ-counter. Biodistribution data were calculated with the aid of suitable standards of the injected dose as mean %ID/g±sd using the Graph Pad Software (Prism^{TM} 2.01). For comparison of values the 2-tailed Student's *t*-test was applied and a *P* value <0.05 was considered statistically significant.

Biodistribution in HEK293-hsst$_2$ Xenograft-Bearing Mice

Inocula (150 µL) containing a suspension of freshly harvested 1.2×10^7 HEK293-hsst$_2$ cells in normal saline were subcutaneously injected in both flanks of SCID mice (17±3 g, six weeks of age on arrival day, NCSR "Demokritos" Animal House Facility). Well-palpable tumors were grown at the inoculation site (300-600 mg) after 3 weeks. On the day of the experiment [^{67}Ga]Ga-DATA^{5M}-TOC or [^{67}Ga]Ga-DOTA-TOC was injected via the tail vein as a 100 µL bolus (37 kBq, 10 pmol total peptide) and the animals were euthanized in groups of five at 1 and 4 h p.i.; for *in vivo* receptor-blockade separate 4-h animal groups of three were co-injected with excess TATE (50 nmol). Biodistribution was subsequently performed as described above.

Animal experiments were carried out in compliance with European and national regulations and were approved by national authorities.

REFERENCES

1. Öberg K. Molecular Imaging Radiotherapy: Theranostic for Personalized Patient Management of Neuroendocrine Tumors (NETs). Theranostics. 2012; 2(5): 448–58.

2. Fani M., Mäcke H.R., Okarvi S.M. Radiolabeled peptides: Valuable tools for the detection and treatment of cancer. Theranostics. 2012; 2(5): 481–501.

3. Baum R.P., Kulkarni H.R., Carreras C. Peptides and receptors in image-guided therapy: Theranostics for neuroendocrine neoplasms. Semin. Nucl. Med. 2012; 42(3): 190–207.

4. Brasse D., Nonat A. Radiometals: towards a new success story in nuclear imaging? Dalt. Trans. 2015; 44(11): 4845–58.

5. Fani M., Peitl P., Velikyan I. Current status of radiopharmaceuticals for the theranostics of neuroendocrine neoplasms. Pharmaceuticals. 2017; 10(1): 1–22.

6. Öberg K. Gallium-68 somatostatin receptor PET/CT: Is it time to replace Indium-111 DTPA octreotide for patients with neuroendocrine tumors? Endocrine. 2012; 42(1): 3–4.

7. Shetty D., Lee Y.S., Jeong J.M. Ga-68-labeled radiopharmaceuticals for positron emission tomography. Nucl. Med. Mol. Imaging (2010). 2010; 44(4): 233–40.

8. Velikyan I. Ga-68-based radiopharmaceuticals: Production and application relationship. Molecules. 2015.

9. Velikyana I. Continued rapid growth in Ga-68 applications: Update 2013 to June 2014. J. Label. Compd. Radiopharm. 2015; 58(3): 99–121.

10. Antunes P., Ginj M., Zhang H., Waser B., Baum R.P., Reubi J.C., Mäcke H. Are radiogallium-labelled DOTA-conjugated somatostatin analogues superior to those labelled with other radiometals? Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. 2007; 34(7): 982–93.

11. Cutler C.S., Hennkens H.M., Sisay N., Huclier-Markai S., Jurisson S.S. Radiometals for combined imaging and therapy. Chem. Rev. 2013; 113(2): 858–83.

12. Chatalic K.L.S., Kwekkeboom D.J., de Jong M. Radiopeptides for Imaging and Therapy: A Radiant Future. J. Nucl. Med. 2015; 56(12): 1809–12.

13. De Jong M., Breeman W.A.P., Kwekkeboom D.J., Valkema R., Krenning E.P. Tumor imaging and therapy using radiolabeled somatostatin analogues. Acc. Chem. Res. 2009; 42(7): 873-80.

14. Boros E., Ferreira C.L., Cawthray J.F., Price E.W., Patrick B.O., Wester D.W., Adam M.J., Orvig C. Acyclic chelate with ideal properties for Ga-68 PET imaging agent elaboration. J. Am. Chem. Soc. 2010; 132(44): 15726–33.

15. Price T.W., Greenman J., Stasiuk G.J. Current advances in ligand design for inorganic positron emission tomography tracers Ga-68, Cu-64, Zr-89 and Sc-44. Dalt. Trans. 2016; 45(40): 15702–24.

16. Notni J., Simecek J., Hermann P., Wester H.J. TRAP, a powerful and versatile framework for gallium-68 radiopharmaceuticals. Chem. - A Eur. J. 2011; 17(52): 14718–22.

17. Simecek J., Zemek O., Hermann P., Wester H.J., Notni J. A Monoreactive Bifunctional Triazacyclo-nonane Phosphinate Chelator with High Selectivity for Gallium-68. ChemMedChem. 2012; 7(8): 1375–8.

18. Simecek J., Notni J., Kapp T.G., Kessler H., Wester H.J. Benefits of NOPO As Chelator in Gallium-68 Peptides, Exemplified by Preclinical Characterization of Ga-68-NOPO-c(RGDfK). Mol. Pharm. 2014; 11: 1687–95.

19. Boros E., Ferreira C.L., Yapp D.T.T., Gill R.K., Price E.W., Adam M.J., Orvig C. RGD conjugates of the H2dedpa scaffold: Synthesis, labeling and imaging with Ga-68. Nucl. Med. Biol. 2012; 39(6): 785–94.

20. Eder M., Wängler B., Knackmuss S., LeGall F., Little M., Haberkorn U., Mier W., Eisenhut M. Tetrafluorophenolate of HBED-CC: A versatile conjugation agent for Ga-68-labeled small recombinant antibodies. Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. 2008; 35(10): 1878–86.

21. Berry D.J., Ma Y., Ballinger J.R., Tavaré R., Koers A., Sunassee K., Zhou T., Nawaz S., Mullen G.E.D., Hider R.C., Blower P.J. Efficient bifunctional gallium-68 chelators for positron emission tomo-graphy: tris(hydroxypyridinone) ligands. Chem. Commun. (Camb). 2011; 47(25): 7068-70.

22. Ma M.T., Cullinane C., Imberti C., Baguna Torres J., Terry S.Y.A., Roselt P., Hicks R.J., Blower P.J. New Tris(hydroxypyridinone) Bifunctional Chelators Containing Isothiocyanate Groups Provide a Versatile Platform for Rapid One-Step Labeling and PET Imaging with 68Ga3+. Bioconjug. Chem. 2016; 27(2): 309–18.

23. Ma M.T., Cullinane C., Waldeck K., Roselt P., Hicks R.J., Blower P.J. Rapid kit-based Ga-68-labelling and PET imaging with THP-Tyr3-octreotate: a preliminary comparison with DOTA-Tyr3-octreotate. EJNMMI Res. 2015; 5(1): 52.

24. Waldron B.P., Parker D., Burchardt C., Yufit D.S., Zimny M., Rösch F. Structure and stability of hexadentate complexes of ligands based on AAZTA for efficient PET labelling with gallium-68. Chem. Commun. (Camb). 2013; 49: 579–81.

25. Parker D., Waldron B.P. Conformational analysis and synthetic approaches to polydentate perhydro-diazepine ligands for the complexation of gallium(III). Org. Biomol. Chem. 2013; 11(17): 2827.

26. Seemann J., Waldron B.P., Rösch F., Parker D. Approaching "kit-type" labelling with Ga-68: The DATA chelators. ChemMedChem. 2015; 10(6): 1019–26.

27. Seemann J., Waldron B.P., Parker D., Rösch F. DATATOC: a novel conjugate for kit-type Ga-68 labelling of TOC at ambient temperature. EJNMMI Radiopharm. Chem. 2016; 1(1): 4.

28. Buchmann I., Henze M., Engelbrecht S., Eisenhut M., Runz A., Schäfer M., Schilling T., Haufe S., Herrmann T., Haberkorn U. Comparison of Ga-68-DOTATOC PET and In-111-DTPAOC (Octreoscan) SPECT in patients with neuroendocrine tumours. Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. 2007; 34(10): 1617–26.

29. Nock B.A., Kaloudi A., Lymperis E., Giarika A., Kulkarni H.R., Klette I., Singh A., Krenning E.P., de Jong M., Maina T., Baum R.P. Theranostic Perspectives in Prostate Cancer with the Gastrin-Releasing Peptide Receptor Antagonist NeoBOMB1: Preclinical and First Clinical Results. J. Nucl. Med. 2017; 58: 75–80.

30. Maina T., Cescato R., Waser B., Tatsi A., Kaloudi A., Krenning E.P., De Jong M., Nock B.A., Reubi J.C. LTT-SS28, a first pansomatostatin radioligand for in vivo targeting of somatostatin receptor-positive tumors. J. Med. Chem. 2014; 57(15): 6564–71.

31. Patel Y.C., Srikant C.B. Subtype selectivity of peptide analogs for all five cloned human somatostatin receptors (hsstr 1-5). Endocrinology. 1994; 135(6): 2814–7.

32. Tatsi A., Maina T., Cescato R., Waser B., Krenning E.P., De Jong M., Cordopatis P., Reubi J.C., Nock B.A. DOTA Somatostatin-14 analogs and their In-111-radioligands: Effects of decreasing ring-size on sst1-5 profile, stability and tumor targeting. Eur. J. Med. Chem. 2014; 73: 30–7.

33. Maina T., Nock B.A., Nagel J., Sinnes J.-P., Baum R.P., Rösch F. In vitro binding affinities and initial in vivo evaluation of Ga-68-DATA-TOC. J. Nucl. Med.J. Nucl. Med. 2016; 57: 1112.

34. Coy D.H., Taylor J.E. Receptor-specific somatostatin analogs: correlations with biological activity. Metabolism. 1996; 45(8 Suppl 1): 21–3.

35. Reubi J.C., Eisenwiener K.P., Rink H., Waser B., Mäcke H.R. A new peptidic somatostatin agonist with high affinity to all five somatostatin receptors. Eur. J. Pharmacol. 2002; 456(1-3): 45–9.

36. Maina T., Nock B., Nikolopoulou A., Sotiriou P., Loudos G., Maintas D., Cordopatis P., Chiotellis E. Tc-99m-Demotate, a new Tc-99m-based [Tyr3]octreotate analogue for the detection of somatostatin receptor-positive tumours: Synthesis and preclinical results. Eur. J. Nucl. Med. 2002; 29(6): 742–53.

4.3 Weiterführende Patienten Studien zu DATA^{5m}-TOC

Im Rahmen von einer ersten Patientenstudie konnten die Human-Ergebnisse aus 4.1 bestätigt werden. Diese erste aktuelle klinischen Studie mit dem [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC umfasst 19 Patienten. Die gemessene Tumoraufnahme zeigt in ersten Auswertungen eine 8-32 % geringere Aufnahme für das [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC gegenüber dem [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC. Aber auch die gemessene Aufnahme in gesunden Gewebe mit Somatostatin Rezeptoren für [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC war 17-40 % geringer als die des [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC, wie am Beispiel der Hypophyse in Abbildung 1 zu erkennen ist. Weiterhin war der Hintergrund in der Leber 33-37 % geringer, was mit einer längeren Blutzirkulationszeit des [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC einher ging. In den PET-Aufnahmen war damit kein Unterschied im Tumor-zu-Hintergrund Verhältnis zu erkennen. Dies ist in Abbildung 2 mit einem insgesamt vergleichbar guten Bildkontrast bei beiden Tracern zu erkennen. Weiterhin ist bei der Lebermetastase ein leicht besserer Tumor-zu-Hintergrund-Kontrast zu erkennen, bedingt durch den niedrigeren Hintergrund-Uptake in der Leber. Nach SUVs der Lebermetastasen und SUVs der Leber konnte ein 5-11% besseres Verhältnis beim [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC festgestellt werden (Tabelle 1).

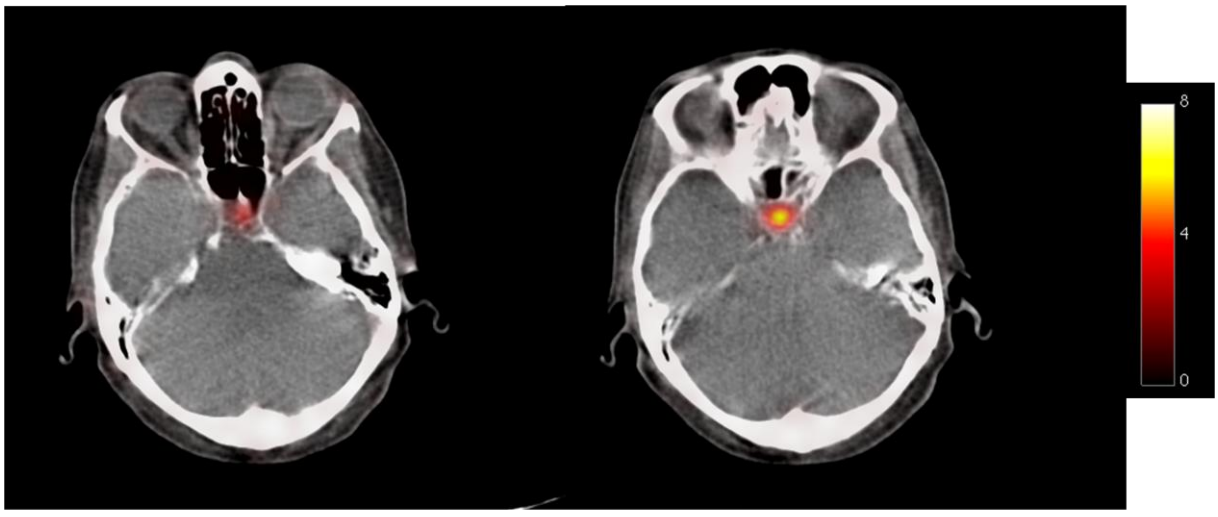


Abbildung 1: PET-Aufnahmen einer 78-jährigen Patientin; zeigt die Aufnahme in der Hypophase als Organ mit physiologischer SSTR-Expression

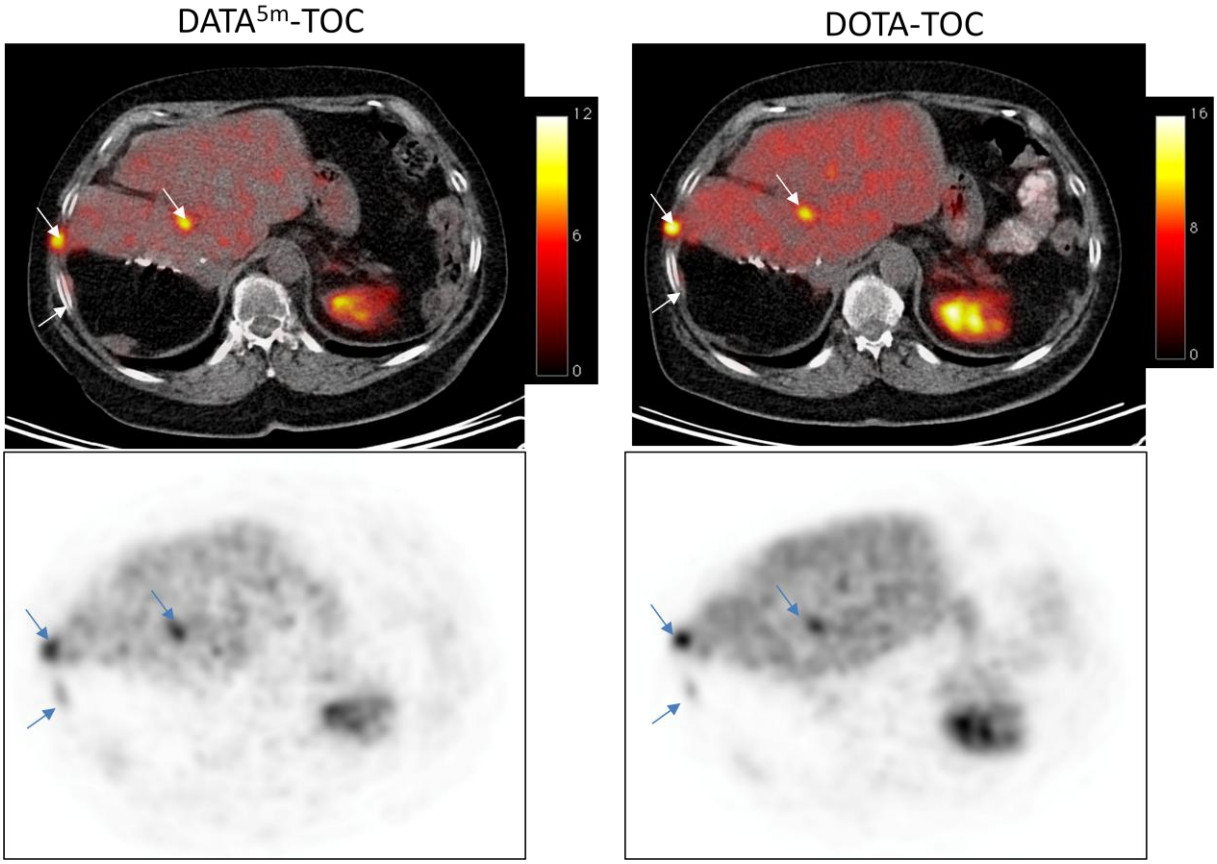


Abbildung 2: PET-Aufnahmen einer 78-jährigen Patientin mit einem metastasierten neuroendokrinen Tumor des terminalen Ileums, Zustand nach Resektion des Primärtumors. Axialer Schnitt mit Darstellung von 3 Metastasen: 1x Leber und 2x Thoraxwand (Pfeile). Oben PET/CT Fusion; Unten PET Aufnahme

Tabelle 1: Tumour-zu-Hintergrund Verhältnis der SUV_{max} der Lebermetastasen zum SUV des Hintergrundgewebes (HG) von [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC und [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC über N = 12 Patienten

Verhältnis		SUV_{max}:HG	SUV_{mean}:HG
DATA^{5m}-TOC	Mean	2.87	2.07
	SD	0.64	0.62
DOTA-TOC	Mean	2.58	1.97
	SD	1.28	1.07
Verhältnis DATA^{5m}-TOC / DOTA-TOC		111.4%	105.1%

Dies bestätigt die von Prof. Baum in 4.1 festgestellten Ergebnisse in dem 46-Jährigen Patienten zur möglichen besseren Visualisierung von Lebermetastasen mittels [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC. Weiterhin zeigen die ersten Ergebnisse im Patienten, dass [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC mit seiner instant kit-type Markierung und vergleichbaren *in vivo*-Anreicherung zu [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC ein neuer PET-Tracer mit hohem Potential ist.

Die Ergebnisse aus diesem Abschnitt (4.3) sind aktuell beim European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging (EJNMMI) eingereicht:

Clinical evaluation of [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC in comparison to [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC in patients with neuroendocrine tumours

Autoren: Gaertner FC[1,*,+], Plum T[1,+], Kreppel B[1], Eppard E[1], Meisenheimer M[1], Strunk H[2], Bundschuh RA[1], Sinnes JP[3], Rösch F[3], Essler M[1]

[1] Department of Nuclear Medicine, University Hospital Bonn, Sigmund-Freud-Str. 25, 53127 Bonn, Germany

[2] Department of Radiology, University Hospital Bonn, Sigmund-Freud-Str. 25, 53127 Bonn, Germany

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

* Corresponding author: florian.gaertner@ukbonn.de, Tel. +49-(0)228-287-15181.

[+] equal contribution

4.4 DATA^{5m}-PSMA: Radiomarkierung und in vitro Evaluation

Der Chelator DATA^{5m} wurde im Rahmen der Kooperation mit Heidelberg analog zum AAZTA^{5} (siehe 5.2) an die Struktur des PSMA-617 gebunden (Abbildung 1). Die PSMA-617 Grundstruktur wurde von der Arbeitsgruppe Kopka (DKFZ Heidelberg) auf Festphase synthetisiert und die Kopplung des DATA^{5m} erfolgte durch die Ausbildung des Aktivesters mit HBTU/DIPEA (in DMF) in Mainz. Nach Abspaltung von der Festphase wurde mittels HPLC das DATA^{5m}-PSMA isoliert: LUNA Säule (Phenomenex® Luna® 10 µm C18(2) 100 Å) mit einem Gradient von 25 auf 30 % MeCN (+0,1 % TFA)/75 auf 70 % Wasser (+0,1 % TFA). Nach der Aufreinigung folgte die radiochemische Evaluation mit ^{68}Ga und Stabilitätsstudien gegen Human-Serum, PBS-Puffer und Fe(III)/EDTA/DTPA (0,01 M; 1000-facher Überschuss) in PBS Puffer. Die radiochemische Evaluation wurde in Mainz mit einem ^{68}Ge/^{68}Ga-Generator (TiO_2-based matrix, Cyclotron Co. Obninsk, Russia) durchgeführt. Aufreinigung erfolgte über das Aceton Postprocessing zur Abtrennung von Zink, Germanium-68 und Eisen [1]. Die Markierung für die *in vitro* Studien in Heidelberg erfolgte, wegen der kurzen Halbwertszeit des ^{68}Ga, mit dem dortigen ^{68}Ge/^{68}Ga-Generator auf Pyrogallol-Basis [2]. Die *in vitro* Studien wurden analog zu 5.2 durchgeführt. [^{68}Ga]Ga-PSMA-617 (PSMA-617 bezogen von ABX® Germany) diente als Standard im Assay.

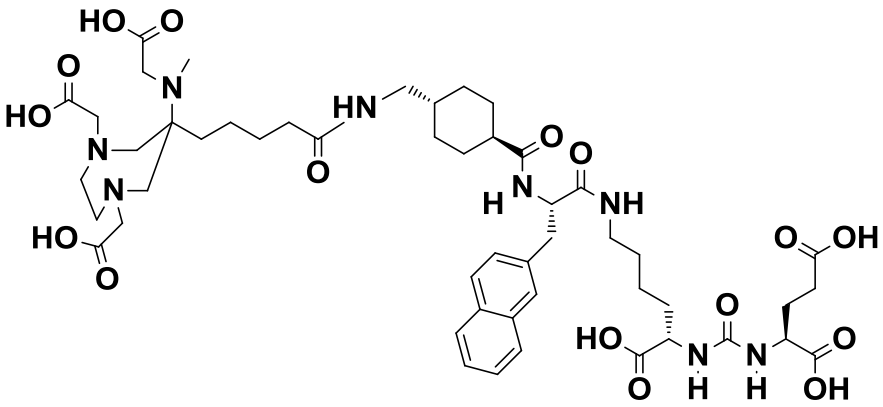


Abbildung 1: Struktur des DATA^{5m}-PSMA

Radiomarkierungen und Stabilitätsstudien:

Es konnten mit 15 nmol Vorläufermenge in 0,2 M Amoniumacetat-Puffer pH 4,5 bereits nach 1 min Ausbeuten von >95 % erreicht werden. Nach 3 bis 5 min waren quantitative Ausbeuten von >99 % erreicht. Niedrigere Vorläufereinwaagen erreichten in Mainz leider keine quantitativen Ausbeuten. Bereits bei 10 nmol war eine maximale Ausbeute von ~70 % nach 5 Minuten erreicht und es konnte nach 10 oder 20 min keine höhere Ausbeute erreicht werden. Diese Markierungsprobleme sind auf die zu dem Zeitpunkt nicht optimalen Generatoren zurückzuführen, welche kein sauberes Eluat lieferten. Dennoch wurden mit den quantitativen Markierungen Stabilitätsstudien durchgeführt. Wie in Abbildung 2 zu erkennen ist, zeigt das [^{68}Ga]Ga-DATA^{5m}-PSMA gute Stabilitäten in allen 5 gemessenen Medien über 2 Stunden (2 Halbwertszeiten).

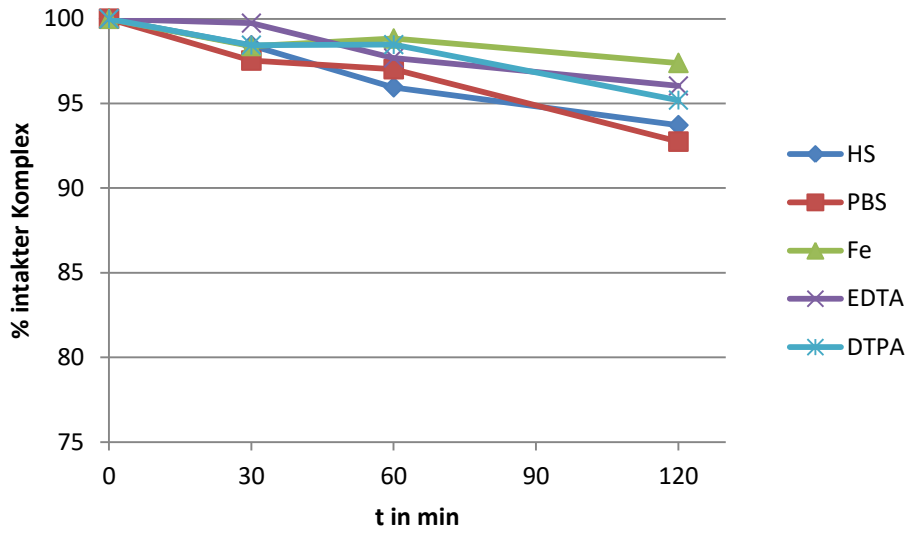


Abbildung 2: Stabilitätswerte für [^{68}Ga]Ga-DATA^{5m}-PSMA über 2 Stunden gegen Human-Serum, PBS-Puffer und Fe(III)/EDTA/DTPA in PBS-Puffer

Die für das Assay erforderliche Markierung setzt eine 6 uM Lösung voraus, Diese Bedingungen konnten mit den zu dem Zeitpunkt in Mainz befindlichen Generatoren nicht erreicht werden. Allerdings zeigte das DATA^{5m}-PSMA ausgezeichnete Markierungseigenschaften mit dem Eluat des Pyrogallol-Generators in Heidelberg. Hier konnten fast 600 MBq in100 µl einer 0,1 M salzsauren Lösungerhalten werden. Mit Zugabe von 200 µl 0,2 M AmAc-Puffers pH 4,5 konnte nach 5 min eine quantitative Markierung von >99 % mittels HPLC mit Radiodetektor nachgewiesen werden. Durch Verdünnung konnte die passende Konzentration für das Assay zu erhalten.

***In vitro* Studien: Bindungs-Affinität und Internalisierung**

Gegen 0,75 nM [^{68}Ga]Ga-PSMA-10 konnten das DATA^{5m}-PSMA und das [^{nat}Ga]Ga-DATA^{5m}-PSMA auf LNCaP Zellen einen niedrig nanomolaren IC_{50}-Wert von 21,2 ± 1,15 respektive 68,9 ± 1,13 nM erreichen. Besonders der Wert des kalten Komplexes kommt nicht an den,um eine Größenordnung kleineren Werte, des [^{nat}Ga]Ga-PSMA-617 von 6,4 ±1,02 nM heran [3]. Dennoch kann eine relativ hohe Affinität zum PSMA auf LNCaP Zellen nachgewiesen werden. Die nach Cheng-Prusov errechneten K_i-Werte sind: 17,7 nM und 57,6 nM, respektive. Der Wert des [^{nat}Ga]Ga-DATA^{5m}-PSMA ist auch deutlich höher als der des [^{nat}Ga]Ga-AAZTA^5-PSMA mit 8,69 ± 0,95 nM (siehe 5.2). Da beide Komplexe ungeladen vorliegen, muss die vierte freie Carboxylgruppe des AAZTA^5-PSMA einen positiven Einfluss auf die Bindung haben oder *in vivo* deprotoniert und somit geladen vorliegen, wodurch ein positiver Effekt möglich ist. Ein anderer Unterschied könnte in der Koordination des Galliums liegen, da das AAZTA^5 mehr Koordinationen zulässt. Dies wäre aber nur durch eine Kristallstruktur-Analyse zu klären.

Die Internalisierungsstudien zeigten, wie beim AAZTA^5-PSMA mit allen drei Nukliden (siehe 5.2), auch für das [^{68}Ga]Ga-DATA^{5m}-PSMA eine deutlich höhere Internalisierung im direkten Vergleich zum [^{68}Ga]Ga-PSMA-617, gemessen am selben Tag. Mit dem [^{68}Ga]Ga-DATA^{5m}-PSMA wurde parallel zusätzlich auch das [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 getestet (Abbildung 3). Die deutlich höhere Internalisierung des [^{68}Ga]Ga-DATA^{5m}-PSMA geht mit einer deutlich höheren Oberflächenaktivität und eine signifikanten Oberflächenaktivität und Internalisierung bei dem 4 °C Wert einher. Die für den PSMA-617 Standard gemessen Werte weichen deutlich von den Literaturwerten von etwa 18 %IA/10^6 Zellen für [^{68}Ga]Ga-PSMA-617 ab [3]. Nur der [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 stimmt mit der Literatur von etwa 10 %IA/10^6 Zellen überein, wobei auch hier eine deutlich höhere Oberflächenaktivität als in der Literatur gemessen wurde und der 4 °C Wert der Oberflächenaktivität höher ausfällt.

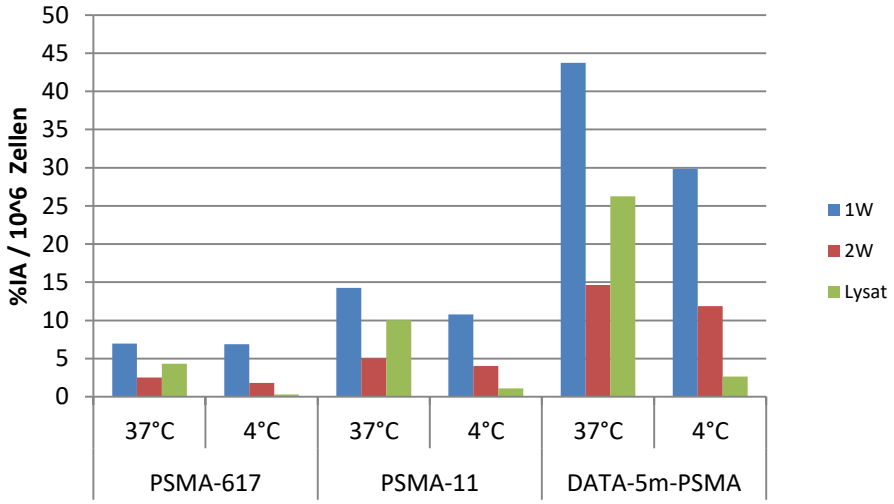


Abbildung 3: Internalisierung von [^{68}Ga]Ga- PSMA-617, [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 und [^{68}Ga]Ga-DATA^{5m}-PSMA auf LNCaP Zellen in %IA / 10^6 Zellen (% eingesetzte Aktivität in 10^6 gefunden)

Allgemein fällt ein direkter Vergleich mit dem [^{68}Ga]Ga-PSMA-617 schwer, da die Werte außerhalb der erklärbaren Parameter liegen. Im Vergleich mit dem [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 zeigt das [^{68}Ga]Ga-DATA^{5m}-PSMA eine deutlich bessere Internalisierung. Die relativ hohe Oberflächenaktivität und die hohen 4 °C-Werte lassen sich nicht wie in 5.2 mit der möglichen Ladung des Komplexes erklären. Allgemein bleibt unklar warum die Substanz bei niedrigen Temperaturen eine so hohe Oberflächenaktivität aufweist. Die Oberflächenaktivität bei 4 °C war auch durch 2-PMPA blockbar, was darauf hindeutet, dass diese nicht unspezifisch ist. Genauer könnte das aber nur durch Messungen auf PC-3 Zellen (PSMA negativ), wie beim AAZTA^5-PSMA, geklärt werden.

Ergebnis:

Das DATA^{5m}-PSMA wurde in guten Ausbeuten synthetisiert und nach Aufreinigung erfolgreich radiomarkiert. Besonders mit dem Pyrogallol-Generators in Heidelberg konnten ausgezeichnete radiochemische Ausbeuten erzielt werden. Die Stabilität des [^{68}Ga]Ga-DATA^{5m}-PSMA gegen Human-Serum, PBS-Puffer und Fe(III)/EDTA/DTPA in PBS-Puffer lag nach zwei Halbwertszeiten für alle Medien bei 95 % und es konnte keine Dekomplexierung beobachtet werden. In den *in vitro* Bindungsstudien zeigte das [^{nat}Ga]Ga-DATA^{5m}-PSMA eine gute Affinität zum PSMA , welche eine Größenordnung über dem Literaturwert des [^{nat}Ga]Ga-PSMA-617 liegt. Die Internalisierungsstudien zeigten eine sehr hohe Internalisierung des [^{68}Ga]Ga-DATA^{5m}-PSMA im Vergleich zu beiden parallel

getesteten PSMA-617-Derivaten. Es konnte aber auch eine signifikante Internalisierung bei 4 °C beobachtetet werden. Dies deutet normalerweise auf eine unspezifische Aufnahme hin, da bei 4 °C das PSMA als Enzym nicht mehr arbeitet. Allerdings konnten die Werte bei 4 °C durch 2-PMPA geblockt werden. Damit muss es sich um eine spezifische Bindung an das PSMA handeln, da 2-PMPA nur dieses blockt.

Literatur 4.4

1. Seemann J, Eppard E, Waldron BP, Ross TL, Roesch F. Cation exchange-based post-processing of ^{68}Ga-eluate: A comparison of three solvent systems for labelling of DOTATOC, NO2APBP and DATA^{m}. Appl Radiat Isot. 2015;98:54-59.

2. Schuhmacher J, Maier-Borst W. A new ^{68}Ge/^{68}Ga radioisotope generator system for production of ^{68}Ga in dilute HCl. Int J Appl Radiat Isot. 1981;32(1):31-36.

3. Benešová M, Schäfer M, Bauder-Wüst U, et al. Preclinical Evaluation of a Tailor-Made DOTA-Conjugated PSMA Inhibitor with Optimized Linker Moiety for Imaging and Endoradiotherapy of Prostate Cancer. J Nucl Med. 2015;56(6):914-920.

5.0 Hauptabschnitt 2: AAZTA[5]

5.1 AAZTA^5/AAZTA^5-TOC: Synthesis and radiochemical evaluation with ^{68}Ga, ^{44}Sc and ^{177}Lu

Jean-Philippe Sinnes · Johannes Nagel · Frank Rösch*

Author details:

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

Correspondence: frank.roesch@uni-mainz.de / Tel. +49 6131 39 25302

Abstract

Purpose AAZTA (1,4-bis(carboxymethyl)-6-[bis(carboxymethyl)]amino-6-methylperhydro-1,4-diazepine) based chelators were initially developed in the context of magnetic resonance imaging. First radiochemical studies showed the capability of AAZTA to form stable complexes with radiolanthanides and moderately stable complexes with ^{68}Ga. For a systematic comparison of the labelling capabilities with current diagnostic and therapeutic trivalent radiometals, AAZTA^5 (1,4-bis(carboxymethyl)-6-[bis(carboxymethyl)]amino-6-[pentanoic-acid]perhydro-1,4-diazepine) was synthesized representing a bifunctional version with a pentanoic acid at the carbon-6 atom. To evaluate the effect of adding a targeting vector (TV) to the bifunctional chelator on the complex formation, AAZTA^5-TOC was synthesized, radiolabelled and tested in comparison to the uncoupled AAZTA^5.

Methods AAZTA^5 was synthesized in a 5-step synthesis. It was coupled to the cyclic peptide TOC (Phe(1)-Tyr(3)octreotide) via amide bound formation. AAZTA and AAZTA^5-TOC complex formation with ^{68}Ga, ^{44}Sc and ^{177}Lu were investigated at different pH, temperature and precursor amounts. Stability studies against human serum, PBS buffer and EDTA/DTPA were performed.

Results AAZTA^5 and AAZTA^5-TOC achieved quantitative labelling (>95 %) at room temperature in less than 5 min with all three nuclides at pH ranges from 4 to 5.5 with low precursor amounts of 1 to 10 nmol. [^{44}Sc]Sc-AAZTA^5 complexes as well as [^{44}Sc]Sc-AAZTA^5-TOC complexes were completely stable. The ^{177}Lu complexes of AAZTA^5 and AAZTA^5-TOC showed high stability comparable to the ^{44}Sc complexes. In contrast, the [^{68}Ga]Ga-AAZTA^5 complex stability was rather low, but interestingly, [^{68}Ga]Ga-AAZTA^5-TOC was completely stable.

Conclusion AAZTA^5 appears to be a promising bifunctional chelator for ^{68}Ga, ^{44}Sc and ^{177}Lu with outstanding labelling capabilities at room temperature. Complex stabilities are high in the case of ^{44}Sc and ^{177}Lu. While [^{68}Ga]Ga-AAZTA complexes alone lacking stability, [^{68}Ga]Ga-AAZTA^5-TOC demonstrated high stability. The latter indicates an interesting feature of [^{68}Ga]Ga-AAZTA^5–labelled radiopharmaceuticals.

Keywords Gallium-68, Scandium-44, Lutetium-177, AAZTA^5-TOC, AAZTA^5, TOC, somatostatin, PET, theranostic

Introduction

The ongoing development in molecular imaging is focusing more and more on theranostic approaches as they link imaging directly with therapy as well as monitoring of the treatment [1-3]. In this context, patient-individual dosimetry is important for application of long-lived therapeutic nuclides. This emphasizes the advantage of a longer-lived PET-nuclide like ^{44}Sc over ^{68}Ga [4-6]. In addition, some relevant molecular targeting vectors (e.g. based on proteins) are temperature and pH sensitive. Accordingly, chelators in those cases should allow for labelling at room temperature and pH 5-6 near physiological pH.

Most of the commonly used nuclides for PET imaging and therapy are trivalent metals Me(III), thus have a positive charge of 3 as ions in solution. The most used bifunctional chelators (BFC) are macrocycle derivatives based on DOTA and NOTA compensating for this charge with their deprotonated acid groups, leading to (Me(III)DOTA)$^-$ and Me(III)NOTA. Bifunctionalisation of DOTA normally uses one of the acid groups to connect to the TV, so the complex ends up with Me(III)DOTA-TV. The final charge of the Me-chelator unit is zero, which is important for the pharmacology and *in vivo* application. DOTA-conjugated TV´s are typically ^{68}Ga-labeled at ca. 95 °C for 10 – 15 minutes to achieve high labelling yields [7-9]. NOTA- or NODAGA-conjugated analogues allow ^{68}Ga-labelling at lower temperature, if larger amounts of the labelling precursor are utilized, yet for many compounds at lower concentration heating to 95 °C is common to achieve fast and quantitative labelling [10]. For theranostic strategies with ^{177}Lu only DOTA can be used, since NOTA derivatives are not suitable for complexing ^{177}Lu. Again, ^{177}Lu-labellig of DOTA-peptides is achieved at temperatures close to 100 °C and optimal labelling pH is around 4.

Accordingly, optimal chelators for radiolabelling sensitive biomolecules with trivalent radiometals (^{68}Ga ,^{44}Sc, ^{177}Lu, ^{90}Y, ^{213}Bi, ^{225}Ac) would be extremely important. There are some proper candidates for labelling at room temperature HBED [11], THP [12], H(2)dedpa [13, 14], DATA^{5m} [15-17] show the desired labelling capabilities mostly for ^{68}Ga, while the newest two, THP and DATA^{5m} have optimum labelling parameters reaching fast quantitative yields at room temperature on wide pH ranges up to pH 6 [7]. AAZTA^5/AAZTA^{CN} were reported to provide good labelling with not only ^{68}Ga, but also ^{44}Sc and ^{177}Lu [18-20].

In this work we want to evaluate the AAZTA lead structure in several aspects. First, a bifunctional derivative, needed to later covalently attach the chelator to a TV, was synthesized. Here, our strategy is to replicate the approach we successfully introduced for the DATA chelator [16]. Second, we systematically optimize radiolabelling protocols for Me(III)-AAZTA^5 complexes with

Me(III)= ^{68}Ga, ^{44}Sc and ^{177}Lu. Third, we correlate labelling yield with Me(III)-AAZTA^5 complex stability *in vitro*. Fourth, we synthesize a proof-of-principle radiopharmaceutical, namely AAZTA^5-TOC, to again determine radiolabelling efficiency and *in vitro* stability.

Materials and Methods

Synthesis of AAZTA^5

All basic chemicals were acquired from Sigma-Aldrich, Merck and VWR. AAZTA^5 (2,2'-(6-(bis(carboxymethyl)amino)-6-(4-carboxybutyl)-1,4-diazepane-1,4-diyl)diacetic acid) was synthesized in a 5-step synthesis. The reactions to form the diazepine ring **1** via ring opening of nitrocyclohexanon and the full reduction to **2** has been published before as it is also part of the DATA synthesis (Figure 1) [16]. To form the fully alkylated AAZTA, the ongoing reaction was catalyzed by KI and moderate temperatures of 40 °C as well as a huge excess of tert-butyl bromoacetate. To deprotect the bifunctional acid group, the methyl ester is cleaved with LiOH in dioxane/water to afford **4**. While for the evaluation of the free chelator **5** the protective tert-butyl groups were cleaved with TFA leaving the methyl ester intact.

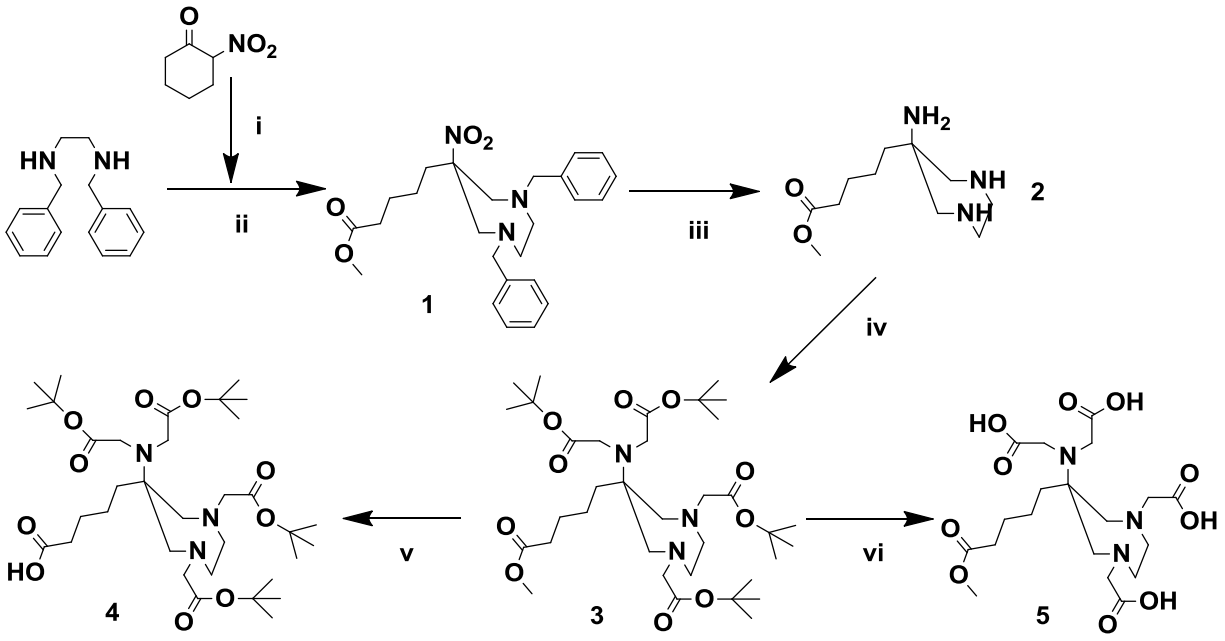


Figure 1: Synthesis of the bifunctional chelator AAZTA^5: (i) A21, MeOH; (ii) paraformaldehyde, MeOH; (iii) $Pd(OH)_2/C$, EtOH, H_2; (iv) tert-butyl-bromoacetate, K_2CO_3, ACN; (v) LiOH, dioxane/water; (vi) 90% TFA/5% H_2O/5% triisopropylsilane (TiS)

Synthesis of AAZTA^5-TOC

A standard amide coupling was performed to couple the AAZTA^5 to TOC. The TOC (Phe(1)-Tyr(3)octreotide were purchased from ABX Germany. As coupling reagent HBTU with an excess of HOBt was added to a solution of **8** in DMF. DIPEA was used as organic base. After coupling, all protective groups were cleaved with TFA. HPLC purification was performed on a LUNA column (Phenomenex® Luna® 10 µm C18(2) 100 Å) with isocratic conditions of 21 % MeCN (+0,1 % TFA)/79 % Water (+0,1 % TFA).

Radiolabelling with ^{68}Ga, ^{44}Sc and ^{177}Lu

For radiolabelling with ^{68}Ga a ^{68}Ge/^{68}Ga generator (TiO_2-based matrix, Cyclotron Co. Obninsk, Russia) was used with acetone post-processing separating iron and zinc impurities as well as ^{68}Ge breakthrough [21-23]. Radiolabelling with ^{44}Sc was performed with a ^{44}Sc/^{44}Ti generator [24, 25] located at the Institute of Nuclear Chemistry in Mainz. The ^{177}Lu was provided by itG Munich following the cerrier-free production pathway ^{176}Yb(n,γ)^{177}Yb → ^{177}Lu [26].

Radiolabelling for all radiometals was performed in 1 ml of 0.2 M ammonium acetate buffer pH 4.5 and 5.5. Due to the post processing for ^{44}Sc the nuclide is provided in 0.25 M ammonium acetate buffer pH 4 [25] and for first studies the pH was not adjusted above pH 4. To show the mild labelling capability of the AAZTA^5 chelator the reaction temperature was adjusted to 25 °C with a BT 03 heater from HLC BioTech (Germany). Labelling studies were performed with 50 MBq for ^{44}Sc and 100 MBq for ^{68}Ga and ^{177}Lu. At different time points of 1, 3, 5 and 10 minutes aliquots for TLC and HPLC analytics were taken. The pH was controlled at start of labelling and after labelling was finished.

For reaction control TLC (TLC Silica gel 60 F_{254} Merck®) with citrate buffer (pH 7) and radio HPLC (Chromolith flushcolumn, Water : MeCN with 0.1% TFA, 5 to 95% MeCN in 10 min) was used. TLC´s were measured in RITA TLC imager (Elysia Raytest). The citrate TLC showed free radio metal with an Rf of 0,9 and all labelled compound sticked to an Rf of 0.1 to 0.3. HPLC was used to exclude the presence of colloidal radiometals.

Stability studies

Stability studies were performed in HS, PBS and EDTA/DTPA solution (pH adjusted to 7 by PBS buffer) in triplicate, starting from Me(III)-AAZTA^5/ AAZTA^5-TOC batches of > 95% radiochemical purity. Time points were adjusted to the nuclides half-life: for ^{68}Ga 0.5, 1, 2 hours; for ^{44}Sc 0.5, 1, 4, 8 hours, 24 h; for ^{177}Lu 0.5, 1 and 2 hours, 1 and 7 days. HS (human male AB plasma, USA origin) were bought from Sigma Aldrich , PBS was prepared with a BupH™ Phosphate Buffered Saline Pack (PIERCE),

EDTA/DTPA solution were prepared using the prepared PBS buffer by adding ETDA/DTPA to a 0,01 M concentration.

Results

Synthesis of AAZTA^5 and AAZTA^5-TOC

The established synthesis for DATA^{5m} and DATA^{5m}-TOC [16] was successfully transferred to AAZTA^5 and AAZTA^5-TOC. The key step, attaching four arms to the diazepine backbone, was optimized to work in good yields by forcing the reaction with slightly increased temperatures of 40 °C and the addition of KI. Without the exchange from bromine to iodine on the tert-butyl bromoacetate nearly no alkylation was observed. Even with KI the reaction is still relatively slow and needs to be stirred over two days. Deprotection of the methyl group on the AAZTA^5 was done similar to that of DATA^{5m}. Purification by extraction (dichloromethane against 0.1 M $NaCO_3$ in water) gave the pure product ready for coupling in the dichloromethane phase.

Formation of the AAZTA^5 active ester with HBTU (in DMF with 7 eq of DIPEA) was fast and could be monitored by LC-MS showing the active ester. After 15 min and positive LC-MS control the active ester was added to the TOC solved in DMF. After one night the DMF was removed and residues picked up in 95% TFA/2.5% Water/2.5% TiS (Triisopropylesilane). Lower concentrations of TFA with dichloromethane as solvent were not acidic enough to fully deprotect the chelator, leaving 1 - 2 *tert*butyl groups even after 1 night. After 3-4 h of reaction the TFA were removed and the residue solved in 80% water/20% acetonitrile for HPLC. Yields after the HPLC were in a solid range of 30-40 %.

Radiochemical Evaluations with ^{68}Ga

For both the free chelator AAZTA^5 as well as the AAZTA^5-TOC radiolabelling with 10 nmol precursor showed an almost quantitative yield of >95% in less than 5 min, most of the time reaching >95% even after 1 min at room temperature. At 5 nmol of precursor amount, a slower kinetic was observed, but still yielding >90% after 15 min most of the time, yet reproducibility became a problem. Variation of the pH from 4.5 to 5.5 showed near no difference in the kinetics or the overall yield. Thus 10 nmol was found to be the optimal precursor amount to prepare [^{68}Ga]Ga-AAZTA^5 and [^{68}Ga]Ga-AAZTA^5-TOC, ready to be investigated in subsequent stability studies.

Stability of [^{68}Ga]Ga-AAZTA^5 against HS and PBS were high for 1 h, but decreased slowly at 2 h to a value of 85% and 79%, respectively. Adding EDTA or DTPA decreased the stability further up to 40-

50% after 2 h. In contrast to the free chelator, the [^{68}Ga]Ga-AAZTA^5-TOC was completely stable against HS, PBS, EDTA and DTPA over 2 h.

Table 1 Radiolabelling data for [^{68}Ga]Ga-AAZTA^5, [^{68}Ga]Ga-AAZTA^5-TOC, [^{44}Sc]Sc-AAZTA^5, [^{44}Sc]Sc-AAZTA^5-TOC after 10 min (15 min for 5 nmol AAZTA^5) at room temperature

	^{68}Ga-Radiolabelling				**^{44}Sc-Radiolabelling**	
	AAZTA^5		AAZTA^5-TOC		AAZTA^5	AAZTA^5-TOC
pH	4.5	5.5	4.5	5.5	4.0	4.0
5 nmol	92.3 ± 1.8	89.8 ± 2.4	94.3 ± 1.7	91.7 ± 3.5	98.0 ± 0.6	96.9 ± 0.9
10 nmol	98.5 ± 0.8	99.1 ± 0.5	99.0 ± 0.7	98.6 ± 0.9	99.5 ± 0.3	96.7 ± 1.2

Radiochemical Evaluation with ^{44}Sc

Labelling both AAZTA^5 and AAZTA^5-TOC with ^{44}Sc showed a quantitative yield of >95% radiolabelling with 10 nmol in less than 5 min, most of the time reaching >95% even after 1 min, all at room temperature. Lowering the precursor amount to 5 nmol induced slower kinetics for the free chelator, still yielding >95% after 10 min for AAZTA^5. In contrast, radiolabelling with 5 nmol of AAZTA^5-TOC was always >95% in less than 5 min at room temperature. Labelling with 5 nmol was stable enough to use it for stability studies.

Stability studies showed for both the free chelator as well as the AAZTA^5-TOC stability against HS, PBS, EDTA and DTPA over 8 h. [^{44}Sc]Sc-AAZTA^5-TOC remained stable with >90% in HS and PBS even over 24 h.

Table 2 Stability data for ^{68}Ga, ^{44}Sc and ^{177}Lu complexes of AAZTA^5 and AAZTA^5-TOC against human serum, PBS buffer and EDTA/DTPA in PBS buffer in percent of stable complex at specific time points

	^{68}Ga			**^{44}Sc**			**^{177}Lu**		
	time	AAZTA^5	AAZTA^5-TOC	time	AAZTA^5	AAZTA^5-TOC	time	AAZTA^5	AAZTA^5-TOC
HS	30 min	93.0 ± 0.8	98.1 ± 0.2	1 h	93.7 ± 0.9	95.1 ± 0.6	1 h	99.8 ± 0.1	92.5 ± 1.9
	1 h	92.7 ± 1.3	96.9 ± 0.2	4 h	94.3 ± 1.7	94.3 ± 0.8	2 h	99.7 ± 0.1	92.3 ± 2.6
	2 h	85.3 ± 3.4	95.0 ± 0.3	8 h	93.2 ± 1.1	95.0 ± 1.1	24 h	99.9 ± 0.1	91.5 ± 2.1
				24 h	91.3 ± 1.8	93.8 ± 1.0	7 d	82.5 ± 3.2	86.3 ± 3.2
PBS	30 min	97.5 ± 1.0	99.1 ± 0.2	1 h	95.3 ± 0.9	97.3 ± 0.5	1 h	97.8 ± 0.5	92.0 ± 1.4
	1 h	88.7 ± 0.5	99.2 ± 0.1	4 h	92.7 ± 1.3	98.5 ± 0.9	2 h	98.6 ± 0.4	93.5 ± 1.3
	2 h	78.5 ± 4.5	99.3 ± 0.1	8 h	95.9 ± 1.2	96.7 ± 1.4	24 h	99.1 ± 0.6	91.0 ± 2.2
				24 h	96.0 ± 0.8	94.7 ± 1.6	7 d	96.0 ± 0.8	93.1 ± 1.8
EDTA	30 min	93.0 ± 0.2	98.9 ± 0.4	1 h	93.7 ± 1.3	96.0 ± 0.4	1 h	98.9 ± 0.2	95.7 ± 2.4
	1 h	50.3 ± 7.4	99.4 ± 0.2	4 h	90.0 ± 3.2	97.6 ± 0.7	2 h	97.9 ± 0.3	95.1 ± 2.6
	2 h	49.5 ± 2.5	99.6 ± 0.1	8 h	92.3 ± 2.1	96.9 ± 1.0	24 h	79.2 ± 2.9	86.8 ± 2.6
				24 h	91.9 ± 1.8	95.4 ± 2.1	7 d	48.9 ± 1.5	77.5 ± 2.3
DTPA	30 min	84.3 ± 0.9	97.8 ± 0.2	1 h	94.3 ± 0.9	98.7 ± 0.3	1 h	99.1 ± 0.2	98.9 ± 0.5
	1 h	78.0 ± 1.4	99.4 ± 0.1	4 h	92.5 ± 0.5	98.9 ± 0.7	2 h	99.1 ± 0.1	96.2 ± 3.2
	2 h	45.7 ± 1.3	99.6 ± 0.3	8 h	93.8 ± 1.2	96.9 ± 1.5	24 h	80.4 ± 5.4	82.8 ± 4.7
				24 h	93.4 ± 1.1	92.6 ± 3.2	7 d	59.0 ± 14.3	72.9 ± 5.6

Radiochemical Evaluation with ^{177}Lu

General labelling procedures for DOTA conjugated radiopharmaceuticals with n.c.a. ^{177}Lu showed that DOTA is capable of complexing ^{177}Lu in molar ratios from 1 : 5 to 1 : 10 for save reproducible quantitative labelling. 100 MBq of ^{177}Lu is around 0.1 nmol. ^{177}Lu-labelling with 0.5 nmol AAZTA^5 (ratio 1 : 5) showed quantitative yields of >95% already after 1 min at room temperature. Formation of [^{177}Lu]Lu-AAZTA^5-TOC had lower kinetics, yet also leading to yields of >95% after 5 min. Both showed rapid labelling with ^{177}Lu in less than 1 min at 1 nmol precursor. Labelling behaviour was the same for pH 4.5 and 5.5. Labelling of 500 MBq ^{177}Lu with 5 nmol precursor (for stability studies) were also performed yielding >95% after 1 min reaction time at room temperature.

Table 3 Radiolabelling data for [^{177}Lu]Lu-AAZTA^5 and [^{177}Lu]Lu-AAZTA^5-TOC

	^{177}Lu-Radiolabelling			
pH	4.5		5.5	
ligand : Lu ratio	AAZTA^5	AAZTA^5-TOC	AAZTA^5	AAZTA^5-TOC
5 : 1	97.9 ± 1.6	98.9 ± 0.5	99.9 ± 0.2	97.7 ± 1.5
10 : 1	98.6 ± 0.8	98.7 ± 1.1	99.3 ± 0.7	99.6 ± 0.1

Stability studies showed for both the free chelator as well as the AAZTA^5-TOC good stabilites of >90% against HS and PBS over 24 h. Stabilities against EDTA and DTPA were slightly lower with >85% after 24 h. Longer studies of 7 d yielded a good stability against PBS with >90% and a small degradation in HS with >85% (mostly adsorption on serum proteins, visible by precipitation). 7 d stability values for EDTA and DTPA gave increasing instability down to 75 and 70% respectively for AAZTA^5-TOC and to 60 and 50% respectively for the free chelator.

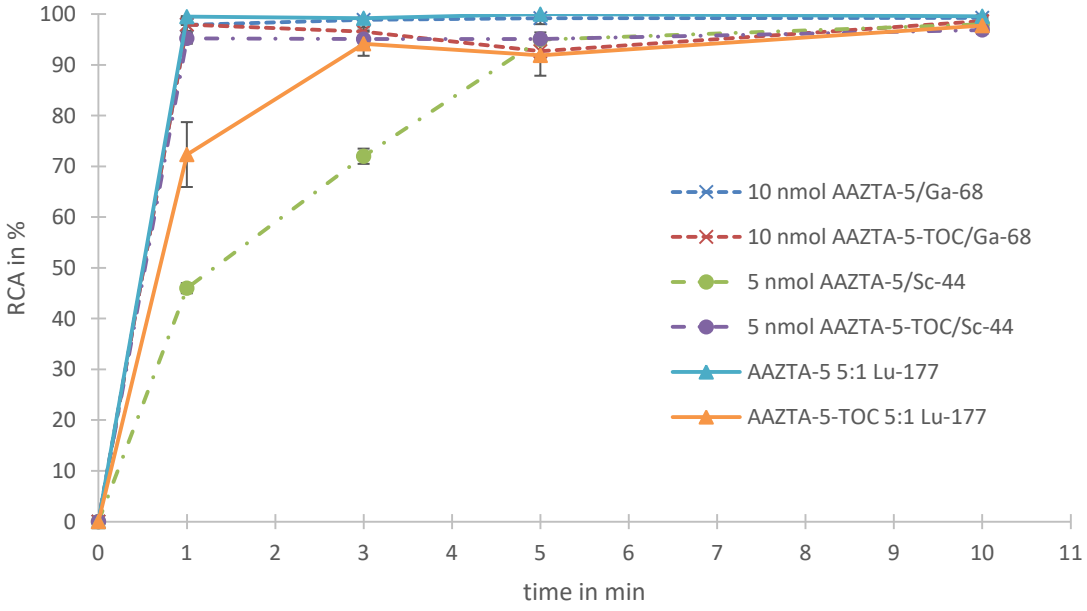


Figure 2: radio labelling kinetics for lowest precursor amounts to reach reproducible quantitative yields within 10 min at room temperature

Discussion

Our experience concerning the synthesis of DATA^{5m}-TOC [16] could be transferred, with adjustments on the alkylation step, to prepare the free chelator AAZTA^5 and its TOC derivative AAZTA^5-TOC in good yields. Purification of the final molecule showed nearly the same retention times on HPLC revealing near no influence of the extra acid group.

Radiolabelling with ^{68}Ga showed good and rapid complexation at room temperature with quantitative yields in less than 5 min for both the free chelator as well as the AAZTA^5-TOC. The complexation also worked on pH 5.5 without showing issues forming colloidal ^{68}Ga, giving the same high yields after 5 min as for pH 4.5. This proves that elevation of the pH does not affect the labelling

in a negative way. This rapid labelling at room temperature represents a significant advantage of AAZTA^5 over DOTA. Second, fast labelling kinetics of DOTA also demand higher temperatures and precursor amounts and this demonstrates the most relevant feature of AAZTA^5 compared to DOTA-derivatives.

Stability of the free [^{68}Ga]Ga-AAZTA^5 complex was not 100% over the 2 h, releasing 10-15% of the ^{68}Ga against HS and PBS consistent with literature [15, 27]. However, and extremely interesting, [^{68}Ga]Ga-AAZTA^5-TOC was completely stable over 2 h against HS and PBS, showing a positive effect of the TOC on the stability. Due to the short spacer between the chelator and the TV this could be a steric influence of the peptide moiety, but also the contribution of the amide formed in the coupling process may influence ^{68}Ga coordination. It appears to be necessary to study the impact of moieties other then TOC to further understand this phenomenon. Adding EDTA or DTPA to the PBS increased the instability for AAZTA^5, whereas AAZTA^5-TOC remained fully stable. Since EDTA and DTPA mostly compete for the ^{68}Ga rather the weaken the complex itself, this displays a constant recomplexation by the AAZTA^5 lowered by competition with the ETDA and DTPA, that had no effect on the AAZTA^5-TOC because no ^{68}Ga was released.

Rapid and quantitative ^{44}Sc-AAZTA complex formation (both AATZA^5 and AAZTA^5-TOC) at room temperature with low precursor amounts of 5 nmol demonstrate that the AAZTA structure is almost ideal for labelling ^{44}Sc. With 100 MBq ^{68}Ga in contrast to 50 MBq ^{44}Sc the effective amount of radiometal used per labelling was even higher for ^{44}Sc due to its longer half -ife time. In fact 50 MBq ^{44}Sc contain near double the nmol of radio metal compared to 100 MBq ^{68}Ga. Using half of the precursor amount on double the nmol radio metal leads to a chelator to radio metal ratio in the labelling solution that is 4 times lower in the ^{44}Sc labelling than for ^{68}Ga one. In addition. less precursor is also lowering the chelator concentration in the labelling solution. Consequently, AAZTA^5 and AAZTA^5-TOC have outstanding labelling capabilities for ^{44}Sc. [^{44}Sc]Sc-AAZTA^5 and [^{44}Sc]Sc-AAZTA^5-TOC were completely stable against HS and PBS over two times the half-lifes of ^{44}Sc and even stable after 24 h. Only the addition of EDTA and DTPA showed a small release of the ^{44}Sc after 24 h while the complexes are stable over 8 h. Combining the rapid quantitative radiolabelling with the good stability, AAZTA^5 and AAZTA^5-TOC offer optimal labelling capabilities for ^{44}Sc.

Radiolabelling with ^{177}Lu was performed in equimolar ratios showing that even a ratio of 1 : 5 between radiometal and chelator gave quantitative yields. Using ratios of 1 : 10, rapid labelling is observed after 1 min already at room temperature. Adjusting the pH to 5.5 had no influence on labelling speed or yields showcasing the same stable labelling as seen before with ^{68}Ga and ^{44}Sc. Stability over 24 h showed both the AAZTA^5 as well as the AAZTA^5-TOC to be stable against HS and PBS with a slight decomplexation against ETDA and DTPA. After 7 days both complexes stay intact

against PBS whereas the degradation by addition of EDTA and DTPA increases. For HS, some adsorption to serum proteins was observed by precipitation, while most of the complex stays intact. Overall, the complex stability is good for PBS and needs further evaluation *in vivo* to see the influence of the data from the HS.

Conclusion

The chimerical tria-aza-type AAZTA^5 chelator showed rapid quantitative radiolabelling at room temperature with low precursor amounts up to pH 5.5 for ^{68}Ga, ^{44}Sc and ^{177}Lu. Attaching TOC forming the AAZTA^5-TOC had no influence on the labelling proving the good labelling capabilities can be transferred. The ^{68}Ga complex of AAZTA^5 was not stable as predicted, but AAZTA^5-TOC showed complete stability revealing a strong positive effect of the TV on the stability. This effect needs further research. The [^{44}Sc]Sc-AAZTA^5 complex as well as [^{44}Sc]Sc-AAZTA^5-TOC were completely stable followed by the ^{177}Lu complexes being stable over 24 h with small degradation after 7 days. AAZTA^5 appears to be an excellent chelator for mild rapid labelling of both nuclides forming a theranostic pair.

ACKNOWLEDGEMENT

We thank ITM (Garching, Germany) for the supply of n. c. a. ^{177}Lu for all radiolabellings performed in this work.

References

1. Baum RP, Kulkarni HR. Theranostics: From molecular imaging using Ga-68 labeled tracers and PET/CT to personalized radionuclide therapy - the bad berka experience. Theranostics. 2012;2(5):437-447.

2. Baum RP, Rösch F. Theranostics, Gallium-68, and Other Radionuclides.; 2013.

3. Rösch F, Herzog H, Qaim SM. The Beginning and Development of the Theranostic Approach in Nuclear Medicine , as Exemplified by the Radionuclide Pair ^{86}Y and ^{90}Y. 2017.

4. Khawar A, Eppard E, Sinnes JP, et al. [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 Biodistribution and Dosimetry in Patients With Metastatic Castration-Resistant Prostate Carcinoma. Clin Nucl Med. February 2018:1.

5. Roesch F. Scandium-44: Benefits of a Long-Lived PET Radionuclide Available from the ^{44}Ti/^{44}Sc Generator System. Curr Radiopharm. 2012;5(3):187-201.

6. Kerdjoudj R, Pniok M, Alliot C, et al. Scandium(III) complexes of monophosphorus acid DOTA analogues: a thermodynamic and radiolabelling study with ^{44}Sc from cyclotron and from a ^{44}Ti/^{44}Sc generator. Dalt Trans. 2016;45(4):1398-1409.

7. Tsionou MI, Knapp CE, Foley CA, et al. Comparison of macrocyclic and acyclic chelators for gallium-68 radiolabelling. RSC Adv. 2017;7(78):49586-49599.

8. Price EW, Orvig C. Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals. Chem Soc Rev. 2014;43(1):260-290.

9. Roesch F. Scandium-44: benefits of a long-lived PET radionuclide available from the ^{44}Ti/^{44}Sc generator system. Curr Radiopharm. 2012;5(3):187-201.

10. Eisenwiener KP, Prata MIM, Buschmann I, et al. NODAGATOC, a new chelator-coupled somatostatin analogue labeled with [$^{67/68}$Ga] and [^{111}In] for SPECT, PET, and targeted therapeutic applications of somatostatin receptor ($hsst_2$) expressing tumors. Bioconjug Chem. 2002;13(3):530-541.

11. Schuhmacher J, Klivenyi G, Hull WE, et al. A bifunctional HBED-derivative for labeling of antibodies with ^{67}Ga, ^{111}In and ^{59}Fe. Comparative biodistribution with ^{111}In-DPTA and ^{131}I-labeled antibodies in mice bearing antibody internalizing and non-internalizing tumors. Nucl Med Biol. 1992;19(8):809-824.

12. Berry DJ, Ma Y, Ballinger JR, et al. Efficient bifunctional gallium-68 chelators for positron emission tomography: tris(hydroxypyridinone) ligands. Chem Commun (Camb). 2011;47(25):7068-7070.

13. Boros E, Ferreira CL, Cawthray JF, et al. Acyclic Chelate with Ideal Properties for ^{68}Ga PET Imaging Agent Elaboration. J Am Chem Soc. 2010;132(44):15726-15733.

14. Boros E, Ferreira CL, Yapp DTT, et al. RGD conjugates of the H_2dedpa scaffold: Synthesis, labeling and imaging with ^{68}Ga. Nucl Med Biol. 2012;39(6):785-794.

15. Waldron BP, Parker D, Burchardt C, et al. Structure and stability of hexadentate complexes of ligands based on AAZTA for efficient PET labelling with gallium-68. Chem Commun (Camb). 2013;49:579-581.

16. Seemann J, Waldron B, Parker D, Roesch F. DATATOC: a novel conjugate for kit-type ^{68}Ga labelling of TOC at ambient temperature. EJNMMI Radiopharm Chem. 2017;1(1):4.

17. Farkas E, Nagel J, Waldron BP, et al. Equilibrium, Kinetic and Structural Properties of Gallium(III) and Some Divalent Metal Complexes Formed with the New DATA^{m} and DATA^{5m} Ligands. Chem - A Eur J. 2017;23(43):10358-10371.

18. Pfister J, Summer D, Rangger C, et al. Influence of a novel, versatile bifunctional chelator on theranostic properties of a minigastrin analogue. EJNMMI Res. 2015;5(1):74.

19. Nagy G, Szikra D, Trencsényi G, et al. AAZTA: An Ideal Chelating Agent for the Development of ^{44}Sc PET Imaging Agents. Angew Chemie Int Ed. 2017:2118-2122.

20. Manzoni L, Belvisi L, Arosio D, et al. Synthesis of Gd and ^{68}Ga Complexes in Conjugation with a Conformationally Optimized RGD Sequence as Potential MRI and PET Tumor-Imaging Probes. ChemMedChem. 2012;7(6):1084-1093.

21. Zhernosekov KP, Filosofov D V, Baum RP, et al. Processing of Generator-Produced Medical Application for. Nucl Med. 2007;48(10):1741-1748.

22. Zhernosekov KP, Filosofov D V, Baum RP, et al. Processing of generator-produced ^{68}Ga for medical application. J Nucl Med. 2007;48(10):1741-1748.

23. Sandhöfer B. Untersuchungen zum Aufnahmemechanismus von O-(2-[^{18}F]Fluorethyl)-L-tyrosin; Synthese und Evaluierung von ^{68}Ga-markierten Tyrosin-Derivaten: Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz. 2010.

24. Filosofov BD V, Loktionova NS, Rösch F. A ^{44}Ti/^{44}Sc radionuclide generator for potential application of ^{44}Sc-based PET-radiopharmaceuticals. 2010;156:149-156.

25. Pruszyński M, Loktionova NS, Filosofov D V., Rösch F. Post-elution processing of ^{44}Ti/^{44}Sc generator-derived ^{44}Sc for clinical application. Appl Radiat Isot. 2010;68(9):1636-1641.

26. Lebedev NA, Novgorodov A, Misiak R, Brockmann J, Rösch F. Radiochemical separation of no-carrier-added Lu-177 as produced via the Yb-176 (n ,γ) Yb-177 → ^{177}Lu process. Appl Radiat Isot. 2000;53:421-425.

27. Baranyai Z, Uggeri F, Maiocchi A, et al. Equilibrium, Kinetic and Structural Studies of AAZTA Complexes with Ga^{3+}, In^{3+} and Cu^{2+}. Eur J Inorg Chem. 2013;(1):147-162.

5.2 [^{44}Sc]Sc-AAZTA^{5}-PSMA for radiotheranostics in tandem with [^{177}Lu]Lu-AAZTA^{5}-PSMA: radiolabeling and stability with ^{68}Ga, ^{44}Sc and ^{177}Lu and preclinical investigation

Jean-Philippe Sinnes[1], Ulrike Bauder-Wüst[2], Martin Schäfer[2], Klaus Kopka[2], Frank Rösch[1*]

Author details:

[1]Johannes Gutenberg-University Mainz, Institute of Nuclear Chemistry, Germany

[2]German Cancer Research Center (DKFZ), Division of Radiopharmaceutical Chemistry Heidelberg, Germany

[3]German Cancer Consortium (DKTK), Heidelberg, Germany

Correspondence: frank.roesch@uni-mainz.de / Tel. +49 6131 39 25302

Abstract

Purpose. The AAZTA chelator and in particular it´s bifunctional derivative AAZTA^5 was recently investigated to demonstrate unique capabilities to complex diagnostic and therapeutic radiometals under mild conditions such as ^{44}Sc and ^{177}Lu. To see the influence of the chelator exchange on the targeting molecules *in vitro* behavior, we substituted the established DOTA by AAZTA^5 on the prominent theranostic radiopharmaceutical PSMA-617. We evaluated the radiolabeling characteristics and *in vivo* stability with the clinically used radiometals ^{68}Ga and ^{44}Sc (corresponding positron emitters) as well as with ^{177}Lu (beta minus particle emitter) and evaluated their binding affinity and internalization behavior on LNCaP cells in direct comparison to the radiolabeled PSMA-617 DOTA-conjugates, used as gold standard tracers.

Methods. AAZTA^5 was synthesized in a five step synthesis and then coupled to the PSMA-617 backbone on solid phase. Radiochemical evaluation with ^{68}Ga, ^{44}Sc and ^{177}Lu was performed at room temperature with varying precursor amounts. After quantitative radiolabeling was achieved, stabilities against human serum, PBS buffer and EDTA/DTPA have been tested. *In vitro* studies on PSMA-positive LNCaP cells were performed in direct comparison to radiolabeled PSMA-617. The binding affinities were evaluated in an established competition binding assay against PSMA-10, resulting in corresponding inhibition constants (K_i). Internalization was tested for all radiolabeled complexes of AAZTA^5-PSMA with the complimentary PSMA-617 complexes in the same assay.

Results. AAZTA^5-PSMA achieved quantitative radiolabeling of >99% with all three radionuclides tested after less than 5 min at room temperature. While there was a small degradation of the ^{68}Ga-complex over 2 h in human serum, PBS and EDTA/DTPA, the ^{44}Sc- and ^{177}Lu-complexes were stable at 2 h and remained stable over 8 h and 24 h. For all three radiometal complexes low nanomolar affinities in the range of 10-30 nM (Ki) were determined. Internalization studies in direct comparison to the respective PSMA-617 complexes demonstrated higher surface specific binding for AAZTA^5-PSMA complexes, but also comparably good internalization. Surface to internalization ratios were in the same range compared to the ones of PSMA-617 tested in the same assay.

Conclusion. The AAZTA^5-PSMA presented here proved fast and quantitative radiolabeling with all three radiometal complexes at room temperature, excellent stability with ^{44}Sc, good stability with ^{177}Lu and medium stability with ^{68}Ga in all three media, i.e. human serum, PBS and EDTA/DTPA. All three AAZTA^5-PSMA complexes show similar or better binding affinities and internalization in LNCaP cells compared to that of radiolabeled PSMA-617 complexes. Therefore, AAZTA^5-PSMA demonstrated that exchange of the chelator DOTA for the new complexing agent AAZTA^5 in PSMA-617 had no negative influence on the *in vitro* LNCaP cell binding characteristics. In fact, a positive effect could be

observed in respect to an improved internalization behavior. In combination with the faster and milder radiolabeling features, AAZTA^5-PSMA demonstrates promising potential for *in vivo* application for imaging and therapy of prostate cancer.

Keywords: Scandium-44, Lutetium-177,AAZTA, AAZTA^5-PSMA, PSMA-617, PET, theranostics

Introduction

In modern nuclear medicine efficient treatment of cancer (such as prostate cancer) is nowadays possible with theranostic radiopharmaceuticals used both for imaging and endoradiotherapy. Possible targeting molecules need to be radiolabeled with radionuclides like ^{68}Ga, ^{18}F or ^{44}Sc to non-invasively visualize tumor lesions at the molecular level by means of positron emission tomography (PET) thereby improving surgery planning and subsequently patient's outcome. The targeting molecules normally are chemically modified as precursors for radiolabeling with clinical relevant radionuclides. In case of theranostic radiopharmaceuticals it is optimal when the precursor can not only be used for radiolabeling with aforementioned radiometals for PET imaging, but also for radiolabeling with the modern therapeutically relevant radionuclides ^{177}Lu and ^{90}Y (both beta minus particle emitters) as well as ^{225}Ac (alpha particle emitter) to impair tumor tissue by the endoradiotherapy approach. In combination imaging and therapy made up the new field of theranostics, which has become more important over the last decade [1].

All aforementioned therapeutically relevant radionuclide are radiometals and need as such a chelator for complexing them since no covalent bound to targeting molecules is possible. These radiometals differ strongly from the aforementioned radiometals for PET imaging in size and electron shell conformation as they are from lower periods. To achieve the aforementioned optimal condition of a theranostic radiopharmaceutical, that can be radiolabeled with both an imaging as well as an therapeutical radionuclide, the chelator used have to be capable of radiolabel two relatively different radiometals, i.e. ^{44}Sc and ^{177}Lu for example. The use of two different chelators, one been optimal for ^{44}Sc and the other for ^{177}Lu, could lead to different *in vivo* behavior of the two complexes. This results in one of the basic requirements for theranostic chelators: fast and convenient labeling of two different radiometals that vary in their position in the periodic system. Especially from ^{68}Ga and ^{44}Sc, two metals from the fourth period, to ^{177}Lu, as part of the lanthanides in the fifth period, there is a strong difference in complex geometry and amount of binding sides the chelator has to offer for stable complexation. Whereas gallium complexes in general need 6 coordination sides, lutetium prefer a coordination up to 8 [2, 3].

In addition to the requirements of the radiometals, the targeting molecule development is shifting more and more towards complex biomolecules that have to be handled at physiological conditions as they are not stable at high temperature and low pH. To use these targeting molecules for theranostic applications, chelators need to be identified that are capable of fast and easy radiolabeling of both imaging as well as therapy radionuclides at low temperature (around room

temperature) and elavated pH (near physiological pH of 7). The currently most used chelator for theranostics is DOTA, which is capable to coordinate many theranostic radionuclides, but needs elevated temperatures (95 °C optimal) and low pH (around 4) for fast radiolabeling. Two good examples of radiopharmaceuticals with a DOTA chelator that are already in use as theranostic agents are the SSTR-targeting molecules DOTA-TOC and DOTA-TATE, somatostatin analoga clinically used for imaging and therapy of neuroendocrine tumors [4, 5], and PSMA-617, targeting the prostate specific membrane antigen for treatment of prostate cancer [6-8]. Both have been radiolabeled with ^{68}Ga and ^{44}Sc [7, 9] for imaging and dosimetry as well as with ^{177}Lu for therapy [8]. Both targeting molecules are capable of handling elevated temperatures as well as labeling pH of 4 without degradation.

To meet the requirements of sensitive biomolecules, there has been two proper candidates for radiolabeling at room temperature and a wide pH range, such as: THP [10, 11] and AAZTA^{CN} [12, 13]. AAZTA^{CN} showed good radiolabeling efficiency with not only ^{68}Ga, but also ^{44}Sc and ^{177}Lu. In this work we used the AAZTA^{5} chelator which has been developed in direct comparison to the DATA^{5m} [14]. The free chelator, AAZTA^{5}, and the AAZTA^{5}-TOC have been synthesized and evaluated in terms of radiolabeling capabilities and stabilities of the complexes with ^{68}Ga, ^{44}Sc and ^{177}Lu (siehe **5.1**).

Promising results of the radiolabelled AAZTA^{5}-TOC made it interesting to see if the exchange of DOTA to AAZTA^{5} conjugated to the Glu-urea-Lys binding motif through the 2-naphthyl-L-Ala-AMCH- linker of PSMA-617. For PSMA derivatives a well evaluated *in vitro* affinity assay based on LNCaP cells has been developed in Heidelberg [6]. Data has been published already for ^{68}Ga-, ^{44}Sc- and ^{177}Lu-labeled PSMA-617, which can be used for direct comparison to the new AAZTA^{5}-PSMA [6, 15, 16].

Here we suggest the new compound AAZTA^{5}-PSMA (figure 1) for theranostic treatment of prostate cancer with ^{68}Ga, ^{44}Sc and ^{177}Lu. In this work we evaluate radiolabeling and stability as well as PSMA-binding affinities and internalization for LNCaP-PSMA-expressing cell lines. Parallel studies performed with ^{68}Ga-, ^{44}Sc- and ^{177}Lu-labeled PSMA-617 finally allow a systematic comparison of the DOTA- and AAZTA^{5}-conjugate.

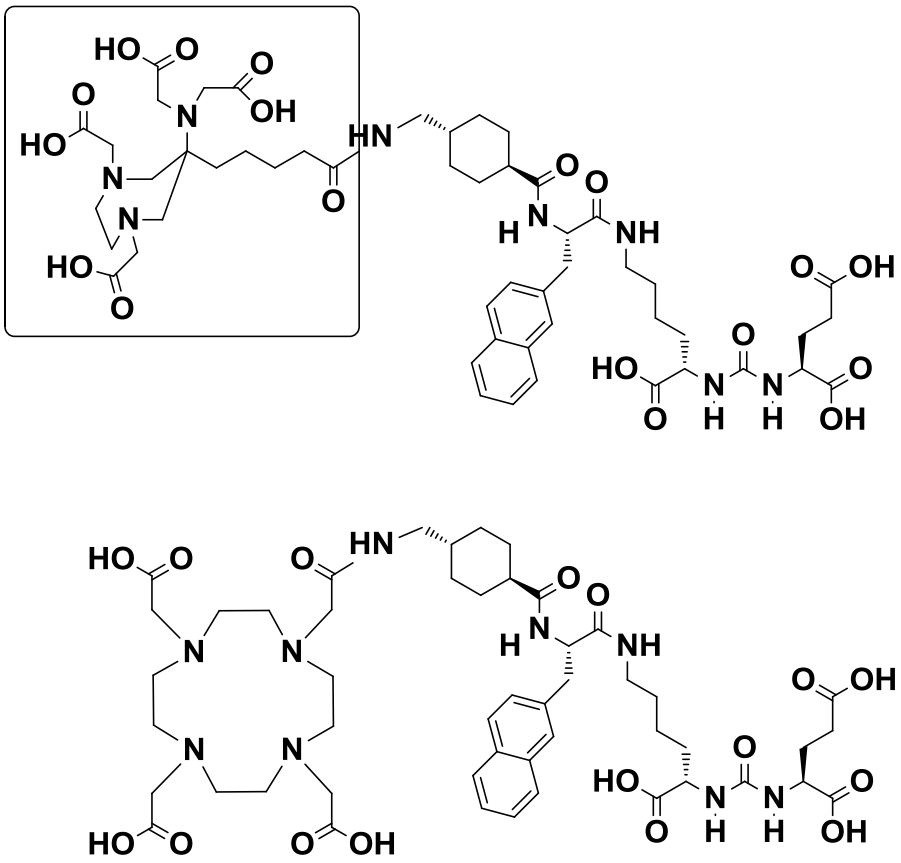


Figure 1: AAZTA[5]-PSMA and PSMA-617, AAZTA[5] highlighted

Methods

Synthesis of AAZTA[5]-PSMA

AAZTA[5] was synthesized in 5-steps to afford the ready for coupling derivative [siehe **5.1**]. The PSMA-617 backbone was synthesized on solid phase following the established procedure from Heidelberg [15]. A standard amide coupling using HBTU/HOBt and DIPEA was performed to couple the AAZTA[5] to PSMA on solid phase. The product was cleaved of the resin combined with full deprotection by TFA. HPLC purification was performed on a LUNA column (Phenomenex® Luna® 10 µm C18(2) 100 Å) with a slow gradient of 25 - 30 % MeCN (+0,1 % TFA)/75 - 70 % water (+0,1 % TFA).

Radiolabeling with ^{68}Ga, ^{44}Sc and ^{177}Lu

For radiochemical evaluation with ^{68}Ga, a ^{68}Ge/^{68}Ga generator (TiO_2-based matrix, Cyclotron Co. Obninsk, Russia) was used with ongoing acetone post-processing separating iron and zinc impurities as well as ^{68}Ge breakthrough [17, 18]. Ga-68 radiolabeling for *in vitro* studies was performed with a

$^{68}Ge/^{68}Ga$ generator based on a pyrogallol resin located in Heidelberg [19]. Radiolabeling with ^{44}Sc was performed with a 150 MBq $^{44}Sc/^{44}Ti$ generator [20, 21] developed and located in Mainz. The ^{177}Lu, produced via the ^{176}Yb-pathway, was provided by itG [22].

Labeling was performed in 1 ml of 0.2 M ammonium acetate buffer pH 4.5 at room temperature (25 °C). For ^{44}Sc, due to the general post processing, the nuclide is provided in 0.25 M ammonium acetate buffer pH 4 [21]. Kinetic studies were done with 50 MBq for ^{44}Sc and 100 MBq for ^{68}Ga and ^{177}Lu and aliquot were taken at different time points of 1, 3, 5 and 10 minutes. The pH was controlled at start of labeling and after labeling was finished.

For reaction control TLC with citrate buffer, pH 7, as eluent and radio HPLC (Merck Chromolith® RP-18e-column, Water : MeCN with 0.1% TFA, 5 to 95% MeCN in 10 min) was used. TLC´s were measured in RITA TLC imager (Elysia Raytest). The citrate TLC showed free radio metal with an Rf of 0,9 and all labelled compound sticked to an Rf of 0.1 to 0.3. Radio HPLC was used to exclude the presence of colloidal radiometals not visible on TLC.

Stability studies

Stability studies were performed in HS, PBS and EDTA/DTPA solution (pH adjusted to 7 by PBS buffer) in triplicate. Only radio labelings with >95 % labeling yield were used and time points were adjusted to the nuclides halftime: ^{68}Ga – 0.5, 1, 2 hours; ^{44}Sc – 0.5, 1, 4, 8 , 24 hours; ^{177}Lu –1, 2 4 , 24 hours HS (human male AB plasma, USA origin) were bought from Sigma Aldrich , PBS was prepared with a BupH™ Phosphate Buffered Saline Pack (PIERCE), EDTA/DTPA solution were prepared using the prepared PBS buffer and adding ETDA/DTPA to a 0,01 M concentration. Final procedure used 50 - 70 µl of the labeling solution added to 1 ml of stability solution. Final pH was controlled to ensure no influence of the labeling buffer on the stability solution.

Affinity studies/cell binding studies

The *in vitro* experiments were performed using the PSMA-positive LNCaP cell line (androgen-sensitive human lymph node metastatic lesion of prostatic adenocarcinoma, CRL-1740 [American Type Culture Collection]) [6]. For negative control PSMA−PC-3 cells (bone metastasis of a grade IV prostatic adenocarcinoma, ATCC CRL-1435) were used [23]. The cells were cultured in RPMI1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum and L-glutamine and incubated at 37 °C in an environment of humidified air containing 5% CO_2. The cells were harvested using trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (trypsin-EDTA; 0.05% trypsin, 0.02% EDTA, all from PAN Biotech).

Cell binding affinity was determined in competitive cell binding assay established in Heidelberg [23]. 10^5 LNCaP cells, per well,were incubated with [^{68}Ga]Ga-PSMA-10 0.75 nM in presence of 12 different concentrations (0 - 5000 nM) of cold complexes (natural Ga, Sc and Lu) of AAZTA^5-PSMA in a volume of 100 µl by shaking for 45min at room temperature and then removed using a multiscreen vacuum manifold (Millipore, Billerica, MA). Ongoing the cells were washed twice with 100 µL and once with 200 µL binding buffer at 5 °C. The cell containing filters were stamped out and measured in a gamma counter (Packard Cobra II, GMI, Minnesota, USA). Using a nonlinear regression algorithm (GraphPad Prism Software) the 50% inhibitory concentration (IC_{50}) values were calculated. Each sample was done in quadruple while the whole experiment was done three times.

Cold complexes of the AAZTA^5-PSMA with ^{nat}Ga, ^{nat}Sc and ^{nat}Lu were synthesized by adding 15 µL (150 nmol) of a 10 mM solution of the metal chlorides to 100 nmol of chelator in 85 µlL (1,5 : 1 = metall : chelator) and filling up to 200 µL with 0,4 M AmAc buffer pH 4,5. The solution of 0,2 M AmAc buffer pH 4,5 with a final concentration of 500 µM AAZTA^5-PSMA was shaken for 20 min at room temperature (25 °C) and quantitative complexation was reached after 20 min monitored by ESI LC-MS.

Internalisation studies

For internalization studies 10^5 LNCaP or PC-3 cells were seeded in poly(L-lysine)-coated 24-well cell culture plates at 37 °C in an environment of humidified air containing 5% CO_2 for 24 h. [24]. The medium will be removed and 250 µl of radiolabeld AAZTA^5-PSMA 30 nM will be replaced for 45min. One plate is being incubated at 37°C and the second one at 4°C to inhibit the internalization. The specifity of the ligands will be proofed by addition 500 µM of 2-(phosphonomethyl)-pentanedioic acid (PMPA, Axxora, Loerrach, Germany). After incubation the cells were washed three times with 1 ml ice cold PBS. To determine the surface bound activity cells were incubated 2x with 0.5 ml of glycine-HCl in PBS (50 mM, pH 2.8) each for 5 min at room temperature. Both washing steps were collected for measuring with a gamma counter (Packard Cobra II, GMI, Minnesota, USA). Before lysating the cells with 0.5 mL of 0.3 M NaOH to determine the internalized fractionthey were once washed with 1 ml ice cold PBS [23]. As standard PSMA-617 was taken and radiolabeld with the nuclides mentioned above.

Results

Radiolabeling and stability studies

AAZTA^5-PSMA was successfully radiolabeled in quantitative radiochemical yields (>99%, as determined by radio-HPLC and radio-TLC) with all three nuclides, ^{68}Ga, ^{44}Sc and ^{177}Lu, in less than 5 minutes at room temperature. Precursor amounts were optimized to 5 nmol (5,4 µg) for ^{68}Ga and ^{44}Sc and 0.6 nmol (0,65 µg) for ^{177}Lu (ratio 10 : 1 for chelator to radiometal). Final concentrations for the internalization studies of 6 µM (6 nmol/ml) were easily reached and final radiochemical purities of 99.9% (as determined by radio-HPLC) allowing direct use of the obtained product solution for the *in vitro* assay without further purification.

The stability studies, against human serum, PBS buffer and EDTA/DTPA in PBS buffer, showed [^{68}Ga]Ga-AAZTA^5-PSMA to be >95% stable against HS and >90% stable in PBS and EDTA/DTPA in PBS over 2 h. [^{44}Sc]Sc-AAZTA^5-PSMA was completely stable with > 95% over 8 h against HS, PBS and EDTA/DTPA in PBS and even stayed stable with >95% after 24 h against HS. The ^{177}Lu complex stabilities at 2 h were > 95% and remained stable over 8 h, while small degradations to 85 - 90% were observed after 24 h against HS. Stabilities of [^{177}Lu]Lu-AAZTA^5-PSMA against PBS and EDTA/DTPA in PBS are > 90% after 24 h.

In vitro binding affinity and internalization studies

In competitive binding studies against 0.75 nM [^{68}Ga]Ga-PSMA-10 all three non-radioactive metal complexes of AAZTA^5-PSMA gave good IC_{50} values, showing corresponding nanomolar binding affinities of 10.4 ± 1.13 nM for the gallium complex, 31.78 ± 13.34 nM for the scandium complex and 36.65 ± 13.8 nM for the lutetium complex. The relatively high SD in case of the scandium and the lutetium complex are justified by 9 total measurements over 9 experimental days (SD on each day ± 1-2), whereas the gallium complex were tested twice on the same day. With each measurement being quadruple, total repetition were n = 8 for the gallium complex and n = 36 for the scandium and the lutetium complex, respectively. By applying the Cheng-Prusov equation (figure 2) on the IC_{50} values the following inhibition constants were obtained (table 1) [25].

Table 1: Inhibition constants (K_i in nM) of [^{nat}Ga]Ga-PSMA-11, [^{nat}Ga]Ga-, [^{nat}Sc]Sc-, [^{nat}Lu]Lu-PSMA-617 and - AAZTA^5-PSMA; internalization values (IA = activity used) of [^{68}Ga]Ga-PSMA-11, [^{68}Ga]Ga-, [^{44}Sc]Sc-, [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 and - AAZTA^5-PSMA

derivative	Ki ± SD / nM		Internalisation ± SD / %IA/10^6 cells	
[$^{nat/68}$Ga]Ga-PSMA-11	12.0 ± 2.80	[23]	9.47 ± 2.56	[6]
[$^{nat/68}$Ga]Ga-PSMA-617	6.40 ± 1.02	[6]	17.67 ± 4.35	[6]
[$^{nat/68}$Ga]Ga-AAZTA^5-PSMA	8.69 ± 0.95		13.02 ± 0.24	
[$^{nat/44}$Sc]Sc-PSMA-617	4.72 ± 0,78	[9]	15.78 ± 2.14	[9[
[$^{nat/44}$Sc]Sc-AAZTA^5-PSMA	30.57 ± 11.53		19.96 ± 0.88	
[$^{nat/177}$Lu]Lu-PSMA-617	6.91 ± 1.32	[6]	17.51 ± 3.1	[6]
[$^{nat/177}$Lu]Lu-AAZTA^5-PSMA	26.56 ± 11.14		17.96 ± 2.0	

$$K_i = \frac{IC_{50}}{(1 + \frac{c_{dim}}{K_d})}$$

Figure 2: Cheng-Prusof equation with: c_{dim} = concentration of PSMA-10 and K_d = dissociation constant of [^{68}Ga]Ga-PSMA-10

All three radiolabeled AAZTA^5-PSMA derivatives proved good internalization of 13 - 20 %IA / 10^6 cells (table 1) comparable to that of PSMA-617 published elsewhere [6, 9]. [^{68}Ga]Ga-AAZTA^5-PSMA were tested 3 times in triplicate (n = 9) with [^{68}Ga]Ga-PSMA-617 also in triplicate on the same plate. [^{68}Ga]Ga-PSMA-617 showed a relatively low internalization of 2.6 %IA / 10^6 so the [^{68}Ga]Ga-AAZTA^5-PSMA values were compared to the literature values shown in table 1. For [^{44}Sc]Sc-AAZTA^5-PSMA and [^{177}Lu]Lu-AAZTA^5-PSMA internalization was tested also 3 times in triplicate with the corresponding PSMA-617 complex on the same plate in triplicate. For both sets of derivatives the experiments were repeated on two different days displaying a really low internalization for all tested derivatives on day 1, but good results for the second day. Results from the first day were removed from the final display as both ^{44}Sc as well as ^{177}Lu-labeled PSMA-617 could not reach reasonable values, leading to the conclusion something must have gone wrong with the cell preparation. Both [^{44}Sc]Sc-AAZTA^5-PSMA and [^{177}Lu]Lu-AAZTA^5-PSMA reached high internalization of 19.96 ± 0.88 and 17.96 ± 2.0 %IA / 10^6 cells respectively (table 1). The corresponding radiolabeled PSMA-617 version reached equal to

literature values of 19 %IA / 10^6 cells for [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 and 8.5 %IA / 10^6 cells for [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 in the same experiment. For all substances the blocking with 2-PMPA was successful on 37 °C as well as 4 °C. All AAZTA^5-PSMA complexes showed high cell surface binding on 37°C as well as on 4 °C in comparison to the PSMA-617 complexes. Ongoing experiments on negative PC-3 cells proved no internalization or cell surface binding for both [^{44}Sc]Sc-AAZTA^5-PSMA and [^{177}Lu]Lu-AAZTA^5-PSMA. Also the ^{44}Sc and ^{177}Lu complexes of the free chelator AAZTA^5 were tested on LNCaP-cells showing no internalization or cell surface binding.

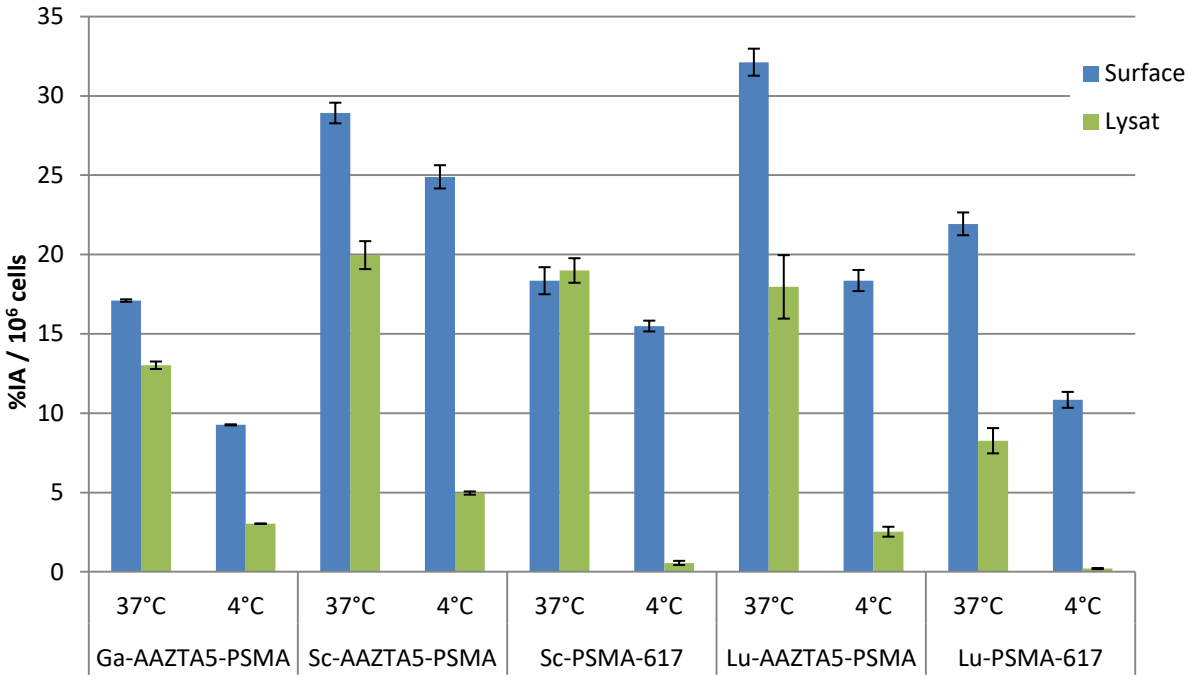


Figure 3: Internalization data of the ^{68}Ga, ^{44}Sc and ^{177}Lu complexes of AAZTA^5-PSMA and PSMA-617 in LNCaP cells.

Discussion

Radiochemistry

Quantitative radiolabeling with ^{68}Ga, ^{44}Sc and ^{177}Lu was achieved at room temperature for AAZTA^5-PSMA, whereas the DOTA-conjugate PSMA-617 needed elevated temperatures of 95 °C to reach quantitative yields. In addition, the AAZTA^5-PSMA derivatives showed much faster radiolabeling kinetics with quantitative yields obtained within less than 5 minutes at room temperature, whereas PSMA-617 with the same precursor amounts needed up to 20 min of radiolabeling to reach quantitative labeling at 95 °C. In summary radiolabeling of AAZTA^5-PSMA proved to be a good alternative compared to radiolabeling of the DOTA-conjugate PSMA-617, which corresponds with the literature for the free chelator [12] as well as with recent evaluations with AAZTA^5-TOC (siehe **5.1**).

Stability studies

[^{68}Ga]Ga-AAZTA^5-PSMA proved to be stable against HS with very small degradation over 2 h against PBS. This result corresponds to the values of [^{68}Ga]Ga-AAZTA^5-TOC (siehe **5.1**) where adding the targeting molecule TOC to the chelator stabilized the complex. The low-molecular weight molecule PSMA-617 seems to have the same stabilizing influence on the chelator as the cyclic petide TOC, but to a smaller extend. [^{68}Ga]Ga-AAZTA^5-PSMA was not as stable as [^{68}Ga]Ga-AAZTA^5-TOC, but still more stable compared to the ^{68}Ga complex with the free chelator, [^{68}Ga]Ga-AAZTA^5.

[^{44}Sc]Sc-AAZTA^5-PSMA was completely stable over 8 h with no degradation in HS even after 24h. This corresponds with the literature showing a high stability of the Sc-AAZTA complex (AAZTA-TOCpaper) [12]. The high stability in HS, PBS and EDTA/DTPA in PBS is one of the prerequisites that justifies first preclinical *in vivo* applications in the next steps. [^{177}Lu]Lu-AAZTA^5-PSMA displays high stability over 8 h, yet starts with degradation slowly after 24 h. It has to be taken into account that the stability was measured without any radiolysis quencher so radiolysis could have been occurred during 24 h..

Binding Affinity

The binding affinity for all three non-radioactive metal complexes of AAZTA^5-PSMA is in the low nM range. [^{nat}Ga]Ga-AAZTA^5-PSMA reached the same Ki value range of 5 - 7 nM as the PSMA-617 analogue, while proving a higher binding affinity as [^{nat}Ga]Ga-PSMA-11. Both [^{nat}Sc]Sc-AAZTA^5-PSMA and [^{nat}Lu]Lu-AAZTA^5-PSMA displayed a somewhat lower affinity of 25 - 30 nM. The most noticeable difference, beside AAZTA^5 being a chimeric chelator, i.e. shows both cyclic and acyclic features, what

mostly effects the radiochemistry, is the charge of -1 for the AAZTA^5 scandium and lutetium complexes. For DOTA, the necessary donor set consists of N_4O_2 to N_4O_4 , anyhow, at least one of the acid groups is part of the bifunctionalization to the targeting molecule. With a M^{3+} radiometal DOTA is forming a neutral complex, whereas the AAZTA^5 with a N_3O_4 core forms an overall negative charged complex (net. charge -1). This negative charge is created by the 4 acid groups that need to be deprotected for complexation and binding to the radiometal. The four negative charges of the acid groups overcompensate for the three positive charges of the radiometal. The complex of the gallium can be neutral because gallium do not need all donor atoms from the AAZTA^5 since gallium prefers an octahedral coordination sphere leaving one acid group empty, so that it can still be protonated while in complex. That explains why there is no negative effect on the gallium complex giving equal good affinity values compared to PSMA-617. The negative charge definitely can have an influence on the *in vitro* as well as the *in vivo* behavior of the targeting molecule. For *in vitro* the effect as seen can be a slightly lower affinity by charge rejection with the target molecule or cell surface, but it can also have positive effects if a negative charge on the TV would lead to a charge attraction or better interaction with the target cells. Looking on *in vivo* behavior the most likely effect would be a faster renal clearance due to a general faster clearance through kidneys of charged molecules. Faster clearance could be once again be positive if the target accumulation is fast enough so that a fast clearance lead to a better target to background ratio, but also negative if the accumulation is relatively slow leading to a renal excretion before a noticeable target accumulation. This needs to be evaluated by *in vivo* animal experiments in the future.

Internalization studies

The internalization studies demonstrated, that obviously the slightly lower binding affinities of [^{44}Sc]Sc-and [^{177}Lu]Lu- AAZTA^5-PSMA, have no negative influence on their internalization behavior. In fact, a positive effect was found with a much higher surface binding and comparably better internalization for [^{44}Sc]Sc-AAZTA^5-PSMA and [^{177}Lu]Lu-AAZTA^5-PSMA with 19.96 ± 0.88 and 17.96 ± 2.0 %IA / 10^6 cells, respectively. The internalization value for [^{68}Ga]Ga-AAZTA^5-PSMA is in the same range as [^{68}Ga]Ga-PSMA-617. For [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 and [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 values for direct comparison could be obtained as seen in figure 1. Comparing these values, a slightly better internalization for the [^{44}Sc]Sc-AAZTA^5-PSMA and a much better internalization for [^{177}Lu]Lu-AAZTA^5-PSMA were measured. Analyzing the surface binding and especially the surface and lysat values on 4 °C, much higher values for the AAZTA^5-PSMA complexes were obtained. Especially the high values on 4 °C lead to the assumption of a transport inside the cell, forced by the chelator itself. Taken into account that this effect could be blocked by 2-PMPA proves it cannot be a passive intake. This assumption was tested with [^{44}Sc]Sc-AAZTA^5 and [^{177}Lu]Lu-AAZTA^5 on PSMA positive LNCaP cells

leading to no surface activity or internalization. Also [^{44}Sc]Sc-AAZTA^{5}-PSMA and [^{177}Lu]Lu-AAZTA^{5}-PSMA were tested on PC-3 cells as a second negative experiment for double checking the 4 °C values with also no surface activity or internalization found. Comprising all AAZTA^{5}-PSMA complexes have good internalization with relative high surface activity and even some internalization at low temperature, which is not a passive intake more so a positive effect of the chelator swap. For internalization, a positive effect of the negative charge on the chelator may thus be assumed.

Altogether in our study [^{68}Ga]Ga-AAZTA^{5}-PSMA, [^{44}Sc]Sc- AAZTA^{5}-PSMA and [^{177}Lu]Lu-AAZTA^{5}-PSMA show very good characteristics suggesting these complexes as very good PSMA-targeting radiotracers so that in next steps especially the new AAZTA^{5}-PSMA complexes will be examined in first preclinical in vivo experiments. High binding affinity and high internalization indicate that [^{68}Ga]Ga-AAZTA^{5}-PSMA-617 and [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 could show high tumor accumulation and good contrast for PET imaging. For [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 a good tumor accumulation can be assumed too, but long term stability has to be observed over several days *in vivo*.

Conclusion

Radiolabeled AAZTA^{5}-PSMA proved to be highly stable new class of PSMA-targeting chelator-conjugates, useful for reliable ^{44}Sc-, ^{68}Ga- and ^{177}Lu-labeling under mild conditions. The three complexes examined here show very good binding affinities and excellent PSMA-specific internalization in LNCaP tumor cells, which correspond nicely with those of the radiolabeld PSMA-617 versions. This justifies to translate the AAZTA^{5}-PSMA-617 complexes into first preclinical in vivo studies.

ACKNOWLEDGEMENT

We thank ITM (Garching, Germany) for the supply of n. c. a. ^{177}Lu for all radiolabellings performed in this work.

References

1. Baum RP, Kulkarni HR. Theranostics: From molecular imaging using Ga-68 labeled tracers and PET/CT to personalized radionuclide therapy - the bad berka experience. Theranostics. 2012;2(5):437-447.

2. Parker D, Waldron BP, Yufit DS. Crystallographic and solution NMR structural analyses of four hexacoordinated gallium(III) complexes based on ligands derived from 6-amino-perhydro-1,4-diazepine. Dalton Trans. 2013;42:8001-8008.

3. Aimea S, Bargea A, Bottaa M, Fasanoa M, Bombieribq G. Crystal structure and solution dynamics of the lutetium(III) chelate of DOTA. 1996;246:1-7.

4. Gabriel M, Decristoforo C, Kendler D, et al. ^{68}Ga-DOTA-Tyr3-octreotide PET in neuroendocrine tumors: comparison with somatostatin receptor scintigraphy and CT. J Nucl Med. 2007;48(4):508-518.

5. Virgolini I, Ambrosini V, Bomanji JB, et al. Procedure guidelines for PET/CT tumour imaging with ^{68}Ga-DOTA- conjugated peptides: ^{68}Ga-DOTA-TOC, ^{68}Ga-DOTA-NOC, ^{68}Ga-DOTA-TATE. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2010;37(10):2004-2010.

6. Benešová M, Schäfer M, Bauder-Wüst U, et al. Preclinical Evaluation of a Tailor-Made DOTA-Conjugated PSMA Inhibitor with Optimized Linker Moiety for Imaging and Endoradiotherapy of Prostate Cancer. J Nucl Med. 2015;56(6):914-920.

7. Khawar A, Eppard E, Sinnes JP, et al. [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 Biodistribution and Dosimetry in Patients With Metastatic Castration-Resistant Prostate Carcinoma. Clin Nucl Med. February 2018:1.

8. Weineisen M, Schottelius M, Simecek J, et al. ^{68}Ga- and ^{177}Lu-Labeled PSMA I&T: Optimization of a PSMA-Targeted Theranostic Concept and First Proof-of-Concept Human Studies. J Nucl Med. 2015;56(8):1169-1176.

9. Eppard E, de la Fuente2 A, Benešová M, et al. Clinical translation and first in-human use of [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 for pet imaging of metastasized castrate-resistant prostate cancer. Theranostics. 2017;7(18).

10. Berry DJ, Ma Y, Ballinger JR, et al. Efficient bifunctional gallium-68 chelators for positron emission tomography: tris(hydroxypyridinone) ligands. Chem Commun (Camb). 2011;47(25):7068-7070.

11. Tsionou MI, Knapp CE, Foley CA, et al. Comparison of macrocyclic and acyclic chelators for gallium-68 radiolabelling. RSC Adv. 2017;7(78):49586-49599.

12. Nagy G, Szikra D, Trencsényi G, et al. AAZTA: An Ideal Chelating Agent for the Development of ^{44}Sc PET Imaging Agents. Angew Chemie Int Ed. 2017:2118-2122.

13. Pfister J, Summer D, Rangger C, et al. Influence of a novel, versatile bifunctional chelator on theranostic properties of a minigastrin analogue. EJNMMI Res. 2015;5(1):74.

14. Seemann J, Waldron B, Parker D, Roesch F. DATATOC: a novel conjugate for kit-type ^{68}Ga labelling of TOC at ambient temperature. EJNMMI Radiopharm Chem. 2017;1(1):4.

15. Benešová M, Bauder-Wüst U, Schäfer M, et al. Linker Modification Strategies to Control the Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA)-Targeting and Pharmacokinetic Properties of DOTA-Conjugated PSMA Inhibitors. J Med Chem. 2016;59(5):1761-1775.

16. Umbricht CA, Benešová M, Schmid RM, et al. ^{44}Sc-PSMA-617 for radiotheragnostics in tandem with 177Lu-PSMA-617—preclinical investigations in comparison with ^{68}Ga-PSMA-11 and ^{68}Ga-PSMA-617. EJNMMI Res. 2017;7(1):9.

17. Zhernosekov KP, Filosofov D V, Baum RP, et al. Processing of generator-produced ^{68}Ga for medical application. J Nucl Med. 2007;48(10):1741-1748.

18. Seemann J, Eppard E, Waldron BP, Ross TL, Roesch F. Cation exchange-based post-processing of ^{68}Ga-eluate: A comparison of three solvent systems for labelling of DOTATOC, NO2APBP and DATA^{m}. Appl Radiat Isot. 2015;98:54-59.

19. Schuhmacher J, Maier-Borst W. A new ^{68}Ge/^{68}Ga radioisotope generator system for production of ^{68}Ga in dilute HCl. Int J Appl Radiat Isot. 1981;32(1):31-36.

20. Filosofov BD V, Loktionova NS, Rösch F. A ^{44}Ti/^{44}Sc radionuclide generator for potential application of ^{44}Sc-based PET-radiopharmaceuticals. 2010;156:149-156.

21. Pruszyński M, Loktionova NS, Filosofov D V., Rösch F. Post-elution processing of ^{44}Ti/^{44}Sc generator-derived ^{44}Sc for clinical application. Appl Radiat Isot. 2010;68(9):1636-1641.

22. Lebedev NA, Novgorodov A, Misiak R, Brockmann J, Rösch F. Radiochemical separation of no-carrier-added Lu-177 as produced via the Yb-176 (n ,γ) Yb-177 → ^{177}Lu process. Appl Radiat Isot. 2000;53:421-425.

23. Eder M, Schäfer M, Bauder-Wüst U, et al. ^{68}Ga-complex lipophilicity and the targeting property of a urea-based PSMA inhibitor for PET imaging. Bioconjug Chem. 2012;23(4):688-697.

24. Mier W, Zitzmann S, Krämer S, et al. Influence of chelate conjugation on a newly identified tumor-targeting peptide. J Nucl Med. 2007;48(9):1545-1552.

25. Craig DA. The Cheng-Prusoff relationship: something lost in the translation. Trends Pharmacol Sci. 1993;14(3):89-91.

Ergänzung zu 5.2: Erste *in vivo* Tierstudien mit [^{44}Sc]Sc AAZTA^{5}-PSMA

Ergänzend zu den in Heidelberg generierten *in vitro* Daten für das AAZTA^{5}-PSMA wurden 2017 erste proof of prinziple *in vivo* Tierstudien an PSMA^{+}-tumortragenden Mäusen durch Dr. Ralf Bergmann im Helmholzzentrum Dresden Rossendorf durchgeführt. Da die Tierversuchseinrichtung in Dresden keinen Zugriff auf ^{44}Sc hat, wurde das ^{44}Sc in Mainz vom dortigen ^{44}Ti/^{44}Sc-Generator eluiert und unter Absprache mit dem Transporter per express nach Dresden geschickt. Dort konnte die Radiomarkierung erfolgreich durchgeführt und trotz der geringen Aktivität 4 Tiere gemessen werden. Es wurden vier tumortragenden Tiere injiziert, wobei drei als Kontrolle dienten und einem Tier mit dem [^{44}Sc]Sc AAZTA^{5}-PSMA der Blocker 2-PMPA coinjiziert wurde. Die Tiere trugen einen PSMA^{+} Tumor aus humanen LNCaP Zellen am rechten hinteren Oberschenkel.

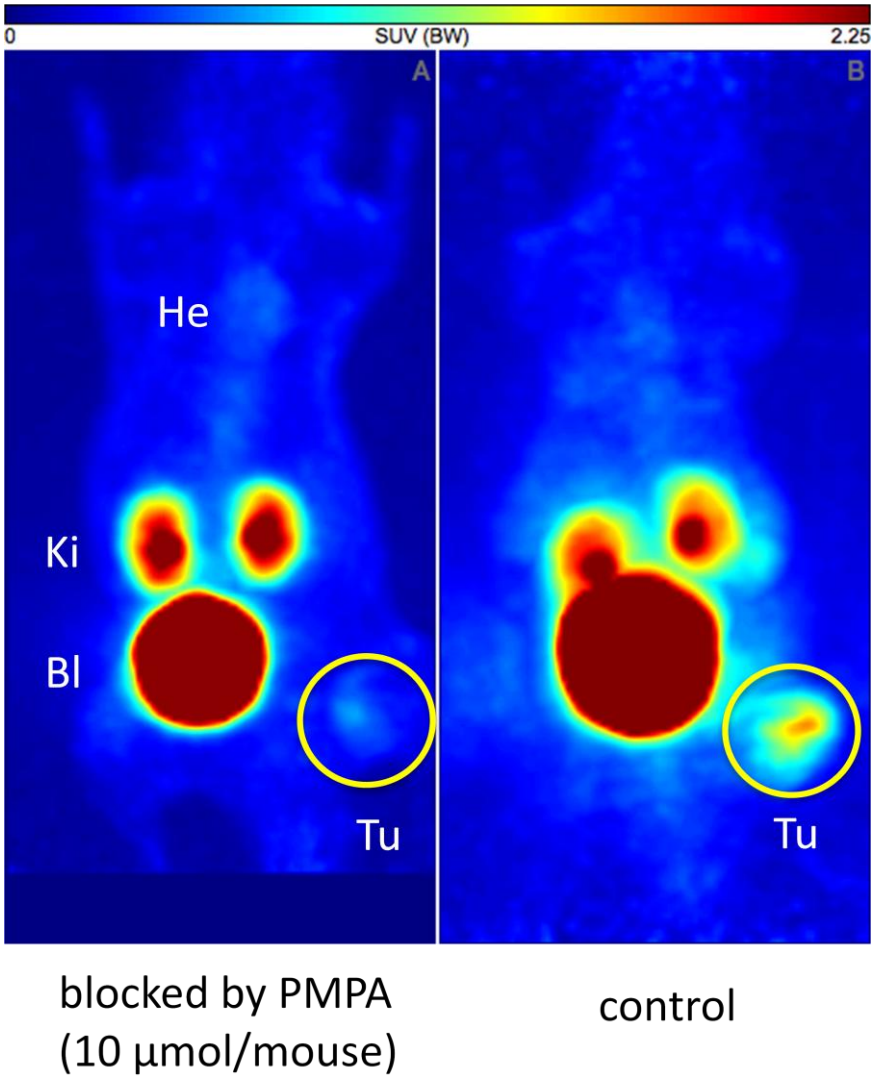


Abbildung 1: [^{44}Sc]Sc AAZTA^{5}-PSMA 90 min p. i.; links mit Blocking durch 2-PMPA und rechts Kontrolltier mit gut sichtbarem Tumor (Tu). Weiter markierte Organe: Herz = He, Niere = Ki, Blase = Bl.

[^{44}Sc]Sc AAZTA^{5}-PSMA zeigt 90 min p. i. (Abbildung 1) eine deutliche Anreicherung im Tumorgewebe, welche vollständig durch 2-PMPA blockbar war. Neben dem Tumor ist nur eine reine renale Ausscheidung zu erkennen und nahezu kein Uptake in einem anderen Organ. Wie in Abbildung 2 zu erkennen reichert sich das [^{44}Sc]Sc AAZTA^{5}-PSMA über 2 Stunden im Tomurgewebe an, wobei sich mit 2-PMPA die Aktivität konstant aus dem Tumor auswäscht, wie es auch von anderem Gewebe zu erwarten ist. Mit einem maximalen Verhältnis von 6 : 1 von Tumor zu Muskel und eine rein renalen Ausscheidung weist das [^{44}Sc]Sc AAZTA^{5}-PSMA optimale Bedingungen zur Visualisierung des Tumorgewebes auf.

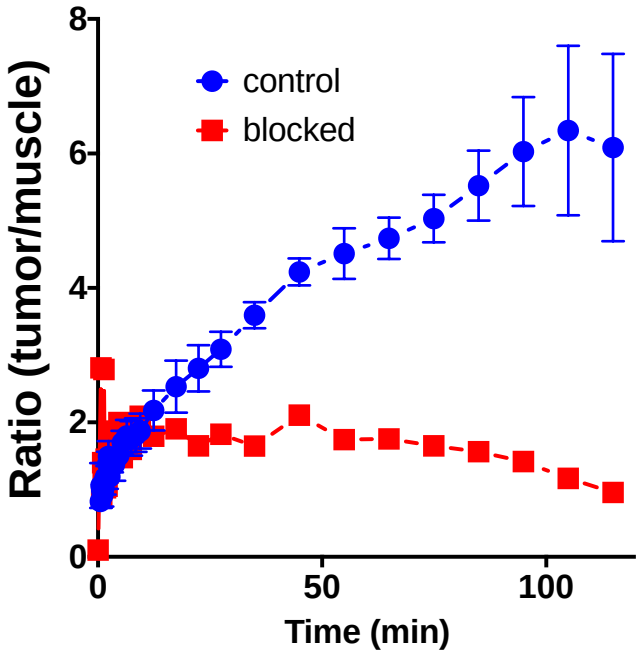


Abbildung 2: Tumor zu Muskel Verhältnis bestimmt an SUV aus der dynamischen PET Aufnahmen aufgetragen gegen den Messzeitpunkt

Danksagung: Ich möchte Dr. Bergmann für die tolle Kooperation und seine ausgezeichnete Arbeit bei der Durchführung der Tierversuche und Aufarbeitung der PET-Aufnahmen danken.

5.3 Synthesis and radiolabelling of new AAZTA-derivatives with ^{177}Lu for mild coupling with targeting vectors

J. Nagel, J. P. Sinnes, F. Rösch

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

Abstract

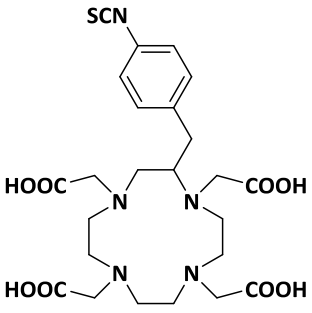
The development of new chelating agents has become an important field for nuclear medical applications. Because the beta emitting nuclide ^{177}Lu ($t_{1/2}$=6.6 d) has gathered great attention in the last years, we synthesized and characterized three new derivatives of the heptadentate ligand AAZTA (6-amino-6-methylperhydro-1,4-diazepinetetraacetic acid). The three derivatives AAZTA^5-Bz-NCS (**A**), AAZTA^5-en-SA (**B**) and AAZTA^5-TEG-N_3 (**C**) as well as an antibody conjugate of the NCS ester were radiolabelled with ^{177}Lu under different conditions (chelator-to-Lu ratio, pH, buffer) to approach kit-type labelling of ^{177}Lu at room temperature. All derivatives offered quantivative radiolabelling yields (>95 %) with a chelator-to-Lu ratio of 2:1 after 10 min. Further the stabilities were tested in different media (human serum, PBS, EDTA, DTPA). The Lu-complexes of derivatives **B** and **C** showed high stabilities within all media (>90 % after 24 h), whereas **A** showed a decreased stability, especially in HS. To test the influence on the stability of **A** by introducing a targeting vector to the ligand, **A** was coupled to a monoclonal antibody (mAb). Radiolabelling of the conjugate reached high labelling yields after 15 min (>60 %). Nevertheless, the stability of the Lu-complex could not be influenced and the Lu-conjugate was 31 % after 7 d in human serum.

In summary the new bifunctional AAZTA-based ligands **B** and **C** offer a fast and reliable radiolabelling of ^{177}Lu already at room temperature. This represents a substantial progress compared to ^{177}Lu-DOTA structures, which typically require labelling at 90 °C (or higher) [1–3] and make radiolabelling of temperature sensitive targeting vectors cumbersome. With the new coupling sites the AAZTA ligands can now be introduced to several biomolecular applications like peptides, bisphosphonates, antibodies or even nanoparticles and polymers.

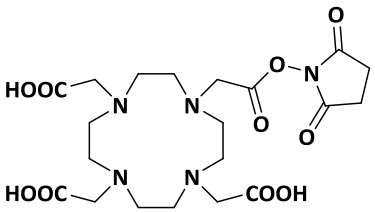
Keywords: Lutetium-177, AAZTA, bifunctional chelator, radiolabelling, buffer

Introduction

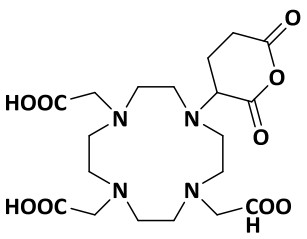
Bifunctional chelators (BFC) have become of great interest for nuclear medical applications. Especially for peptide receptor radionuclide therapy (PRRT) BFCs possess a key role [4–6]. Beside the radionuclides ^{90}Y ($t_{1/2}$=64.1 h; $E_{\beta,max}$=2.27 MeV) [7,8], ^{153}Sm ($t_{1/2}$=46.3 h; $E_{\beta,max}$=0.81 MeV) [8–10] and ^{188}Re ($t_{1/2}$=16.9 h; $E_{\beta,max}$=2.12 MeV) [8,11], ^{177}Lu ($t_{1/2}$=6.71 d; $E_{\beta,max}$=0.49 MeV) has become an important nuclide in the last decades [8,10,12]. This is to the low-energy β^- particles (176 keV (12.2 %), 385 keV (9.1 %) and 498 keV (78.6 %)), the low-energy gamma photons (113 keV, 208 keV) and in particular the high yield production of n.c.a. ^{177}Lu. Therefore several BFCs (based on the DOTA or DTPA scaffold, see scheme 1) have been investigated according to their stability with ^{177}Lu [13].



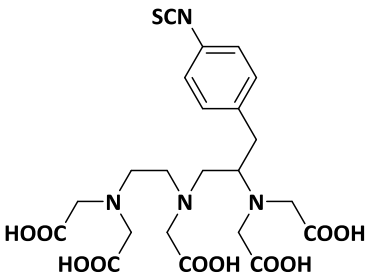
***p*-SCN-Bz-DOTA**



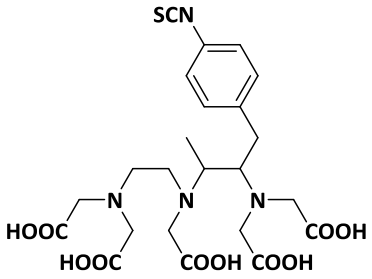
DOTA-NHS-ester



DOTAGA



***p*-SCN-Bz-DTPA**

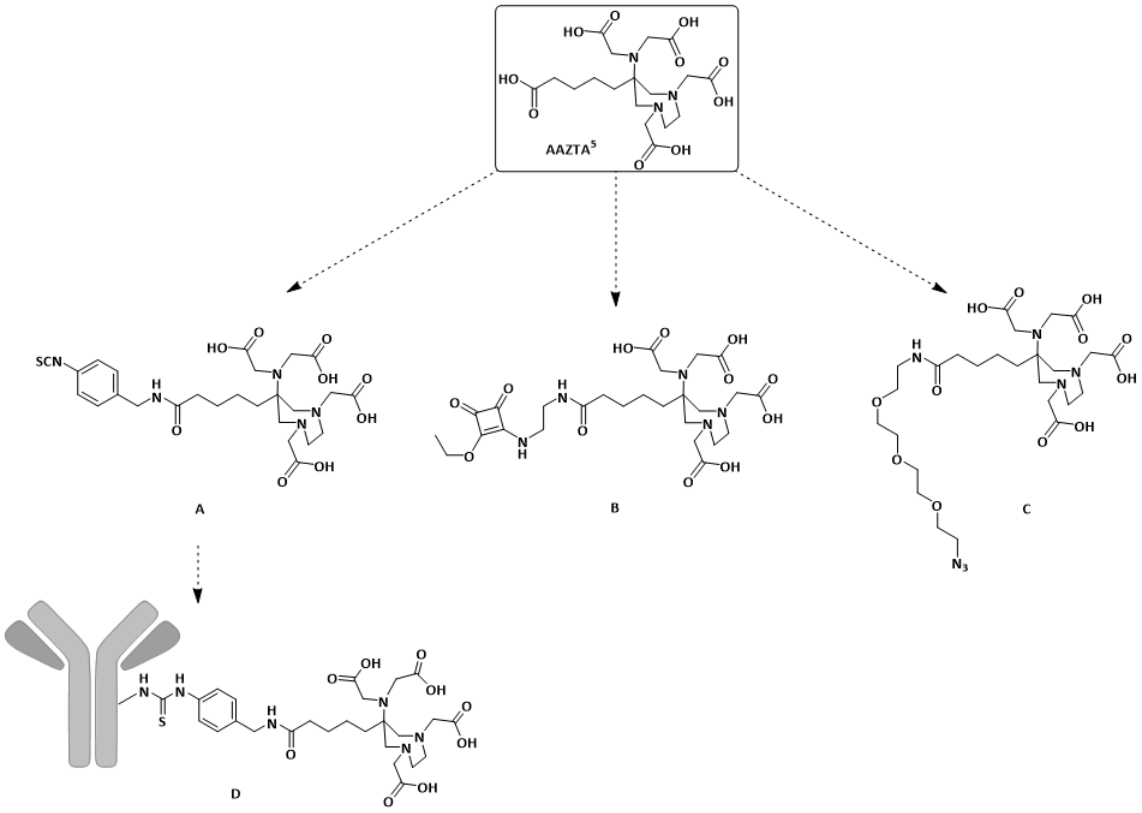


1B4M-DTPA

Scheme 1: Bifunctional derivatives of DOTA and DTPA for radiolabelling with ^{177}Lu

In their very beginning DOTA as well as AAZTA were used as complexing agent of Gd^{3+} for MRI imaging [14–18]. Baranyai *et al.* reported the equilibrium and kinetic properties not only of lanthanoids, but also of various divalent metal complexes of the heptadentate ligand AAZTA [19]. The results revealed the highest complex stability for Lu-AAZTA with a $logK_{ML}$ of 21.85.

Comparing this with DOTA ($logK_{ML}$=23.5) both complexes possess equal thermodynamic stability with Lu^{3+} [20]. The advantage of AAZTA over DOTA, however, is the fast radio-labelling under mild conditions (RT, pH 4-5, <10 min). This offers the opportunity to radiolabel targeting vectors (TV) like antibodies, nanoparticles or polymers which are pH and heat sensitive. The AAZTA scaffold described by Baranyai *et al.* demonstrates a stand-alone chelator without a coupling site for the introduction of potential TVs.



Scheme 2: AAZTA[5] and its different coupling sites: AAZTA[5]-Bz-NCS (**A**), AAZTA[5]-en-SA (**B**), AAZTA[5]-TEG-N_3 (**C**) and AAZTA[5]-Bz-NCS-mAb (**D**)

To overcome this obstacle, we synthesized the bifunctional AAZTA[5] (scheme 2) and introduced three new coupling sites. These enable the attachment to TVs like antibodies, proteins, nanoparticles and polymers under aqueous conditions within a short time range [21–25].

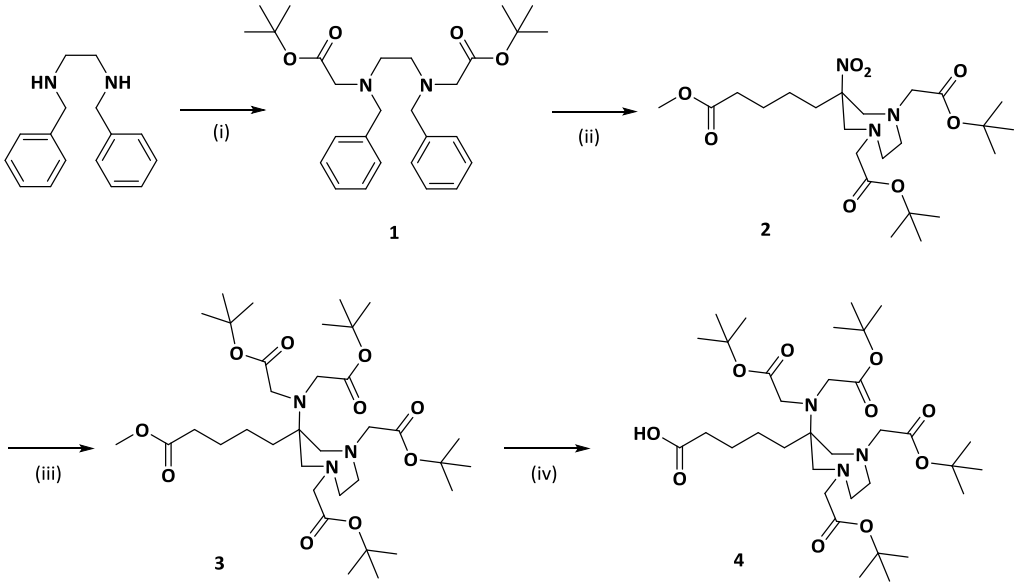
Derivate **A** (AAZTA[5]-Bz-NCS) can be introduced via the benzyl-isothiocyanate group to free, primary

amines on polypeptides or antibodies. This coupling site was reported for different chelators like DOTA or DTPA [26–29]. Derivative **B** ($AAZTA^5$-en-SA) is functionalized with an ethylenediamine squaric acid derivative. This offers the attachment to amines under mild conditions (pH 7, RT) [25,30]. **C** ($AAZTA^5$-TEG-N_3) contains a triglycol azide linker and can be coupled to nanoparticles, polypeptides or polymers, which are attached to alkyne or ring strained systems like DBCO. This enables a mild coupling via the [1,3] dipolar cycloaddtion [31,32]. We also investigated the influence of the radiolabelling conditions (pH, buffer system, Lu-to-chelator-ratio) of these derivatives with ^{177}Lu. Additionally the stability of the radiometal-complexes in different media (human serum, EDTA, DTPA, PBS) was examined for all ligands.

Results and Discussion

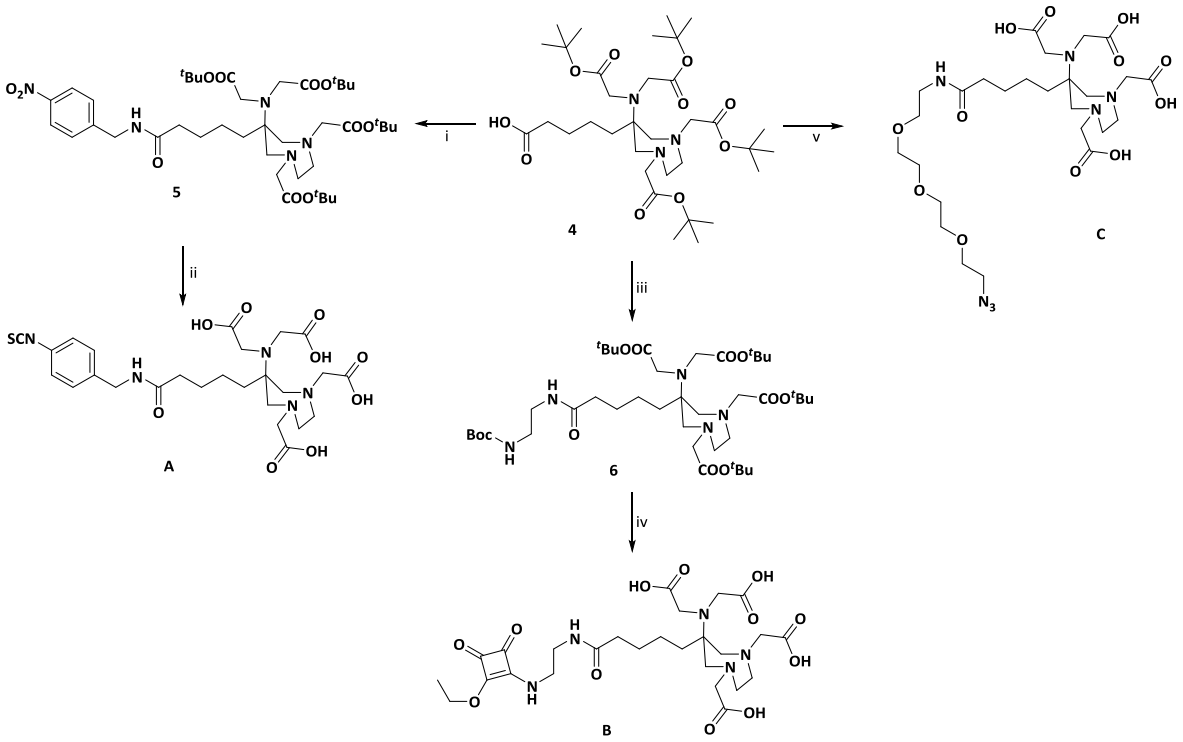
Organic synthesis

The *tert*-butyl-protected $AAZTA^5(^t Bu)_4$ (scheme 4, **4**) was synthesized over 4 steps with an overall yield of 20 %. The synthesis was started with the alkylation of *N,N'*-dibenzylethylenediamine with *tert*-butyl bromoacetate (product **1**). After deprotection of the diamine the diazepane was built by a Nitro-Mannich-reaction with formaldehyde and 2-nitrocyclohexanone to yield product **2**. The nitro group of **2** was reduced to the corresponding amine and alkylated with *tert*-butyl bromoacetate to obtain product **3**. The methyl ester was deprotected with LiOH to yield the derivative for the coupling of the linker (**4**). Starting from product **4** the linkers were coupled via the free carboxylic acid. The coupling reactions for product **5** and **6** were done under the same conditions with HATU, DIEA and ACN at room temperature. For amide bond formation of product **C** HOBt and EDC·HCl was used instead. By use of HATU the amino group of the 11-azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amine built the guanidinium ion, which, even by using HPLC methods, could not be separated from the product.



Scheme 3: Synthesis route of AAZTA^5(^{t}Bu)$_4$: (i) *tert*-butyl bromoacetate, Na_2CO_3, ACN, 95 %; (ii) a) Pd/C, EtOH, H_2, 100 %; b) paraformaldehyde, 2-nitrocyclohexanone, MeOH, 67 %; (iii) *tert*-butyl bromoacetate, DIEA, ACN, 49 %; (iv) LiOH, dioxane/H_2O, 91 %; (v) DCM/TFA, RT, 71 %

An important fact for the synthesis of the squaric acid derivative was the adjustment of the pH to 7. At lower pH no reaction occurred, whereas at higher pH two ligands were coupled to the squaric acid ester. The latter fact is going to be used for the attachment of this derivative to free amines of polypeptides or other macromolecular systems [30]. The synthesis of the aniline intermediate of product **5** was carried out in several media with different catalysts. The best system was Raney® Nickel in THF. Using Pd/C as catalyst either with ethanol or THF resulted in the addition of at least one unit of a solvent molecule to the amino group. This effect is known due to the evolution of acetaldehyde and the reductive amination with the produced amine [33,34]. Regarding the THF side product Russell *et al.* investigated the Pd-mediated addition of peroxidic THF to aromatic amines [35]. All ligands (scheme 4) were purified by means of HPLC under isocratic conditions.



Scheme 4: Synthesis route for the 3 derivatives AAZTA^5-Bz-NCS (**A**), AAZTA^5-en-SA (**B**) and AAZTA^5-TEG-N_3 (**C**): 4-nitrobenzylamine hydrochloride, HATU, DIEA, ACN, 60 %; (ii) a) Raney® Nickel, H_2, EtOH; b) $SCCl_2$, TEA, $CHCl_3$; c) TFA/DCM, RT, 39 %; (iii) *tert*-butyl-*N*-(2-aminoethyl)carbamate, HATU, DIEA, ACN, 33 %; (iv) a) TFA/DCM, 100 %; b) 3,4-diethoxy-3-cyclobuten-1,2-dione, phosphate buffer (0.5 M, pH 7), 33 %; (v) a) 11-azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amine, HOBt/EDC·HCl, DIEA, ACN; b) 4 M HCl in dioxane, RT, 16 %

Radiolabelling (pH- and concentration-dependence)

All three derivatives were radiolabelled with ^{177}Lu under various conditions (pH, buffer system, Lu-to-chelator-ratio). As buffer systems sodium acetate (NaOAc), ammonium acetate (AmOAc) and *N*-2-hydroxyethyl piperazine-*N*'-2-ethanesulfonic acid (HEPES) were used. These three buffer systems were chosen according to previous studies for radiolabelling with ^{177}Lu [23,2,38–41]. In table 1 the radiolabelling yields for all three derivatives **A**, **B** and **C** are listed.

Table 1: Radiolabelling yields (in %) of derivatives **A**, **B** and **C** with various buffer systems after 10 min at 25 °C (n=3; A(^{177}Lu)=30-50 MBq)

	NaOAc (0.25 M, pH 4.5)			AmOAc (0.25 M, pH 5.5)			HEPES (0.025 mM, pH 4.3)		
ligand-to-Lu	A	B	C	A	B	C	A	B	C
1:1	20.7 ± 1.1	17.7 ± 1.2	35.1 ± 0.6	<5 %	<5 %	<5 %	38.2 ± 0.1	39.8 ± 5.9	40.7 ± 6.2
2:1	62.5 ± 5.9	74.9 ± 3.8	91.8 ± 3.3	7.0 ± 0.3	8.5 ± 1.1	21.5 ± 4.3	96.1 ± 2.7	98.5 ± 0.0	98.0 ± 0.6
5:1	87.0 ± 3.3	96.7 ± 3.2	98.8 ± 0.2	81.6 ± 4.9	52.6 ± 6.2	86.9 ± 1.2	97.0 ± 0.4	96.1 ± 0.8	98.2 ± 0.2
10:1	94.1 ± 2.0	98.1 ± 0.3	98.7 ± 0.6	94.1 ± 0.2	98.0 ± 1.3	97.9 ± 0.2	98.7 ± 0.3	98.2 ± 0.7	99.0 ± 0.1
15:1	95.6 ± 0.7	98.4 ± 0.3	98.0 ± 0.6	97.3 ± 1.8	97.3 ± 0.3	99.0 ± 0.1	98.2 ± 0.3	96.8 ± 0.4	99.2 ± 0.3

First radiolabelling reactions were performed at room temperature with a reaction time of 10 min using a ligand-to-metal-ratio of 15:1 and 30-50 MBq (=0.062-0.0690 nmol) ^{177}Lu were used for each labelling. For all derivatives in each buffer system quantitative yields (>95 % RCY) could be obtained. Same results were observed with a ratio of 10:1 (except for the system **A** in AmOAc). According to Stimmel *et al.* ligands like DOTA, PADOTA and DTPA could be radiolabelled with equal ligand-to-metal-ratios and RCY [23]. With ratios of 5:1 quantitative labelling yields could be obtained in HEPES buffer for all ligands as well as for ligand **B** and **C** in NaOAc. In comparison with the other systems, the AmOAc buffer effects the labelling of ligand **B** resulting in a RCY <55 %. As it is known, that NH_4^+ is able to form complexes with crown ethers [42,43], the squaric acid moiety might act as complexing unit for the NH_4^+. This leads to a change in the electrostatic system of the ligand and therefore a decreased complexation ability of **B**. For ratios below 5:1, HEPES and NaOAc offer high labelling yields, whereas with ammonium acetate only yields below 30 % could be obtained. Interestingly, the labelling in HEPES resulted in yields >35 % for a 1:1 ratio between Lu and the chelator amount. This demonstrates the high affinity of the chelator AAZTA, depending on the used buffer system.

In vitro stability

For *in vivo* applications of ligands their *in vitro* stability is an important indicator. To get an insight into the kinetic stability, the radiolabelled compounds and their stability were analysed versus several media (HS, PBS, EDTA, DTPA) at different time points. Table 2 shows the percentage of intact Lu-complexes of all three derivatives after 1, 2 and 24 h.

Table 2: Stability of [^{177}Lu]Lu-**A**, [^{177}Lu]Lu-**B** and [^{177}Lu]Lu-**C** (in % intact complex) in human serum (HS), DTPA, EDTA and PBS after 1, 2 and 24 h at 37 °C

	t / h	HS	DPTA	EDTA	PBS
[^{177}Lu]Lu-A	**1**	89.6 ± 0.8	98.5 ± 0.2	98.8 ± 0.2	98.8 ± 0.1
	2	89.1 ± 0.4	98.2 ± 0.1	98.3 ± 0.2	98.8 ± 0.1
	24	50.8 ± 1.0	80.8 ± 1.2	82.7 ± 3.5	98.7 ± 0.1
[^{177}Lu]Lu-B	**1**	99.8 ± 0.0	99.8 ± 0.0	99.9 ± 0.0	98.7 ± 0.3
	2	99.9 ± 0.0	99.7 ± 0.0	99.8 ± 0.0	98.6 ± 0.2
	24	91.3 ± 1.1	94.0 ± 0.2	92.7 ± 0.1	98.5 ± 0.1
[^{177}Lu]Lu-C	**1**	99.9 ± 0.0	99.8 ± 0.0	99.8 ± 0.0	98.8 ± 0.1
	2	99.8 ± 0.0	99.9 ± 0.0	99.9 ± 0.0	98.8 ± 0.1
	24	97.8 ± 0.5	92.4 ± 0.4	91.8 ± 0.2	98.7 ± 0.2

Beside [^{177}Lu]Lu-**A**, with a 50 % intact complex after 24 h, all Lu-complexes show a high stability versus HS (>91 %). An explanation for the low stability of [^{177}Lu]Lu-**A** could be the negative influence of the conjugated amide-Bz-NCS moiety. The electron-withdrawing characteristic due to the negative inductive effects (-I) of the Bz-NCS and the amide leads to a decreased electron density at the exocyclic amine and thereby to a decreased electron density at the carboxylic groups. Since Lu needs up to 9 ligation atoms the lowered complexation ability of the exocyclic amino-diacetate group results in a labile complex and thereby to the release of ^{177}Lu [44].

The competition studies of the Lu-complexes versus DTPA and EDTA (10 mM, pH 7, respectively) show stabilities of at least >80 % for [^{177}Lu]Lu-**A** and >91 % for [^{177}Lu]Lu-**B** and [^{177}Lu]Lu-**C** after 24 h, respectively. These values are in the expected range and comparable with stability of Lu-labelled AAZTA-minigastrin described by Pfister *et al.* [45]. For comparison, same analyses were performed with PBS as media. For all three derivatives stabilities of >98 % after 24 h could be obtained. Considering the application of AAZTA-TV systems for further *in vivo* experiments, this offers the storage of the radiolabelled compounds for several hours in PBS before usage.

Coupling AAZTA^5-Bz-NCS to mAb

As proof-of-concept the ligand **A** was coupled to a monoclonal antibody (mAb) and purified according the method described by Perk *et al.* [46]. The chelator-antibody-conjugate (AAZTA^5-Bz-NCS-mAb, **A-mAb**) was radiolabelled with ^{177}Lu at room temperature and analysed due to the kinetic labelling behaviour. table 3 summarizes, that after 15 minutes a RCY over 60 % could be achieved, yielding in 73 % after 60 min. These data show, that a fast and high yielding labelling is possible with AAZTA, even if it is coupled to large targeting vectors like antibodies.

Table 3: Radiolabelling yields (in %) of derivative **A-mAb** in HEPES buffer (0.5 M, pH 7.0) at 25 °C (n=3; A(^{177}Lu)=50 MBq)

	t / min	yield / %
[^{177}Lu]Lu-A-mAb	15	63.7 ± 3.0
	30	69.3 ± 4.4
	45	70.4 ± 4.3
	60	72.7 ± 3.5

After 60 min the reaction mixture was purified via PD-10 column using NaCl solution (0.9 %) as solvent. Analysis via HPLC represents a radiolabelled conjugate with one peak (figure 5, Supporting Information). The radiolabelled and purified conjugate was analysed according to its stability in human serum and PBS buffer over a period of 1, 2 and 24 h as well as 168 h (table 4).

Table 4: Stability of [^{177}Lu]Lu-**A**-mAb in human serum (HS) and PBS (in % intact complex) after 1, 2, 24 and 168 h at 37 °C

	t / h	HS	PBS
[^{177}Lu]Lu-A-mAb	**1**	43.0 ± 10.0	92.8 ± 1.0
	2	31.6 ± 3.7	90.9 ± 0.7
	24	29.9 ± 2.4	89.5 ± 1.6
	168	31.8 ± 6.8	91.0 ± 1.9

The conjugate shows a stability of over 90 % after even 7 days in PBS. Same results were obtained for the labelled chelator (table 2). Within human serum the conjugate and the chelator itself release the Lu. As mentioned above the benzyl group of the linking moiety seems to have a destabilizing effect on the chelator. Introducing an antibody to this chelator site in combination with competitive ligands or metals inside the HS results in the fast decomplexation of the Lu.

Conclusion

AAZTA^5 and its bifunctional derivatives AAZTA^5-Bz-NCS (**A**), AAZTA^5-en-SA (**B**) and AAZTA^5-TEG-N_3 (**C**) show a high potential as stable and reliable chelator for ^{177}Lu. The new coupling sites of AAZTA^5 demonstrate high stabilities (especially the squaric acid and the azide) and simultaneously offer the option to covalentely attach the ligands to targeting vectors like peptides or bisphosphonates but also to antibodies or nanodimensional systems like polymers or nanoparticles. In difference to the established DOTA-derivatives the fast radiolabelling with RCY's greater 95 % at mild conditions (RT, pH 4.5-7) broadens the field for the application of these new systems.

ACKNOWLEDGEMENT

We thank ITM (Garching, Germany) for the supply of n. c. a. ^{177}Lu for all radiolabellings performed in this work.

SUPPORTING INFORMATION

General methods:

All used chemicals were commercially available at Acros Organics, Bachem, Fluka, SigmaAldrich or VWR and were used without further purification. For radiolabellings trace metal-free salts and water were used. The measurements of ^{1}H- and ^{13}C-NMR spectra were performed on a Bruker Avance III HD 400 (400 MHz)or Avance III 600 (600 MHz). Chemical shifts are given in parts per million downfield from TMS (δ=0 ppm) referred to the solvent residual signal. Low-resolution mass spectra (LR-MS) were recorded on Agilent 6100 Series Single Quadrupole LC/MS and high-resolution mass spectra (HR-MS) were recorded on either a Micromass Quattro Micro API LC-ESI or a Finnigan MAT90-Spectrometer.

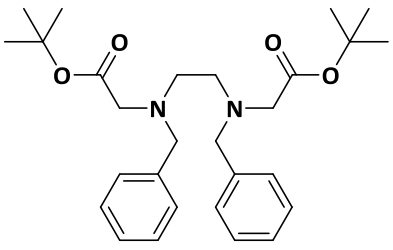
Purification and analysis of the compounds was performed on a HPLC system from Merck (LaChrom; pump: Hitachi L7100; UV-detector: L7400). Following columns were used: Luna 10 u (C18) 100 Å (250x10.00 mm 10 micron); Gemini 5 u (C18) 110 Å (250x10.00 mm 5 micron); Luna 10 u (C18) 100 Å (250x21.23 mm 10 micron). As eluent **A** (H_2O (0.1 % TFA)) and **B** (ACN (0.1 % TFA)) were used.

For radiolabelling n.c.a. ^{177}Lu (0.04 M HCl) from ITM (Garching, Germany) was used. Radiolabellings were performed in 1 mL total volume at 25 °C in a heating block at 600 rpm. Radio-TLCs were performed on Merck Silica F_{254} TLC plates with citrate buffer (0.01 M, pH 4) and analyzed with the radio detector GABI STAR from Raytest. For radio-HPLC a Chromolith Performance RP18e column (100x4.6 mm; Merck) was used with a linear **A**-**B** gradient (5 % **B** for 2 min, 5 % to 95 % **B** in 10 min, 95 % **B** for 2 min, 5 % **B** for 3 min).

Experimental Section:

<u>AAZTA^{5}synthesis</u>

*N,N'-Dibenzyl-N,N'-di-(tert-butylacetate)-ethylendiamine (**1**)*



1

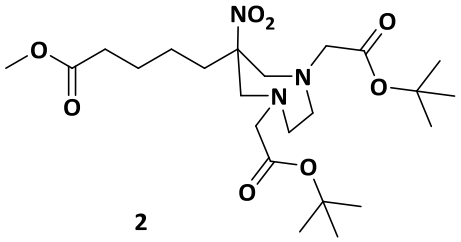
N,N´-dibenzylethylenediamine (3.00 g; 12.48 mmol) and Na_2CO_3 (5.12 g; 48.67 mmol) were stirred at room temperature in dry acetonitrile (50 mL) for 30 min. *Tert*-butyl bromoacetate (4.64 g; 23.72 mmol), dissolved in dry acetonitrile (10 mL), was added at room temperature over a period of 30 min. After completion the suspension was heated over night at 90 °C, filtrated and the filtrate was concentrated under vacuum. After purification via column chromatography (H/EA; 6:1; R_f=0.25) the product was obtained as colourless solid (5.56 g; 11.87 mmol; 95 %).

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, δ [ppm]): 7.34-7.21 (m, 10 H); 3.78 (s, 4 H); 3.26 (s, 4 H); 2.82 (s, 4 H); 1.44

(s, 18 H); ^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100 MHz, δ [ppm]): 171.03 (s); 139,18 (s); 129.05 (s); 128.30 (s); 127.10 (s); 80.86 (s); 58.39 (s); 55.27 (s); 51.73 (s); 28.24 (s)

MS (ESI^+): 469.28, 470.31, 471.33 ($M+H^+$); 507.32, 508.34, 509.35 ($M+K^+$)

1,4-Di(tert-butylacetate)-6-methylpentanoate-6-nitroperhydro-1,4-diazepane (**2**)



2

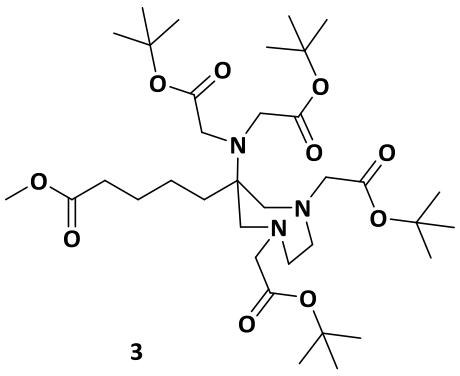
1 (3.28 g; 7.00 mmol) was dissolved in 20 mL abs. ethanol and formic acid (528 µL; 14.00 mmol). To this solution Pd/C (0.53 g; 16 wt%) was added and the solution was saturated and kept overnight with hydrogen. After completion the Pd/C was filtrated over celite, the filtrate was concentrated and dried. The crude product **2a** (1.99 g; 6.90 mmol; 99 %) was used without further purification.

A solution of 2-nitrocyclohexanone (1 g; 6.99 mmol) and Amberlyst® A21 (2 mass-eq) in dry methanol (30 mL) was heated for 1 h. Then product **2a** (1.99 g; 6.99 mmol) and paraformaldehyde (0.76 g; 25.2 mmol) was added and the suspension was heated overnight under reflux. The suspension was filterated, the filtrate was concentrated under vacuum and purified via column chromatography (H/EA, 2:1; R_f=0.43). The product **2** was obtained as yellowish oil (2.25 g; 4.62 mmol; 66 %).

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, δ [ppm]): 3.65 (s, 3 H); 3.60 (d, J=14.6 Hz, 2 H); 3.45 (d, J=17.3 Hz, 2 H); 3.30 (d, J=17.3 Hz, 2 H); 3.12 (d, J=14.6 Hz, 2 H); 2.84 (m, 4 H); 2.27 (t, 3 H); 1.83 (m, 2 H), 1.57 (m, 2 H); 1.46 (s, 18 H); 1.18 (m, 2 H); ^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100 MHz, δ [ppm]): 173.73 (s); 170.92 (s); 95.12 (s); 81.31 (s); 61.57 (s); 61.18 (s); 56.87 (s); 51.68 (s); 37.27 (s); 33.71 (s); 28.35 (s); 24.82 (s); 22.99 (s)

MS (ESI^+): 388.14, 389.18, 390.20 ($M+H^+$); 410.15, 411.17, 412.18 ($M+Na^+$)

1,4-Di(tert-butylacetate)-6-methylpentanoate-6-amino-di(tert-butylacetate)-perhydro-1,4-diazepane (**3**)



3

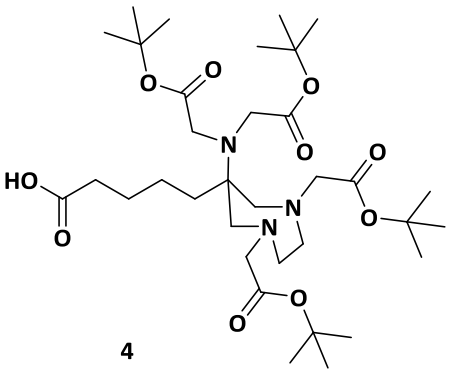
2 (2.25 g; 4.62 mmol) was dissolved in absolute ethanol (15 mL), combined with Raney®Nickel 2800® (0.5 g) (washed 4 times with ethanol) and the suspension was saturated with hydrogen and stirred at 40 °C for 6 h. After completion the nickel was filtrated over celite/sand, the filtrate was concentrated and dried under vacuum. The product **3a** (2.11 g; 4.62 mmol) was dissolved with diisopropylethylamine (805 µL; 4.62 mmol) in dry acetonitrile and stirred under nitrogen for 30 minutes at room temperature. *Tert*-butyl bromoacetate (1.57 mL; 10.63 mmol) was added dropwise to the solution and stirred at room temperature overnight. The solution was concentrated under

vacuum and purified via column chromatorgraphy (H/EA, 3:1; R_f=0.82). The product **3** was obtained as yellow oil (2.53 g; 3.70 mmol; 49 %).

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, δ [ppm]): 3.65 (s, 4 H); 3.61 (s, 4 H); 3.22 (s, 3 H); 2.99 (d, J=14.1 Hz, 2 H); 2.85-2.65 (m, 4 H); 2.63 (d, J=14.1 Hz, 2 H); 2.31 (t, J=7.4 Hz, 2 H); 1.62-1.52 (m, 4 H); 1.44 (s, 18 H); 1.43 (s, 18 H); 1.25 (m, 2 H); ^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100 MHz, δ [ppm]): 174.37 (s); 172.89 (s); 170.94 (s); 80.86 (s); 80.38 (s); 65.29 (s); 63.17 (s); 62.61 (s); 59.39 (s); 52.09 (s); 51.56 (s); 37.34 (s); 34.26 (s); 28.31 (s); 28.25 (s); 25.89 (s); 21.83 (s)

MS (ESI$^+$): 686.60, 687.60, 688.60 (M+H$^+$)

*1,4-Di(tert-butylacetate)-6-pentanoicacid-6-(amino-di(tert-butylacetate))-perhydro-1,4-diazepane (**4**)*



4

3 (0.67 g, 0.97 mmol) was dissolved in 1,4-dioxane/water (2:1, 14 mL), 1 M LiOH (1.46 mL, 1.46 mmol) and stirred at room temperature. After completion the solution was concentrated under vacuum and the residue extracted with $NaHCO_3$ (1M) and chloroform. The organic layer was dried over sodium sulfate, filtrated and concentrated under vacuum. The product was obtained as yellowish oil without further purification (0.84 g, 1.25 mmol, 90 %).

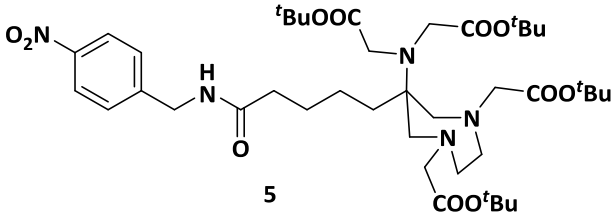
^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, δ [ppm]): 3.60 (s, 4 H); 3.23 (s, 4 H); 3.00-2.97 (d, J=14.2 Hz, 2 H); 2.88-2.60 (m, 6 H); 2.36-2.32 (t, J=7.90 Hz, 2 H); 1.64-1.52 (m, 4 H); 1.43 (s, 18 H); 1.42 (s, 18 H); 1.24 (m, 2 H); ^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100 MHz, δ [ppm]): 178.92 (s); 172.93 (s); 170.87 (s); 81.04 (s); 80.54 (s); 65.10 (s); 63.10 (s); 59.35 (s); 52.16 (s); 34.20 (s); 29.82 (s); 28.32 (s); 28.22 (s); 25.62 (s); 22.81 (s); 21.87

MS (ESI$^+$): 672.45, 673.45, 674.46 (M+H$^+$); 694.43, 695.44, 696.45 (M+Na$^+$)

Synthesis of derivatives AAZTA^5-Bz-NCS (A), AAZTA^5-en-SA (B), AAZTA^5-TEG-N_3 (C) and AAZTA^5-Bz-NCS-mAb (D)

1,4-Di(acetate)-6-((5-((4-isothiocyanatobenzyl)amino)-5-oxopentyl)-6-(amino-di(acetate)-perhydro-1,4-diazepane (AAZTA^5-Bz-NCS (**A**))

1,4-Di(tert-butylacetate)-6-((5-((4-nitro-benzyl)amino)-5-oxopentyl)-6-(amino-di(tert-butylacetate))-perhydro-1,4-diazepane (**5**)



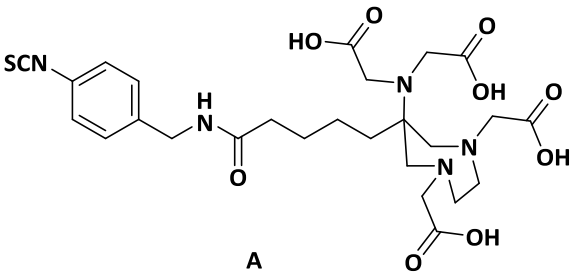
5

4 (0.30 g; 0.44 mmol) was dissolved in dry acetonitrile (1 mL), combined with HATU (0.20 g; 0.53 mmol), DIEA (230 µL; 1.32 mmol) and stirred for 15 min at room temperature. To this solution 4-nitrobenzylamine hydrochloride (0.11 g; 0.58 mmol) was added and stirred for 1 h at room temperature. After completion of the reaction the solution was concentrated under vacuum and the residue was purified via column chromatography (H/EA; 1:1; R_f=0.20). The product **5** was obtained as orange oil (0.21 g; 0.26 mmol; 60 %).

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, δ [ppm]): 8.18 (d, J=8.53 Hz, 2 H) 7.46 (d, J=8.53 Hz, 2 H); 6.51 (br, 2 H); 4.56 (d, J=6.12 Hz, 2 H); 3.60 (s, 4 H); 3.20 (s, 4 H); 2.98 (d, J=14.18 Hz, 2 H); 2.77-2.74 (m, 2 H); 2.67-2.61 (m, 4 H) 2.29 (t, 2 H); 1.71-1.66 (m, 2 H); 1.60-1.56 (m, 2 H) 1.43 (s, 18 H); 1.42 (s, 18 H) 1.28-1.23 (m, 2 H); ^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100 MHz, δ [ppm]): 173.58 (s); 172.93 (s); 170.89 (s); 128.37 (s); 123.94 (s); 80.96 (s); 80.52 (s); 65.20 (s); 63.18 (s); 62.57 (s); 59.44 (s); 52.32 (s); 38.75 (s); 36.95 (s); 36.66 (s); 28.34 (s); 28.24 (s); 21.86 (s).

MS (ESI$^+$): 806.48, 807.49, 808.52 (M+H$^+$); 828.45, 829.47, 830.50 (M+Na$^+$)

*1,4-Di(acetate)-6-((5-((4-isothiocyanatobenzyl)-amino)-5-oxopentyl)-6-(amino-di(acetate))-per-hydro-1,4-diazepane (**A**)*



A

5 (0.21 g; 0.26 mmol) was dissolved in tetrahydrofuran (3 mL) and suspended with Raney® Nickel 2800®. The suspension was flushed with and kept under hydrogen for 5 h at room temperature. After completion the mixture was filtrated over celite/sand, the celite washed twice with methanol (5 mL) and the organic layer was concentrated under vacuum. The obtained product was used without further purification (0.20 g; 22 mmol; 85 %). The residue was stirred at room temperature in dry dichloromethane (3 mL) and TEA (57 µL; 0.44 mmol) for 15 minutes. To this solution thiophosgene (44 µL; 0.44 mmol), dissolved in dry dichlormethane (1 mL), was added and stirred for 1 h. The solution was quenched with 1 M NaOH solution and extracted with

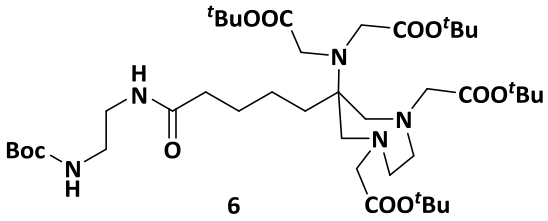
dichloromethane. The organic layer was concentrated under vacuum and the obtained product was dissolved in dichloromethane/trifluoroacetic acid (1:1, vol%). After 5 h the solvent was removed under vacuum and the residue was purified via HPLC to obtained product **A** as colourless solid (51 mg; 0.09 mmol; 39 %; t_R=13.7 min (28 % ACN (0.1 % TFA))).

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, δ [ppm]): 7.66-7.61 (m, 4 H); 4.65 (s, 2 H); 4.03 (s, 4 H); 3.95 (s, 4 H); 3.79-3.72 (m, 2 H); 3.68-3.61 (m,4 H); 3.51 (d, J=13.53 Hz, 2 H); 2.55 (t, 2 H); 1.87-1.80 (m, 2 H); 1.75-1.71 (m, 2 H); 1.60-1.51 (m, 2 H); ^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100 MHz, δ [ppm]): 175.43 (s); 175.08 (s); 170.52 (s); 137.95 (s); 128.28 (s); 125.46 (s); 62.36 (s); 59.35 (s); 58.22 (s); 52.25 (s); 51.43 (s); 41.78 (s); 34.94 (s); 33.66 (s); 25.25 (s); 21.79 (s).

MS (ESI$^+$): 645.1099, 646.1092, 647.1002 ((M-4H$^+$)+Fe^{3+})

*1,4-Di(acetate)-6-((5-(2-((2-ethoxy-3,4- dioxocyclobut-1-en-1yl)aminoethyl)amino)-5-oxopentyl)-6-(amino-di(acetate))-perhydro-1,4-diazepane (**B**)*

*1,4-Di(tert-butylacetate)-6-((5-(2-((tert-butoxy-carbonyl)-amino-ethyl)amino)-5-oxopentyl)-6-(amino-di(tert-butylacetate))-per-hydro-1,4-diazepane (**6**)*



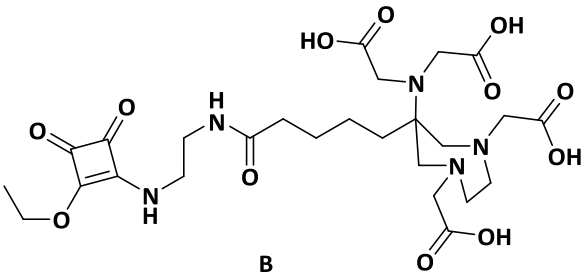
6

4 (100 mg; 0.15 mmol) was dissolved in dry acetonitrile (1 mL), combined with HATU (62 mg; 0.16 mmol), DIEA (78 µL; 0.45 mmol) and stirred for 15 min at room temperature. To this solution *tert*-butyl(2-aminoethyl)carbamate (36 µL; 0.23 mmol) was added and stirred for 1 h at room temperature. After completion of the reaction the solution was concentrated under vacuum and the residue was purified via column chromatography (H/EA, 2:1, R_f: 0.11). The product **6** was obtained as yellowish oil (40 mg; 0.05 mmol; 33 %).

^{1}H-NMR (DMSO, 400 MHz, δ [ppm]): 6.34 (br, 1 H); 5.26 (br, 1 H); 3.60 (s, 4 H); 3.38-3.34 (m, 2 H); 3.26-3.24 (m, 2 H); 3.21 (s, 4 H); 2.96 (d, J=14.1 Hz, 2 H); 2.75- 2.73 (m, 2 H); 2.66-2.63 (m, 2 H); 2.59 (d, J=14.1 Hz, 2 H); 2.19 (t, 2 H); 1.62-1.53 (m, 4 H); 1.43 (s, 18 H); 1.42 (s, 27 H); 1.28-1.20 (m, 2 H); ^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100 MHz, δ [ppm]): 174.38 (s); 173.31 (s); 172.80 (s); 165.88 (s); 82.85 (s); 82.77 (s); 63.44 (s); 62.48 (s); 62.05 (s); 55.48 (s); 54.47 (s); 47.11 (s); 40.81 (s); 39.87 (s); 35.55 (s); 29.82 (s); 28.53 (s); 28.32 (s); 28.14 (s); 27.91 (s); 26.17 (s); 23.41 (s).

MS (ESI$^+$): 814.53, 815.54, 816.57 (M+H$^+$); 836.454, 837.55, 838.56 (M+Na$^+$)

*1,4-Di(acetate)-6-((5-(2-((2-ethoxy-3,4-dioxocyclobut-1-en-1yl)-aminoethyl)amino)-5-oxopentyl)-6-(amino-di(acetate))-perhydro-1,4-diazepane (***B**)



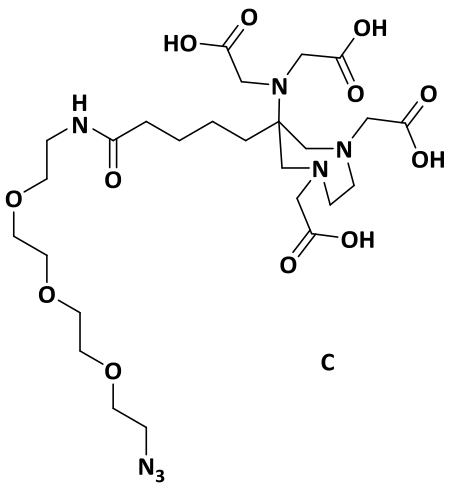
B

6 (28 mg; 0.04 mmol) was dissolved in dichloromethane/trifluoroacetic acid (1:1; vol %) and stirred for 3 h. After completion of the reaction the solvent was removed under vacuum and the residue was dissolved in 0.5 M phosphate buffer (pH 7; 3 mL). To this solution 3,4-diethoxycyclobut-3-ene-1,2-dione (16 mg; 0,03 mmol) was added, the pH was adjusted with 1 M NaOH solution to pH 7 and the reaction was stirred over night at room temperature. After completion the reaction mixture was purified via HPLC to obtain the product **B** as colourless solid (7.2 mg; 0.01 mmol; 33 %; t_R=9.4 min (12 % ACN (0.1 % TFA)).

^{1}H-NMR (D_2O, 400 MHz, δ [ppm]): 4.75-4.67 (m, 2H); 3.88 (s, 2 H); 3.76-3.66 (m, 6 H); 3.59-3.44 (m, 8 H); 3.40-3.38 (m, 2 H); 2.20 (t, 2 H); 1.52-1.45 (m, 4 H); 1.43 (t, 3 H); 1.30-1.21 (m; 2 H); ^{13}C-NMR (D_2O, 100 MHz, δ [ppm]): 176.60 (s); 176.06 (s); 175.97 (s); 173.82 (s); 170.67 (s); 70.70 (s); 70.55 (s); 62.81 (s); 59.41 (s); 58.63 (s); 52.59 (s); 52.20 (s); 43.93 (s); 39.56 (s); 39.24 (s); 35.31 (s); 33.76 (s); 25.73 (s); 22.26 (s); 15.07 (s).

MS (ESI$^+$): 665.1624, 666.1661, 667.1680 ((M-4H$^+$)+Fe^{3+})

*1,4-Di(acetate)-6-(1-azido-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azadecan-12-yl)amino)-5-oxopentyl)-6-(amino-di(acetate))-perhydro-1,4-diazepane (***C***)*



C

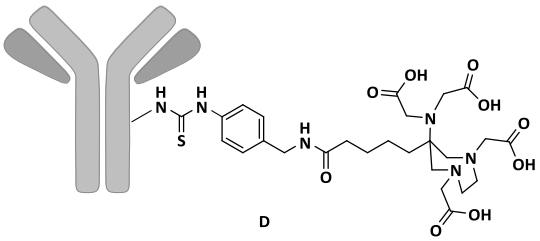
4 (47 mg; 0.07 mmol) was dissolved in dry acetonitrile (1 mL), combined with HOBt (18.9 mg; 0.14 mmol), EDC·HCl (20.1 mg, 0.10 mmol) and DIEA (49 µL; 0.28 mmol) and stirred for 15 min at room temperature. To this solution 11-azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amine (15 µL; 0.07 mmol) was added and stirred for 1 h at room temperature. After completion of the reaction the solution was concentrated under vacuum and the residue was dissolved in dichloromethane/trifluoroacetic acid (1:1; vol %). After 3 h at room temperature the solution was concentrated under vacuum and the residue was purified via HPLC to obtain product **C**as yellowish oil (6.8 mg; 0.01 mmol; 16 %; t_R=8.9 (20 % ACN (0.1 % TFA))).

^{1}H-NMR (CD_3CN, 400 MHz, δ [ppm]): 3.69 (s, 4 H); 3.63-3.54 (m, 14 H) 3.48 (t, 2 H); 3.38 (t, 2 H) 3.29-3.22 (m, 8 H); 3.10 (d, J=14.6 Hz); 2.11 (t, 2 H); 1.48-1.41 (m, 2 H); 1.34-1.21 (m, 4 H); ^{13}C-NMR (CD_3CN, 100 MHz, δ [ppm]): 176.84 (s); 175.32 (s); 171.06 (s); 70.96 (s); 70.71 (s); 70.40 (s); 70.14 (s);

63.52 (s); 61.30 (s); 59.10 (s); 54.10 (s); 51.82 (s); 51.42 (s); 39.80 (s); 36.41 (s); 35.65 (s); 26.84 (s); 23.42 (s).

MS (ESI^+): 699.2148, 700.2185, 701.2201 ($(M-4H^+)+Fe^{3+}$)

*mAb-AAZTA^5-Bz-NCS (**D**)*



D

The antibody was coupled to **A** according to the protocol by Perk *et al.*[47] In brief, the antibody solution (2.1 mg, 14 nmol) was adjusted to pH 9 with 0.1 Na_2CO_3. To this solution **A** was added (90.2 µg, 140 nmol) and incubated for 1 h at 37 °C. After completion of the reaction the conjugate was separated with PD-10 column purification and was ready for radiolabelling.

Radiolabelling and *in vitro* evaluation

Kinetic studies and HPLC diagrams

Following figures show the kinetic studies of the 3 derivatives with the buffer systems sodium acetate (NaOAc, 0.25 M, pH 4.5), ammonium acetate (AmOAc, 0.25 M, pH 5.5) and *N*-2-hydroxyethyl piperazine-*N*'-2-ethanesulfonic acid (HEPES, 0.025 M, pH 4.3 and 0.5 M, pH 7.00) and the HPLC chromatograms of all three radiolabelled derivatives and the radiolabelled mAb conjugate. All values were analyzed via radio-TLC (silica gel, citrate buffer (0.01 M, pH 4) as mobile phase) and verified with radio-HPLC (after 15 min labelling reaction). For the systems NaOAc and HEPES the ligand-to-^{177}Lu ratios from 1:1 till 10:1 are shown, whereas for AmOAc ratios from 2:1 till 15:1 are shown.

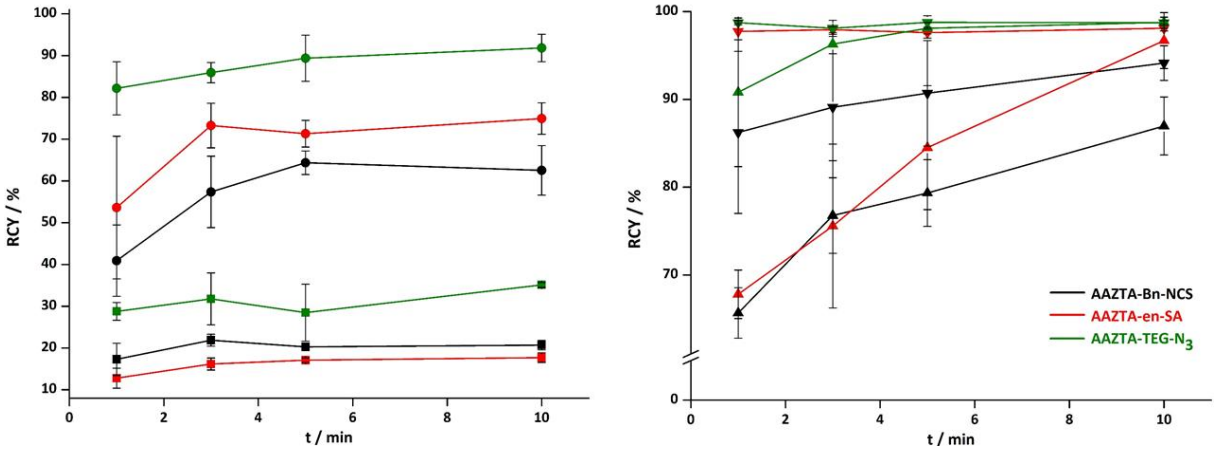


Figure 1: Radiolabelling kinetics with ^{177}Lu of the derivatives AAZTA^5-Bz-NCS (–), AAZTA^5-en-SA (–) and AAZTA^5-TEG-N_3 (–) in NaOAc (0.25 M, pH 4.5) with ligand-to-^{177}Lu ratio 1:1 (■), 2:1 (●), 5:1 (▲) and 10:1 (▼) at 25 °C; n=3

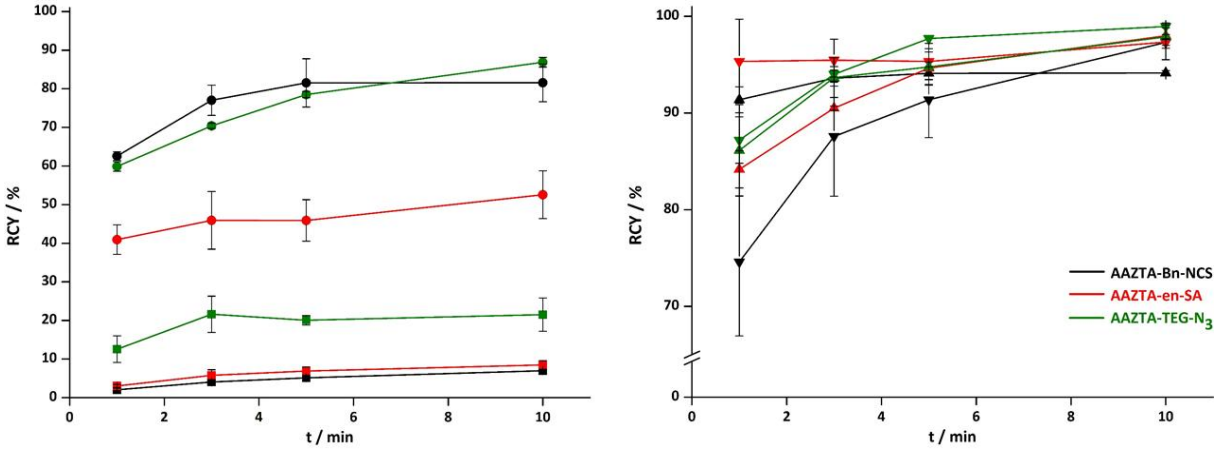


Figure 2: Radiolabelling kinetics with ^{177}Lu of the derivatives AAZTA^5-Bz-NCS (–), AAZTA^5-en-SA (–) and AAZTA^5-TEG-N_3 (–) in AmOAc (0.25 M, pH 5.5) with ligand-to-^{177}Lu ratio 2:1 (■), 5:1 (●), 10:1 (▲) and 15:1 (▼) at 25 °C; n=3

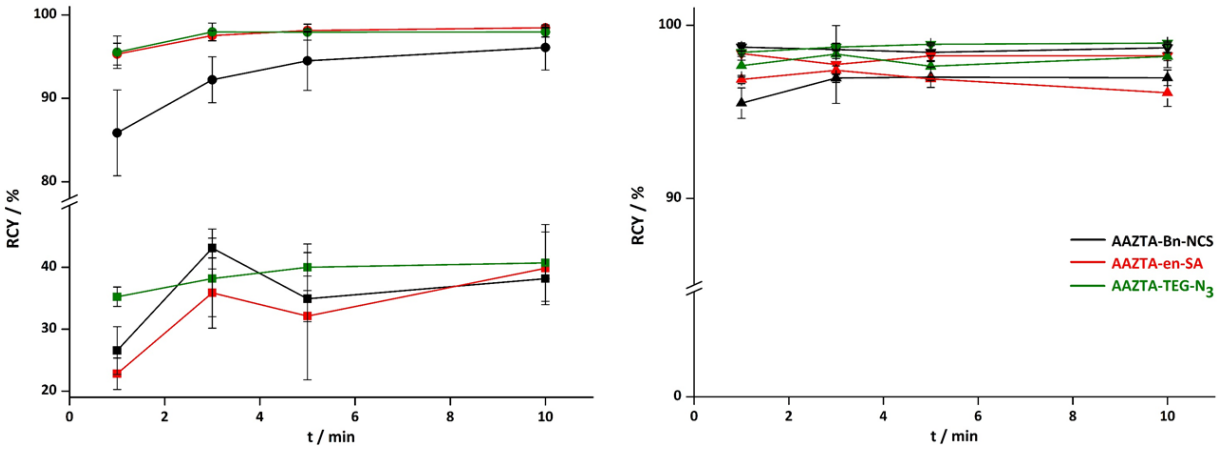


Figure 3: Radiolabelling kinetics with ^{177}Lu of the derivatives AAZTA^5-Bz-NCS (–), AAZTA^5-en-SA (–) and AAZTA^5-TEG-N_3 (–) in HEPES (0.025 M, pH 4.3) with ligand-to-^{177}Lu ratio 1:1 (■), 2:1 (●), 5:1 (▲) and 10:1 (▼) at 25 °C; n=3

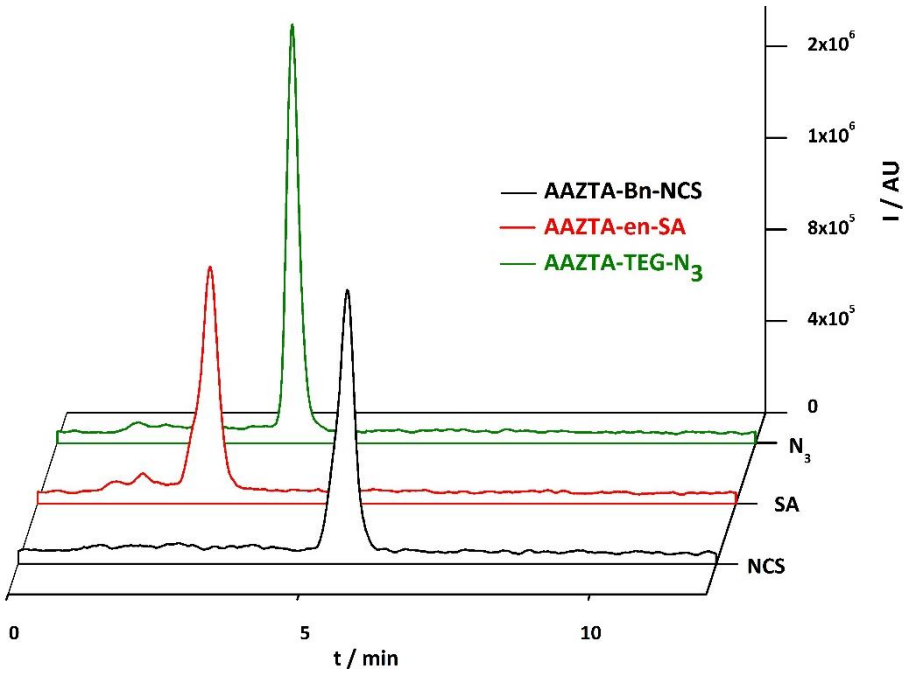


Figure 4: HPLC chromatograms of radiolabelled AAZTA[5]-Bz-NCS (–), AAZTA[5]-en-SA (–) and AAZTA[5]-TEG-N_3 (–) after 15 min (ligand-to-^{177}Lu 10:1, NaOAc 0.25 M, pH 4.5, 25 °C)

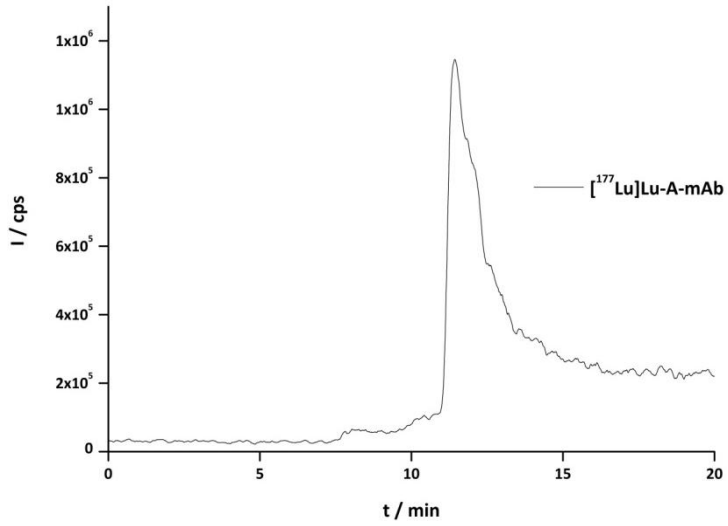


Figure 5: HPLC chromatogram of radiolabelled conjugate of AAZTA[5]-BnNCS and antibody after purification

Following figures show histograms after 1, 2 and 24 h as well as the HPLC chromatograms after 2 h of the ligands [^{177}Lu]Lu-**A**, [^{177}Lu]Lu-**B** and [^{177}Lu]Lu-**C** in the media human serum (HS), DTPA, EDTA and PBS. All TLCs were analyzed with citrate buffer (0.01 M, pH 4) as eluent.

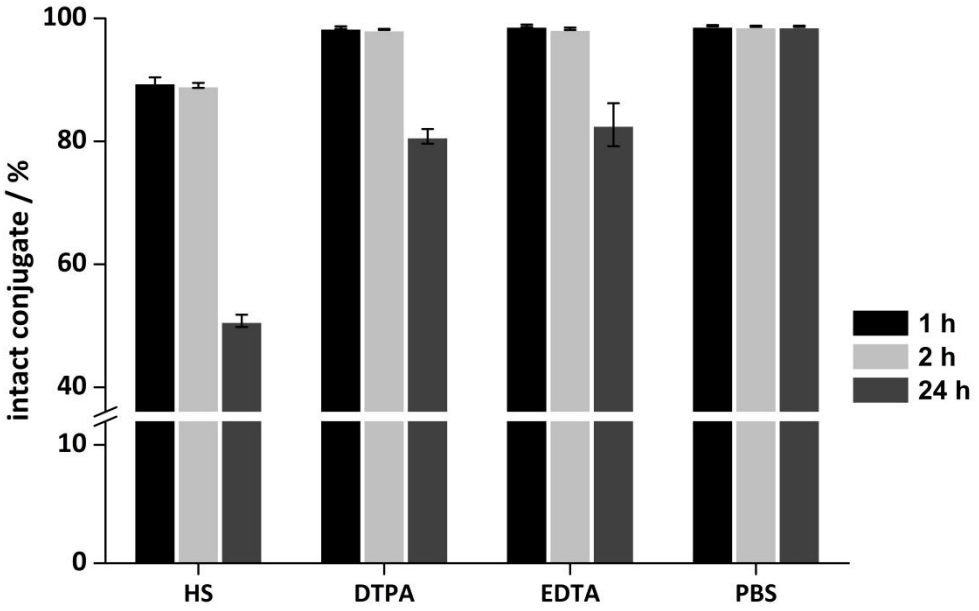


Figure 6: *In vitro* stability of [^{177}Lu]Lu-AAZTA^{5}-Bz-NCS ([^{177}Lu]Lu-**A**) in HS, DTPA, EDTA and PBS after 1 h (■), 2 h (■) and 24 h (■), n=3

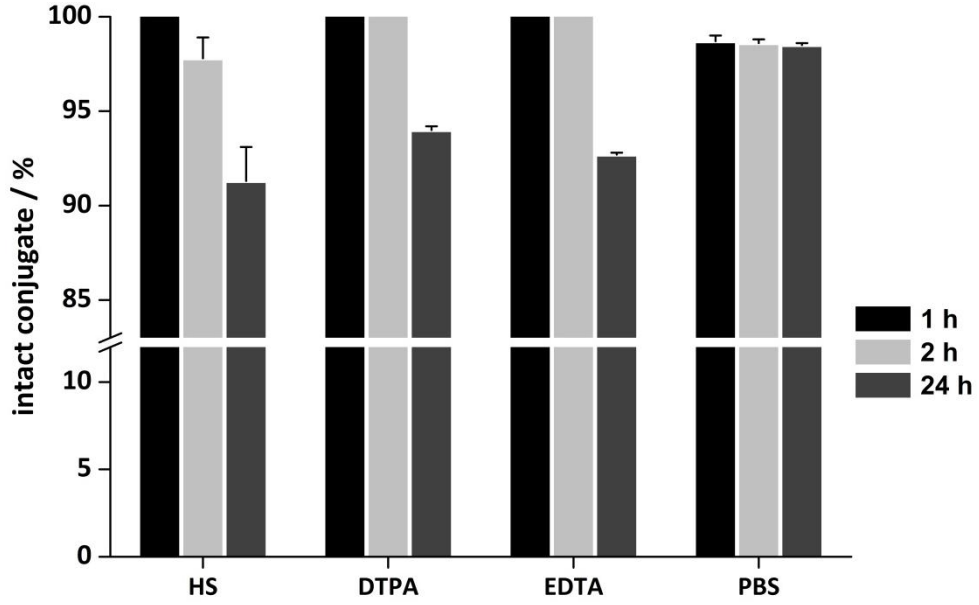


Figure 7: *In vitro* stability of [^{177}Lu]Lu-AAZTA^{5}-en-SA ([^{177}Lu]Lu-**B**) in HS, DTPA, EDTA and PBS after 1 h (■), 2 h (■) and 24 h (■), n=3

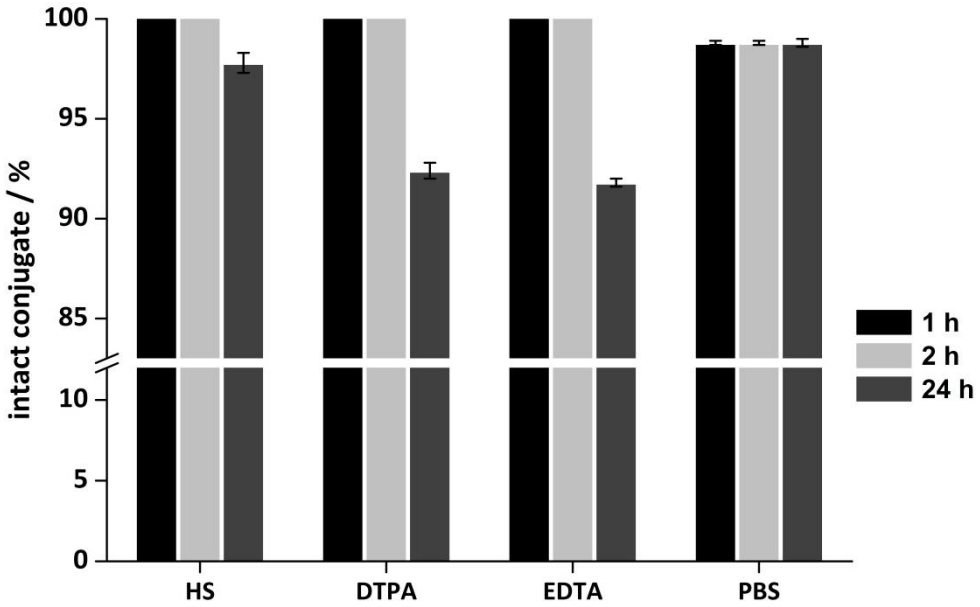


Figure 8: *In vitro* stability of [^{177}Lu]Lu-AAZTA^{5}-TEG-N_3 ([^{177}Lu]Lu-**C**) in HS, DTPA, EDTA and PBS after 1 h (■), 2 h (■) and 24 h (■), n=3

REFERENCES

1. Asti M., Tegoni M., Farioli D., Iori M., Guidotti C., Cutler C.S., Mayer P., Versari A., Salvo D. Influence of cations on the complexation yield of DOTATATE with yttrium and lutetium: A perspective study for enhancing the Y-90 and Lu-177 labeling conditions. Nucl. Med. Biol. 2012; 39(4): 509–17.

2. Breeman W.A.P., De Jong M., Visser T.J., Erion J.L., Krenning E.P. Optimising conditions for radiolabelling of DOTA-peptides with Y-90, In-111 and Lu-177 at high specific activities. Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. 2003; 30(6): 917–20.

3. Wunderlich G., Schiller E., Bergmann R., Pietzsch H.J. Comparison of the stability of Y-90-, Lu-177- and Ga-68- labeled human serum albumin microspheres (DOTA-HSAM). Nucl. Med. Biol. 2010; 37(8): 861–7.

4. Krenning E.P., Kooij P.P.M., Bakker W.H., Breeman W.A.P., Postema P.T.E., Kwekkeboom D.J., Oei H.Y., De Jong M., Visser T.J., Reijs A.E.M., Lamberts S.W.J. Radiotherapy with a radiolabeled somatostatin analogue, In-111-DTPA-[D-Phe1]-Octreotide. A case history. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1994; 733: 496–506.

5. Valkema R., De Jong M., Bakker W.H., Breeman W.A.P., Kooij P.P.M., Lugtenburg P.J., De Jong F.H., Christiansen A., Kam B.L.R., De Herder W.W., Stridsberg M., Lindemans J., Ensing G., Krenning E.P. Phase I Study of Peptide Receptor Radionuclide Therapy With In-111-DTPA-Octreotide: The Rotterdam Experience. Semin. Nucl. Med. 2002; 32(2): 110–22.

6. Kwekkeboom D.J., Müller-Brand J., Paganelli G., Anthony L.B., Pauwels S., Kvols L.K., O'dorisio T.M., Valkema R., Bodei L., Chinol M., Mäcke H.R., Krenning E.P. Overview of results of peptide receptor radionuclide therapy with 3 radiolabeled somatostatin analogs. J Nucl Med. 2005; 46(1): 62S–66S.

7. De Jong M., Bernard B.F., De Bruin E., Van Gameren A., Bakker W.H., Visser T.J., Mäcke H.R., Krenning E.P. Internalization of radiolabelled [DTPA^{0}]octreotide and [DOTA^{0},Try^{3}]octreotide: Peptides for somatostatin receptor-trageted scintigraphy and radionuclide therapy. Nucl. Med. Commun. 1998; 19: 283–8.

8. Mausner L.F., Srivastava S.C. Selection of radionuclides for radioimmunotherapy. Med. Phys. 1993; 20(2): 503–9.

9. Goeckeler W.F., Edwards B., Volkert W.A., Holmes R.A., Simon J., Wilson D. Skeletal localization of samarium-153 chelates: potential therapeutic bone agents. J. Nucl. Med. 1987; 28(4): 495–504.

10. Ma D., Ketring A., Ehrhardt G., Jia W. Production of radiolanthanides and radiotherapy research at MURR. J. Radioanal. Nucl. Chem. 1996; (206): 119–26.

11. Das T., Banerjee S., Samuel G., Sarma H.D., Ramamoorthy N., Pillai M.R.A. Re-188-ethylene dicysteine: A novel agent for possible use in endovascular radiation therapy. Nucl. Med. Commun. 2000; 21(10): 939–45.

12. Pillai M.R.A., Chakraborty S., Das T., Venkatesh M., Ramamoorthy N. Production logistics of Lu-177 for radionuclide therapy. Appl. Radiat. Isot. 2003; 59(2–3): 109–18.

13. Banerjee S., Pillai M.R.A., Knapp F.F. Lutetium-177 therapeutic radiopharmaceuticals: Linking chemistry, radiochemistry, and practical applications. Chem. Rev. 2015; 115(8): 2934–74.

14. Pulukkody K.P., Norman T.J., Parker D., Royle L., Broan C.J. Synthesis of Charged and Uncharged Complexes of Gadolinium and Yttrium with Cyclic Polyazaphosphinic Acid Ligands for in vivo Applications. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1993; 2.

15. Caravan P., Ellison J.J., McMurry T.J., Lauffer R.B. Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics, and Applications. Chem. Rev. 1999; 99(9): 2293–352.

16. Raymond K.N., Pierre V.C. Next generation, high relaxivity gadolinium MRI agents. Bioconjug. Chem. 2005; 16(1): 3–8.

17. Aime S., Calabi L., Cavallotti C., Gianolio E., Giovenzana G.B., Losi P., Maiocchi A., Palmisano G., Sisti M. [Gd-AAZTA]$^{-}$: A new structural entry for an improved generation of MRI contrast agents. Inorg. Chem. 2004; 43(24): 7588–90.

18. Aime S., Bombieri G., Cavallotti C., Giovenzana G.B., Imperio D., Marchini N. An unusual gadolinium ten-coordinated dimeric complex in the series of MRI contrast agents: $Na[Gd(H_2O)AAZTA]_3H_2O$. Inorganica Chim. Acta. 2008; 361(5): 1534–41.

19. Baranyai Z., Uggeri F., Giovenzana G.B., Bényei A., Brücher E., Aime S. Equilibrium and kinetic properties of the lanthanoids(III) and various divalent metal complexes of the heptadentate ligand AAZTA. Chem. - A Eur. J. 2009; 15(7): 1696–705.

20. Price E.W., Orvig C. Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals. Chem. Soc. Rev. 2014; 43(1): 260–90.

21. Hnatowich D.J., Rusckowski M., Brill A.B., Siebecker D.A., Misra H., Mardirossian G., Bushe H., Rescigno A., Stevens S., Griffin T.W., Johnson D.K. Pharmacokinetics in Patients of an Anti-Carcinoembryonic Antigen Antibody Radiolabeled with Indium-111 Using a Novel Diethylenetriamine Pentaacetic Acid Chelator. Cancer Res. 1990; 50(22): 7272–8.

22. Baskin J.M., Prescher J.A., Laughlin S.T., Agard N.J., Chang P. V., Miller I.A., Lo A., Codelli J.A., Bertozzi C.R. Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2007; 104(43): 16793–7.

23. Stimmel J.B., Kull F.C. Samarium-153 and Lutetium-177 chelation properties of selected macrocyclic and acyclic ligands. Nucl. Med. Biol. 1998; 25(2): 117–25.

24. Lewis M.R. Macrocyclic Radiochelates for Antibody Imaging and Therapy of Breast Cancer. 1998. p. 113.

25. Rudd S.E., Roselt P., Cullinane C., Hicks R.J., Donnelly P.S. A desferrioxamine B squaramide ester for the incorporation of zirconium-89 into antibodies. Chem. Commun. 2016; 52: 1–4.

26. Meares C.F., McCall M.J., Reardan D.T., Goodwin D.A., Diamanti C.I., McTigue M. Conjugation of antibodies with bifunctional chelating agents: Isothiocyanate and bromoacetamide reagents, methods of analysis, and subsequent addition of metal ions. Anal. Biochem. 1984; 142(1): 68–78.

27. Brechbiel M.W., Gansow O.A., Atcher R.W., Schlom J., Esteban J., Simpson D.E., Colcher D. Synthesis of 1-(p-isothiocyanatobenzyl) derivatives of DTPA and EDTA. Antibody labeling and tumor-imaging studies. Inorg. Chem. 1986; 25(16): 2772–81.

28. Esteban J.M., Schlom J., Gansow O.A., Atcher R.W., Brechbiel M.W., Simpson D.E., Colcher D. New Method for the Chelation of Indium-111 to Monoclonal Antibodies: Biodistnbution and Imaging of Athymic Mice Bearing Human Colon Carcinoma Xenografts. 1987; 28(5): 861–71.

29. Halime Z., Frindel M., Camus N., Orain P.-Y., Lacombe M., Cherel M., Gestin J.-F., Faivre-Chauvet A., Tripier R. New synthesis of phenyl-isothiocyanate C-functionalised cyclams. Bioconjugation and Cu-64 phenotypic PET imaging studies of multiple myeloma with the te2a derivative. Org. Biomol. Chem. 2015; 13(46): 11302–14.

30. Tietze L.F., Arlt M., Beller M., Glüsenkamp K.-H., Jähde E., Rajewsky M.F. Anticancer Agents, 15. Squaric Acid Diethyl Ester: A New Coupling Reagent for the Formation of Drug Biopolymer Conjugates. Synthesis of Squaric Acid Ester Amides and Diamides. Chem. Ber. 1991; 124(5): 1215–21.

31. Jewett J.C., Bertozzi C.R. Cu-free click cycloaddition reactions in chemical biology. Chem. Soc. Rev. 2010; 39(4): 1272–9.

32. Huisgen R. 1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future. Angew. Chem. Int. Ed. 1963; 2(10): 565–98.

33. Liu X., Hermange P., Ruiz J., Astruc D. Pd/C as an Efficient and Reusable Catalyst for the Selective N-Alkylation of Amines with Alcohols. ChemCatChem. 2016; (2 mL): 1043–5.

34. García Ruano J.L., Parra A., Alemán J., Yuste F., Mastranzo V.M. Monoalkylation of primary amines and N-sulfinylamides. Chem. Commun. (Camb). 2009; 404–6.

35. Russell H.F., Bremner J.B., Bushelle-Edghill J., Lewis M.R., Thomas S.R., Bates F. A new palladium-mediated approach to 4-N-arylamino-1-butanols from peroxidic tetrahydrofuran and primary aromatic amines. Tetrahedron Lett. 2007; 48(9): 1637–9.

36. Donovan S.F., Pescatore M.C. Method for measuring the logarithm of the octanol-water partition coefficient by using short octadecyl-poly(vinyl alcohol) high-performance liquid chromatography columns. J. Chromatogr. A. 2002; 952(1–2): 47–61.

37. Wenzel B., Mollitor J., Deuther-Conrad W., Dukic-Stefanovic S., Kranz M., Vraka C., Teodoro R., Günther R., Donat C.K., Ludwig F.A., Fischer S., Smits R., Wadsak W., Mitterhauser M., Steinbach J., Hoepping A., Brust P. Development of a Novel Nonpeptidic 18F-Labeled Radiotracer for in Vivo Imaging of Oxytocin Receptors with Positron Emission Tomography. J. Med. Chem. 2016; 59(5): 1800–17.

38. Smith C.J., Gali H., Sieckman G.L., Hayes D.L., Owen N.K., Mazuru D.G., Volkert W.A., Hoffman T.J. Radiochemical investigations of Lu-177-DOTA-8-Aoc-BBN[7-14]NH2: An in vitro/in vivo assessment of the targeting ability of this new radiopharmaceutical for PC-3 human prostate cancer cells. Nucl. Med. Biol. 2003; 30(2): 101–9.

39. Baur B., Solbach C., Andreolli E., Winter G., Machulla H.J., Reske S.N. Synthesis, radiolabelling and in vitro characterization of the gallium-68-, yttrium-90- and lutetium-177-labelled PSMA Ligand, CHX-A"-DTPA-DUPA-Pep. Pharmaceuticals. 2014; 7(5): 517–29.

40. Kruper W.J., Fordyce W.A., Sherry A.D. Carboxamide Modified Polyamine Chelators and Radioactive Complexes thereof for Conjugation to Antibodies. 1994. p. 13.

41. Pribish J.R. Acid cleavable compounds, their Preparation and use as bifunctional acid-labile crosslinking agents. 1996. p. 15.

42. Cooper R.S. Crown Compounds: Towards Future Applications. 1992.

43. Rüdiger V., Schneider H.J., Solov'ev V.P., Kazachenko V.P., Raevsky O.A. Crown ether-ammonium complexes: Binding mechanisms and solvent effects. European J. Org. Chem. 1999; (8): 1847–56.

44. Aime S., Barge A., Botta M., Fasano M., Danilo Ayala J., Bombieri G. Crystal structure and solution dynamics of the lutetium(III) chelate of DOTA. Inorganica Chim. Acta. 1996; 246(1–2): 423–9.

45. Pfister J., Summer D., Rangger C., Petrik M., von Guggenberg E., Minazzi P., Giovenzana G.B., Aloj L., Decristoforo C. Influence of a novel, versatile bifunctional chelator on theranostic properties of a minigastrin analogue. EJNMMI Res. 2015; 5(1): 74.

46. Perk L.R., Vosjan M.J.W.D., Visser G.W.M., Budde M., Jurek P., Kiefer G.E., Van Dongen G.A.M.S. P-Isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine: A new bifunctional chelate for facile radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for immuno-PET imaging. Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. 2010; 37(2): 250–9.

47. Vosjan M.J.W.D., Perk L.R., Visser G.W.M., Budde M., Jurek P., Kiefer G.E., Van Dongen G.A.M.S. Conjugation and radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for PET imaging using the bifunctional chelate p-isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine. Nat. Protoc. 2010; 5(4): 739–743.

6.0 Hauptabschnitt 3: kleinere Projekte und Kooperationen

6.1 Prediction of normal organ absorbed doses for [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 using [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 biokinetic and dosimetric analysis data

A. Khawar[1*], E. Eppard[1*], J.P. Sinnes[2*], F. Roesch[2*], H. Ahmadzadehfar[1*], S. Kürpig[1*], M. Meisenheimer[1*], F.C. Gaertner[1*], M. Essler[1*#] R. A. Bundschuh[1*#].

[1] Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin, Universitätsklinikum Bonn

[2]Institut für Kernchemie, Universität Mainz

Published in Clinical Nuclear Medizin 2018;43: 486–491

Doi: 10.1097/RLU.0000000000002102

ABSTRACT:

Aim: *In vivo* pharmacokinetic analysis of [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 was used to determine the normal organ absorbed doses that may result from therapeutic activity of [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 and to predict the maximum permissible activity of [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 for patients with metastatic castration resistant prostate carcinoma (mCRPC) .

Method: Pharmacokinetics of [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 was evaluated in five mCRPC patients using dynamic PET/CT, followed by three static PET/CT acquisitions and blood sample collection over 19.5 h as well as urine sample collection at two time points. Total activity measured in source organs by PET imaging, as well as counts/ml measured in in blood and urine samples were decay corrected back to the time of injection using the half-life of ^{44}Sc. Afterwards, forward decay correction using the half-life of ^{177}Lu was performed, extrapolating the pharmacokinetics of [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 to that of [^{177}Lu]Lu-PSMA-617. Source organs residence times and organ absorbed doses for [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 were calculated using OLINDA/EXM software. Bone marrow self-dose was determined with indirect blood based method and urinary bladder contents residence time was estimated by trapezoidal approximation. The maximum permissible activity of [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 was calculated for each patient considering external beam radiotherapy (EBRT) toxicity limits for radiation absorbed doses to kidneys, bone marrow, salivary glands and whole body.

Results: The predicted mean organ absorbed doses were highest in the kidneys (0.44 mSv/MBq) followed by the salivary glands (0.23 mSv/MBq). The maximum permissible activity was highly variable among patients; limited by whole body absorbed dose (one patient), marrow absorbed dose (one patient) and kidney absorbed dose (three patients).

Conclusions: [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 PET/CT imaging is feasible and allows theoretical extrapolation of the pharmacokinetics of [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 to that of [^{177}Lu]Lu-PSMA-617, with the intent of predicting normal organ absorbed doses and maximum permissible activity in patients scheduled for therapy with [^{177}Lu]Lu-PSMA-617.

Key words:

[^{177}Lu]Lu-PSMA-617 therapy; [^{44}Sc]Sc-PSMA-617; dosimetric analysis; normal organ absorbed doses; maximum permissible activity.

INTRODUCTION

Prostate carcinoma is the second most common cancer among men [1,2]. The prognosis of prostate carcinoma is good at an early stage. With development of refractoriness to hormone replacement therapy in advanced stages, 5 year survival in these patients decreases to 31% [1, 2]. Expression of prostate-specific-membrane-antigen (PSMA) is upregulated in metastatic castration resistant prostate carcinoma (mCRPC) cells [3, 4]. During the past two decades various studies have evaluated a number of small ligands targeting the extracellular domain of PSMA [4]. With the introduction of the small ligand, PSMA-617 by M. Benešová et al [5] a highly potent radiopharmaceutical showing a high tumor to background ratio has become available for theranostic application. It is now widely used, radiolabeled with ^{68}Ga for PET imaging and with ^{177}Lu for therapy of mCRPC. ^{177}Lu with a half-life of 6.7 days(161.52 h) and predominant β^- particle emission (mean range = 1mm) is considered more efficient and safer therapeutic radionuclide compared to ^{90}Y or ^{131}I [4].

Since 2015, several studies have shown a good therapeutic efficacy and a favorable safety profile of [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 therapy in mCRPC patients [1, 2, 4-8]. However, physiologic expression of PSMA in the small intestine, proximal renal tubules and salivary glands was found responsible for toxicity and side effects [1, 9, 10]. Occasional cases of reversible or transient xerostomia or grade 2 hematological toxicity have been reported, yet the incidence of grade 3 or 4 renal, hematological and salivary gland toxicity has been found to be low [10, 11].

Kidneys, salivary and lacrimal glands have also been reported to be organs at risk by dosimetric analysis with low pre-therapeutic and high post-therapeutic dose of [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 using planar ± SPECT imaging [9, 12-16]. [^{68}Ga]Ga-PSMA-617 PET imaging has been evaluated as a basis for dosimetric evaluation, which revealed similar kinetics but resulted in lower doses compared to [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 [17]. However both; [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 and [^{68}Ga]Ga-PSMA-617 PET imaging have drawbacks and inherent limitations for predicting pre-therapeutic or intra-therapeutic radiation dosimetry purposes.

An overall success of [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 therapy with clinically detectable decline in serum prostate-specific antigen (PSA) has been observed in approximately 70% of mCRPC patients [6, 18]. Evaluation of response patterns after multiple cycles of [^{177}Lu]Lu-PSMA-617therapy has shown further improvement of response after the first cycle and also induction of response in initial non-responders at end of the third cycle, hence propagating the use of further therapy cycles in initial non-responders [6]. It is widely assumed that dose escalation may be employed in non-responders,

which is at the moment based only on individual experiences at the respective centers. Employment of pre-therapeutic dosimetric analysis, although highly desirable for dose escalation, has practical limitations. Pre-therapeutic dosimetric analysis with [^{68}Ga]Ga-PSMA-617 is of limited use because of its short half-life of only 1.18 h, compared to the half-life of 6.7 days of its therapeutic counterpart [^{177}Lu]Lu-PSMA-617. Furthermore, a recent pre-clinical comparison of [^{68}Ga]Ga-PSMA-617 with [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 has also highlighted that *in vivo* binding and distribution also differs due to the coordination chemistry of the two radionuclides [19].

In some countries, pre-therapeutic dosimetry using low dose [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 planar ± SPECT imaging requires hospitalization of the patient due to radiation protection laws. Also imaging at multiple time points, as well as blood and urine sampling leads to increased radiation exposure of the hospital staff. In addition, it is challenging to determine lacrimal gland doses. Last but not least, the results from a low dose [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 study may differ from the biokinetics of higher therapeutic doses of [^{177}Lu]Lu-PSMA-617, owing to the presence of more unlabeled compound in the therapeutic radiopharmaceutical product [8, 12, 13].

Recent studies of PSMA-617 radiolabeled with positron emitter ^{44}Sc (half-life of 3.927 h) have shown similar *in vitro* binding characteristics and *in vivo* biodistribution properties compared to [^{177}Lu]Lu-PSMA-617. It is therefore envisioned a better pre-therapeutic dosimetric evaluation agent [19]. In this study pre-therapeutic [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 PET/CT dosimetry has been employed to estimate the organ doses of [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 therapy by mathematical extrapolation of pharmacokinetics of [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 to that of [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 in mCRPC patients.

MATERIALS AND METHODS

All procedures were in accordance with the ethical standards of the institutional review board and all patients gave written informed consent before PET/CT imaging.

Patient population:

A total of five mCRPC patients with a mean age of 69 years were retrospectively analyzed. 40-62 MBq (1.08 – 1.68mCi) of [^{44}Sc]Sc-PSMA 617 were injected intravenously (table 1).

Table 1: Characteristics of study population

Pt.No	Age	Weight, kg	Hematocrit	Injected Activity(MBq)	Injected Activity/MBq
1	70	78	0.33	50.00	0.64
2	72	80	0.30	62.23	0.78
3	67	70	0.39	39.61	0.57
4	70	80	0.30	50.00	0.63
5	67	104	0.29	48.95	0.47
Mean	69	82.4	0.32	50.16	0.62
± SD	2.2	12.76	0.04	8.04	0.11

Preparation of [^{44}Sc]-PSMA-617:

Radiolabeling of GMP-grade PSMA-617 obtained from ABX (Radeberg, Germany) with ^{44}Sc eluted from a prototype 185 MBq (5 mCi) ^{44}Ti/^{44}Sc generator (Mainz) was performed as previously described [20]. Radiolabeling yields of >90% with a radiochemical purity of >99% were achieved.

[^{44}Sc]Sc-PSMA-617 PET/CT Imaging Protocol:

A Siemens Biograph 2 PET/CT scanner with a 58.5 cm axial and a 16.2 cm longitudinal field of view (FOV) and a spatial resolution of about 6 mm in axial and transversal direction (at a radius of 10 mm), was used for PET/CT imaging. A dynamic PET scan (list- mode) of the abdomen (kidneys in FOV) was acquired, following a low dose CT scan (120kV, 40mAs). Three whole body (skull to mid-thigh) static scans were acquired at 45 min, 2 and 19.5 h p.i. in combination with a preceding low-dose CT for patient positioning and attenuation correction. For qualitative and quantitative analysis, dynamic images were reconstructed from list-mode data (6 frames of 300 s) using an iterative reconstruction algorithm (OSEM with 8 iterations, 16 subsets), application of Gaussian filter of 4mm and were corrected for scatter.

Qualitative: Analysis

All dynamic and static images were visually analyzed with regard to physiological and pathological tracer distribution as shown in figure 1. Organs with increased tracer uptake were identified as source organs for further dosimetric analysis.

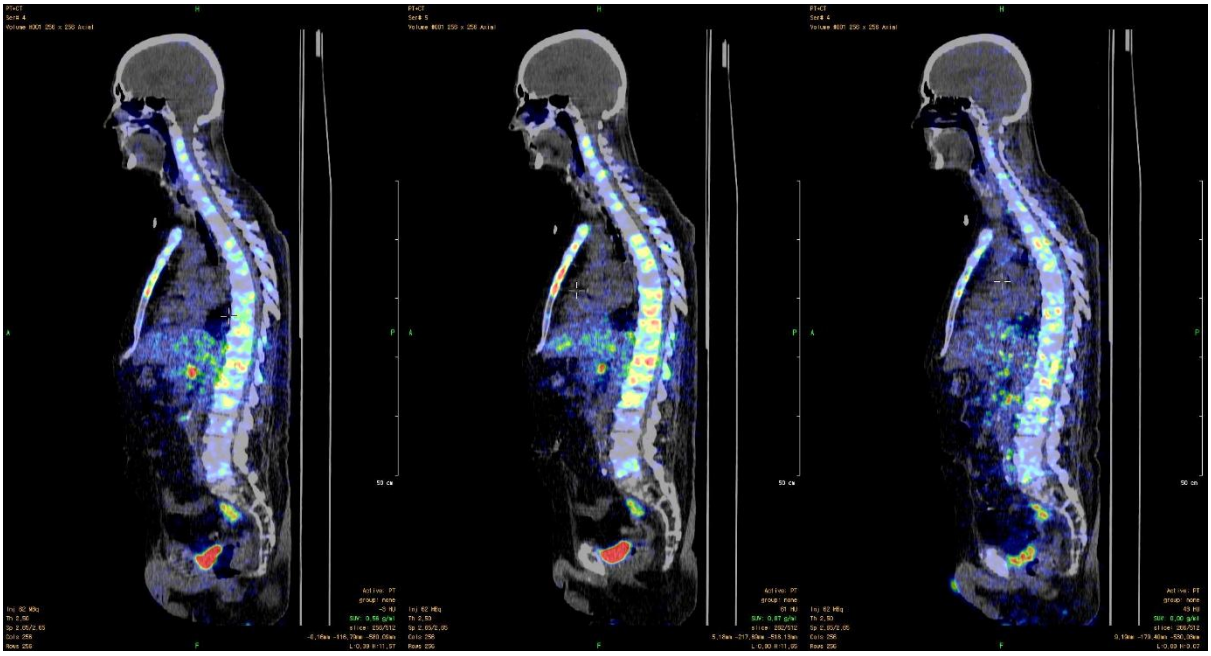


Figure 1: Distribution of [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 at 45 min, 2 and 19.5 h (from left to right)

Quantitative Dosimetric Analysis:

Interview fusion software (MEDISO Medical Imaging Systems, Budapest, Hungary) was used to draw volumes of interest (VOI) on the CT scan to assess the volume of source organs and to measure the mean activity (kBq/ml) from corresponding co-registered PET images (6 dynamic and 3 static images). Source organs identified for dosimetric analysis included kidneys, liver, spleen, urinary bladder, small intestine, salivary glands and whole body. Total source organ activity was calculated by multiplication of the volume of the source organ with corresponding mean activity (kBq/ml) and converted to MBq/ml. Total activity of [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 in source organs was extrapolated to a theoretical [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 activity at all imaging time points by applying equation 1.

$$Activity_{Lu\ Corrected} = A(t) \times e^{\frac{0.693 \times t(h)}{3.927h}} \times e^{\frac{-0.693 \times t(h)}{161.52h}}$$

The physical decay component of ^{44}Sc was removed by reverse decay correction to the time of injection leaving only the biological decay component of PSMA-617. By applying forward decay correction with the physical half-life of ^{177}Lu (161.52 h) theoretical [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 kinetics were extrapolated for all imaging time points. In case of whole body activity calculation above method was applied until the 2 h time point. Then physical decay correction for ^{177}Lu was carried forward

from 2 h time point. Reason for this was to remove an error of increment in activity at the last 19.5 h time point for the whole body activity calculation.

Percent (%) source organ activity was calculated for all source organs by dividing total source organ activity by injected activity and multiplying it with 100. However, for % whole body activity calculation, instead of whole injected activity, scaled injected activity with respect to proportion of body weight imaged was used. As homogenous tracer distribution in remainder of the body (legs and arms not included in the PET/CT FOV) was assumed the % injected dose at time of injection in image was scaled proportional to % weight of body in image calculated by using equation no 2.

$$\%\ Body\ weight(image) = \frac{CT\ volume\ of\ whole\ bodyimage \times mean\ CT\ density\ \times 100}{Patient\ weight}$$

$$whole\ body\ activity(t) = \frac{Activity\ in\ static\ (skull - midthigh)image\ (t)\ \times\ 100}{Scaled\ injected\ activity\ in\ image}$$

Percent source organ activity was used to generate time activity curves and to calculate residence time using OLINDA/EXM software (Hermes, Germany). Bi-exponential curve fitting for all source organs and mono exponential curve for the whole body was applied. For determination of residence time of the remainder of body, the residence times of all source organs except urinary bladder were subtracted from whole body residence time as explained by Michael G. Stabin [21].

To determine bone marrow self-dose 1-2 ml venous blood samples were collected at nine time points (5, 10, 15, 20, 25, 30, 45 min, 2 and 19.5 h p.i.). Urine samples were also collected in pre weighed containers after 45 min and 2 h static PET/CT imaging for determination of urinary bladder contents residence time. Radioactivity in 1 ml blood and urine samples was measured along with known standard activity using 1480 WIZARD^{TM} 3n Gamma counter. Activity (MBq)/ml data of blood and urine samples were treated in the same way as described for source organs activity to extrapolate the theoretical activity of [^{177}Lu]Lu-PSMA-617. The indirect blood-based method considering patient hematocrit based red marrow to blood ratio (RMBLR) and patient adjusted red marrow mass [22-27] was used to calculate the self-dose to bone marrow. To calculate the residence time of urinary bladder contents, the trapezoidal method was used while taking into account urinary bladder activity in the PET data sets at 45 min, 2 and 19.5 h along with activity in urine samples.

Mean organ absorbed doses were calculated by using OLINDA/EXM software (Hermes, Germany). For this patient weight was adjusted by multiplying the reference adult male body weight with the fraction determined by dividing the patient weight with the reference adult weight.

Mean residence times, organ absorbed doses (mSv/MBq) and effective doses (mSv/MBq) were calculated. Considering toxicity limits derived from external beam radiotherapy (EBRT) for kidneys, salivary glands, bone marrow, liver, urinary bladder and whole body, the maximum permissible activity and the maximum number of therapy cycles of [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 (6 GBq per cycle) that can be administered in each patient were determined.

RESULTS

Extrapolated individual and mean residence times (MBq-h/MBq) of [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 are shown in table 2. Highest residence times were observed in the liver followed by the kidneys, small intestine, bone marrow, urinary bladder, salivary glands and spleen. Residence times of the remainder of body were highly variable and were highest in patient 1 with high kidney and bone marrow residence times.

Table 2: Individual and mean residence times

Patient No	PT1	PT2	PT3	PT4	PT5	mean	SD
Organs							
Salivary glands	0.10	0.59	0.24	0.19	0.08	0.24	0.21
Kidneys	1.07	1.25	1.17	1.96	2.09	1.51	0.48
Liver	3.48	2.85	3.31	6.18	6.46	4.46	1.72
Spleen	0.28	0.19	0.09	0.15	0.20	0.18	0.07
Small Intestine	0.83	0.45	0.71	1.05	0.09	0.63	0.37
Bone marrow	0.08	0.66	0.06	0.12	1.67	0.52	0.69
Urinary bladder contents	0.23	0.25	0.18	0.90	0.08	0.33	0.32
Remainder of body	64.12	43.72	22.40	44.86	57.80	46.58	16.04

Extrapolated individual and mean organ absorbed doses of [^{177}Lu]Lu-pSMA-617 are given in table 3. The kidneys showed the highest organ absorbed doses (mean of 0.44 mSv/MBq), followed by the salivary glands (0.23 mSv/MBq), liver (0.22 mSv/MBq), small intestine (0.14 mSv/MBq), spleen and urinary bladder wall with 0.12 mSv/MBq each. Mean bone marrow absorbed dose was found to be 0.05 mSv/MBq and mean whole body dose was 0.08 mSv/MBq.

Table 3: Individual and mean Organ Absorbed doses (mSv/MBq)

Patient No	PT 1	PT 2	PT 3	PT4	PT5	Mean	SD
Organs							
Adrenals	0.04	0.06	0.04	0.07	0.06	0.05	0.01
Brain	0.08	0.05	0.03	0.05	0.05	0.05	0.02
Esophagus	0.10	0.05	0.03	0.05	0.05	0.06	0.02
Eyes	0.08	0.05	0.03	0.05	0.05	0.05	0.02
Gall bladder wall	0.13	0.06	0.04	0.06	0.06	0.07	0.03
Left colon	0.13	0.05	0.03	0.06	0.06	0.07	0.04
Small intestine	0.20	0.11	0.12	0.19	0.07	0.14	0.06
Stomach wall	0.12	0.05	0.03	0.06	0.05	0.06	0.03
Right colon	0.10	0.05	0.03	0.06	0.06	0.06	0.03
Rectum	0.08	0.05	0.03	0.06	0.05	0.06	0.02
Heart Wall	0.09	0.05	0.03	0.06	0.06	0.06	0.02
Kidneys	0.54	0.33	0.34	0.52	0.47	0.44	0.10
Liver	0.24	0.14	0.17	0.29	0.26	0.22	0.06
Lungs	0.09	0.05	0.03	0.05	0.05	0.06	0.02
Pancreas	0.13	0.05	0.03	0.06	0.06	0.07	0.04
Prostate	0.08	0.05	0.03	0.06	0.05	0.06	0.02
Salivary glands	0.11	0.55	0.25	0.18	0.07	0.23	0.19
Red Marrow	0.07	0.06	0.03	0.04	0.04	0.05	0.02
Osteogenic cells	0.06	0.04	0.02	0.03	0.03	0.04	0.02
Spleen	0.26	0.11	0.06	0.09	0.10	0.12	0.08
Testes	0.08	0.05	0.03	0.05	0.05	0.05	0.02
Thymus	0.08	0.05	0.03	0.05	0.05	0.05	0.02
Thyroid	0.08	0.05	0.03	0.05	0.05	0.05	0.02
Urinary Bladder wall	0.13	0.10	0.07	0.24	0.07	0.12	0.07
Total Body	0.17	0.06	0.04	0.06	0.06	0.08	0.05

Absorbed doses (Gy) delivered by one cycle (6 GBq) of [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 were estimated, the results are listed in table 4. One cycle of [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 resulted in a theoretical mean absorbed dose of 2.65 Gy (range: 2 - 3.26 Gy) for the kidneys, followed by the salivary glands, liver, small intestine, spleen, urinary bladder, total body and red marrow. The organ receiving highest dose were the kidneys with an exception of patient 2 where the highest absorbed dose was calculated for the salivary glands.

Table 4: Organ absorbed doses (Gy) received by 1 cycle of 6 GBq administration of Lu-PSMA-617

Patient No	PT 1	PT 2	PT 3	PT4	PT5	Mean
Organs						
Small intestine	1.21	0.65	0.71	1.11	0.39	0.84
Kidneys	3.26	2.00	2.04	3.13	2.81	2.65
Liver	1.42	0.82	1.02	1.75	1.54	1.31
Salivary glands	0.64	3.30	1.47	1.10	0.39	1.38
Red Marrow	0.41	0.37	0.16	0.26	0.21	0.28
Osteogenic cells	0.35	0.24	0.11	0.19	0.17	0.21
Spleen	1.58	0.64	0.36	0.53	0.59	0.74
Urinary Bladder wall	0.76	0.62	0.41	1.44	0.42	0.73
Total Body	1.02	0.35	0.22	0.38	0.36	0.47

Maximum permissible activity and maximum number of cycles (6 GBq/cycle) of [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 that can be administered in each patient with respect to dose limits derived from external beam radiotherapy(EBRT) i.e. kidneys (23 Gy), bone marrow(2 Gy), whole body(2 Gy), salivary glands(25 Gy), liver(30 Gy), small intestine(40 Gy) and urinary bladder(60 Gy) are given in table 5 and 6 respectively. In patient 1 and 2, maximum permissible activity was determined by the red marrow absorbed dose and in patient 3, 4 and 5, the kidney absorbed dose was the limiting factor. In case of patient 1, also renal dose was high, resulting in a high cumulative dose to the whole body further limiting the maximum permissible activity. Toxicity limits for the salivary glands, small intestine and urinary bladder were found to exert no influence in this context.

Table 5: Maximum dose permissible in individual patients considering toxic limits for organs with EBRT

Patient No	PT 1	PT 2	PT 3	PT 4	PT 5	Mean	No of 6 GBq cycles
Organs							
Small intestine	198.02	366.97	336.13	216.22	611.62	285.00	47.5003
Kidneys	42.36	68.86	67.65	44.06	49.15	52.11	8.684489
Liver	126.58	220.59	176.47	103.09	117.19	137.61	22.93578
Salivary glands	377.36	72.73	163.27	218.58	607.90	173.94	28.99
Red Marrow	29.07	32.52	74.07	46.95	56.66	42.52	7.09
Urinary Bladder wall	472.44	576.92	874.64	250.00	865.80	492.69	82.11529
Total Body	11.76	34.60	54.20	31.55	33.22	25.75	4.29

Table 6: Maximum cycles of 6 GBq permissible in individual patients considering toxic limits for organs with EBRT

Patient No	PT 1	PT 2	PT 3	PT 4	PT 5	Mean
Organs						
Small intestine	33.00	61.16	56.02	36.04	101.94	47.50
Kidneys	7.06	11.48	11.27	7.34	8.19	8.68
Liver	21.10	36.76	29.41	17.18	19.53	22.94
Salivary glands	62.89	12.12	27.21	36.43	101.32	28.99
Red Marrow	4.84	5.42	12.35	7.82	9.44	7.09
Urinary Bladder wall	78.74	96.15	145.77	41.67	144.30	82.12
Total Body	1.96	5.77	9.03	5.26	5.54	4.29

Comparison of extrapolated organ absorbed doses (Gy/GBq) from our current study with pre-therapeutic low-dose and post-therapeutic high-dose [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 therapy radiation dosimetry analysis from the literature (table 7) showed comparably lower doses to the kidneys and salivary glands, however higher doses to the red marrow and total body in our study. The rest of organ absorbed doses were comparable.

Table 7: Comparison of organ absorbed doses (Gy/GBq) of current study with pre and post [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 therapy dosimetric studies [9, 12-16].

	Post High dose [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 therapy					**PreLlow dose [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 therapy**	**[^{44}Sc]Sc-PSMA-617**
Study Name	**Delker et al**	**Kratochwil C et al**	**Fendler et al**	**Kulkarni HR et al**	**Okamoto et al**	**L Kabasakal et al**	**Current study**
Organs							
Small intestine							0.14
Kidneys	0.6	0.75	0.5/0.6	0.8	0.69	0.88	0.44
Liver	0.11	0.1	0.1		0.11	0.28	0.22
Salivary glands	1.41	1.48	1	1.3	0.58	1.17	0.23
Red Marrow	0.012	0.03	0.002	0.03		0.034	0.05
Osteogenic cells							0.04
Spleen	0.1	0.19	0.1				0.12
Urinary Bladder wall		0.2					0.12
Total Body				0.04	0.05	0.061	0.08
Dose inj.	3.6			5.76	7.00	0.185	6

DISCUSION

Scandium-44 with a half-life of 3.927 h enables imaging for up to 18-20 h p.i. which is one of its most important advantages over ^{68}Ga- labeled compounds (half-life of 1.18 h) for dosimetry uses. Therefore, [^{44}Sc]Sc-pSMA-617 is better suited for the evaluation of the biological half-life in vivo, which is an important factor for organ dose calculation, as small errors in the assessment of the biological half-life may result in significant deviations in the result of estimated organ dose. Further knowing that preclinical *in vitro* and *in vivo* studies have shown better correlation of [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 with [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 as compared to ^{68}Ga labeled PSMA ligands, we hypothesized that dosimetric analysis from 19.5 h imaging data of [^{177}Sc]Sc-PSMA-617 could be used to more accurately estimate the potential organ doses delivered by [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 in individual patients [19]. Recent dosimetric analysis with [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 has further strengthened the fact that it can reliably interpret the pharmacodynamics of PSMA [26].

The mean ± SD of extrapolated residence time for [^{177}Lu]Lu-PSMA_617 for the remainder of the body in our study was 46.58 ±16.04 h (range: 22.4 -64.12 h), which is in line with the results of the study of L. Kabasakal et al, (mean ± SD 37.9 ± 14.6 h ; range: 24.6 – 62.0 h) [12]. We also observed that patient 1, who had renal insufficiency as well as extensive bone metastasis, exhibited the longest residence time, which is consistent with the observations of L. Kabasakal et al [12].

The extrapolated mean organ absorbed doses for [^{177} Lu]Lu-PSMA-617in our study are comparable with other pre-therapeutic and post-therapeutic dosimetry results obtained with [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 as shown in table 7 [9,12-16]. However, we observed a lower mean absorbed dose in the kidneys, compared to previous studies. This might be explained by the analysis of 3D PET/CT activity distribution in the kidneys, as compared to 2D planar gamma camera-based distribution measurement, which has inherent potential of over-estimation of kidney dose owing to activity contribution from overlapping organs. On the other hand, we observed a higher mean organ absorbed doses in whole body as compared to previous studies. This difference is mainly caused by the high residence time in the remainder of body in patient 1. The mean organ absorbed doses in the remaining organs are comparable to the values observed by previous studies.

Pre-therapeutic dosimetry aims at improving and tailoring dose delivery to tumor lesions while maintaining safety and avoiding toxicity to normal organs. With previous knowledge from the literature, we mainly considered the kidneys, bone marrow and salivary gland toxicity as organs at risk for the potential development of side effects. Organ absorbed doses that could result from

administration of 6 GBq [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 (1 cycle) in all patients were calculated as shown in table 4. The kidneys received the highest organ dose in most patients except in patient 2, which had the highest dose delivered to the salivary glands.

Calculation of the maximum permissible activity and number of cycles (6 GBq/cycle) with [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 to reach EBRT based organ absorbed dose limits, as shown in table 5 and 6, revealed varying results among patients. In patient 1 bone marrow toxicity limits were reached earlier than the kidney toxicity limits, however the whole body toxicity limit was reached at even lower activity, which might require strict monitoring and possibly dose reduction in this patient when performing [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 therapy. This finding is consistent with the compromised renal function and high skeletal tumor burden in this patient, which together result in a high dose to the total body.

In patient 2 bone marrow toxicity limits constrained the maximum permissible activity and the maximum number of cycles that can be administered, which is consistent with the observation already discussed in the literature that high skeletal tumor burden and can result in high bone marrow absorbed doses, which might lead to grade 1-2 hematological toxicity from [^{177}Lu]Lu-PSMA-617, especially when bone marrow function is already compromised owing to prior extensive treatment with chemotherapy/radiotherapy [18]. In the remaining three patients kidney toxicity thresholds appeared to be the dose limiting factor. Overall, except for patient 1, administration of up to 5 cycles of 6 GBq seems to be feasible without reaching toxicity limits.

Though the kidneys were an organ at risk with high organ absorbed doses, we found that in order to reach EBRT-derived dose limit of 23 Gy, a mean cumulative activity of 52 GBq can be administered. It is apparently higher than values found in literature for [^{177}Lu]Lu-PSMA-617, which were calculated to be 30 GBq by Kabasakal et al [12], a difference that can be explained owing to 2D versus 3D dosimetry inherent limitations. Moreover, A. Delker et al used 3D SPECT of abdomen for dosimetric analysis of [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 and reported a mean absorbed dose of 0.6 GY/GBq for kidneys which may allow up to 38 GBq to be administered safely [13]. Use of mono-exponential non-linear least squares fit to time activity curve and a linear interpolation from time of injection in contrast to bi-exponential curve fitting and availability of dynamic data from time of injection in our current study might be the cause of this disparity between A Delker et al and our current study. Moreover, it is also believed that toxicity limit for kidneys with [^{177} Lu]Lu-PSMA-617 therapy should be increased [18]. Considering 25 Gy as dose limit for reversible toxicity to salivary glands it was seen that even in patient 2 with highest salivary glands absorbed dose it was not a limiting factor for permissible activity calculation in that patient. The finding is supported with evidence of 4-25%

occurrence of transient reversible xerostomia and dry mouth with [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 therapy in various studies [18].

Our current study shows that the conversion from pre-therapeutic pharmacokinetic data obtained by [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 PET/CT to potential normal organ absorbed doses for [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 therapy is feasible. However, further studies are warranted to validate extrapolated organ doses from pre-therapeutic [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 PET/CT with post-therapeutic [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 dosimetry data and to correlate dosimetry results with clinical toxicity and side effects. Furthermore, the prediction of absorbed doses in tumour lesions by [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 PET/CT remains to be investigated.

Conclusion

Prediction and calculation of organ absorbed doses in patients scheduled for [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 therapy seems to be feasible by pre-therapeutic [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 PET/CT. It might prove to be helpful in the pre-therapeutic assessment of organs at risk, which seem to be are variable among patients, and eventually aid in tailoring personalized PSMA-targeted radionuclide therapy regimens. However, correlation of clinical toxicity data with pre-therapeutic [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 PET/CT based dosimetry results remains to be investigated in larger-scale studies before final conclusions can be drawn.

References

1. Ahmadzadehfar H, Eppard E, Kürpig S, et al. Therapeutic response and side effects of repeated radioligand therapy with ^{177}Lu-PSMA-DKFZ-617 of castrate-resistant metastatic prostate cancer. 2016;7:12477-12488.

2. Rahbar K, Ahmadzadehfar H, Kratochwil C, et al. German multicenter study investigating ^{177}Lu-PSMA-617 radioligand therapy in advanced prostate cancer patients. J Nucl Med. 2016;58:85-91.

3. Lütje S, Heskamp S, Cornelissen AS, et al. PSMA Ligands for Radionuclide Imaging and Therapy of Prostate Cancer: Clinical Status. Theranostics. 2015;5:1388-1401.

4. Ahmadzadehfar H. Targeted Therapy for Metastatic Prostate Cancer with Radionuclides. In: Prostate Cancer - Leading-Edge Diagnostic Procedures and Treatments. InTech; 2016.

5. Benešová M, Schäfer M, Bauder-Wüst U, et al. Preclinical Evaluation of a Tailor-Made DOTA-Conjugated PSMA Inhibitor with Optimized Linker Moiety for Imaging and Endoradiotherapy of Prostate Cancer. J Nucl Med. 2015;56:914-20.

6. Ahmadzadehfar H, Wegen S, Yordanova A, et al. Overall survival and response pattern of castration-resistant metastatic prostate cancer to multiple cycles of radioligand therapy using [^{177}Lu]Lu-PSMA-617. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2017;44:1448-1454.

7. Ahmadzadehfar H, Rahbar K, Kürpig S, et al. Early side effects and first results of radioligand therapy with ^{177}Lu-DKFZ-617 PSMA of castrate-resistant metastatic prostate cancer: a two-centre study. EJNMMI Res. 2015;5:114.

8. Pfestroff A, Luster M, Jilg CA, et al. Current status and future perspectives of PSMA-targeted therapy in Europe: opportunity knocks. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2015;42:1971-1975.

9. Fendler WP, Reinhardt S, Ilhan H, et al. Preliminary experience with dosimetry, response and patient reported outcome after ^{177}Lu-PSMA-617 therapy for metastatic castration-resistant prostate cancer. Oncotarget. 2015;8:3581-3590.

10. Yordanova A, Becker A, Eppard E, et al. The impact of repeated cycles of radioligand therapy using [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 on renal function in patients with hormone refractory metastatic prostate cancer. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2017;44:1473-1479.

11. Baum RP, Kulkarni HR, Schuchardt C, et al. Lutetium-177 PSMA Radioligand Therapy of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: Safety and Efficacy. J Nucl Med. 2016;57:jnumed.115.168443-.

12. Kabasakal L, Abuqbeitah M, Aygun A, et al. Pre-therapeutic dosimetry of normal organs and tissues of ^{177}Lu-PSMA-617 prostate-specific membrane antigen (PSMA) inhibitor in patients with castration-resistant prostate cancer. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2015;42:1976-1983.

13. Delker A, Fendler WP, Kratochwil C, et al. Dosimetry for ^{177}Lu-DKFZ-PSMA-617: a new radiopharmaceutical for the treatment of metastatic prostate cancer. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2016;43:42-51.

14. Kulkarni HR, Singh A, Schuchardt C, et al. PSMA-Based Radioligand Therapy for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: The Bad Berka Experience Since 2013. J Nucl Med. 2016;57:97S-104S.

15. Kratochwil C, Giesel FL, Stefanova M, et al. PSMA-targeted radionuclide therapy of metastatic castration-resistant prostate cancer with Lu-177 labeled PSMA-617. J Nucl Med. 2016.

16. Okamoto S, Thieme A, Allmann J, et al. Radiation dosimetry for ^{177}Lu-PSMA I&T in metastatic castration-resistant prostate cancer: Absorbed dose in normal organs and tumor lesions. J Nucl Med. 2016.

17. Afshar-Oromieh A, Hetzheim H, Kratochwil C, et al. The novel theranostic PSMA-ligand PSMA-617 in the diagnosis of prostate cancer by PET/CT: biodistribution in humans, radiation dosimetry and first evaluation of tumor lesions. J Nucl Med. 2015;56:jnumed.115.161299-.

18. Emmett L, Willowson K, Violet J, Shin J, Blanksby A, Lee J. Lutetium-177 PSMA radionuclide therapy for men with prostate cancer: a review of the current literature and discussion of practical aspects of therapy. J Med Radiat Sci. 2017;64:52-60.

19. Umbricht CA, Benešová M, Schmid RM, et al. ^{44}Sc-PSMA-617 for radiotheragnostics in tandem with ^{177}Lu-PSMA-617-preclinical investigations in comparison with ^{68}Ga-PSMA-11 and ^{68}Ga-PSMA-617. EJNMMI Res. 2017;7:9.

20. Eppard E, de la Fuente A, Benešová M, et al. Clinical Translation and First In-Human Use of [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 for PET Imaging of Metastasized Castrate-Resistant Prostate Cancer. Theranostics. 2017;7:4359-4369.

21. Stabin MG. Fundamentals of nuclear medicine dosimetry. Springer; 2008.

22. Hindorf C, Lindén O, Tennvall J, Wingårdh K, Strand SE. Evaluation of methods for red marrow dosimetry based on patients undergoing radioimmunotherapy. Acta Oncol (Madr). 2005;44:579-588.

23. Shen S, DeNardo GL, Sgouros G, O'Donnell RT, DeNardo SJ. Practical determination of patient-specific marrow dose using radioactivity concentration in blood and body. J Nucl Med. 1999;40:2102-2106.

24. Sgouros G, Stabin M, Erdi Y, et al. Red marrow dosimetry for radiolabeled antibodies that bind to marrow, bone, or blood components. Med Phys. 2000;27:2150-2164.

25. Siegel J a. Establishing a clinically meaningful predictive model of hematologic toxicity in nonmyeloablative targeted radiotherapy: practical aspects and limitations of red marrow dosimetry. Cancer Biother Radiopharm. 2005;20:126-40.

26. Khawar A, Eppard E, Sinnes JP, et al. [44Sc]Sc-PSMA-617 biodistribution and dosimetry in patients with metastatic castration-resistant prostate carcinoma.Clin Nucl Med. 2018:1.

6.2 [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 Biodistribution and Dosimetry in Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Carcinoma

Ambreen Khawar, MS,* Elisabeth Eppard, PhD,* Jean Phlippe Sinnes, DiplChem,† Frank Roesch, PhD,† Hojjat Ahmadzadehfar, MD, MSc,* Stefan Kürpig, PhD,* Michael Meisenheimer, MSc,* Florian C. Gaertner, MD,* Markus Essler, MD,* and Ralph A. Bundschuh, MD, PhD*

*Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin, Universitätsklinikum Bonn, Bonn

†Institut für Kernchemie, Universität Mainz, Mainz, Germany

Published in Clinical Nuclear Medizin 2018;43: 323–330

Doi: 10.1097/RLU.0000000000002003

Abstract

Aim: [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 with 3.9 h half-life, *in vitro* and *in vivo* characteristics similar to [^{177}Lu]u-PSMA-617 and possibility of delayed imaging after 24 hour or later implies it to be advantageous than [^{68} Ga]Ga-PSMA-617 for pretherapeutic dosimetric assessment for [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 in mCRPC patients. In this study we investigated biodistribution and radiation exposure to normal organs with [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 in mCRPC patients.

Methods: Five mCRPC patients (mean age 69 years) enrolled for [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 therapy were injected with 40 - 62 MBq [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 i.v., Siemens Biograph 2 PET/CT system was used to acquire dynamic PET data (30 min) in list mode over the abdomen followed by the collection of static PET/CT images (skull to mid-thigh) at 45 min, 2 and about 20 h p.i. Time dependent changes in % activity in source organs (kidneys, bladder, salivary glands, small intestine, liver, spleen and whole body) were determined. Bone marrow and urinary bladder contents residence time were also calculated. Source organs residence time, organ absorbed doses and effective doses were determined using OLINDA/EXM software.

Results: Physiological tracer uptake was seen in kidneys, liver, spleen, small intestine, urinary bladder, salivary glands and in metastases. Kidneys with highest radiation absorbed dose of 3.19E-01 mSv/MBq were the critical organs, followed by urinary bladder wall (2.24E-01 mSv/MBq0, spleen (1.85E-01), salivary glands (1.11E-01) and liver (1.07E-01)mSv/MBq. Red marrow dose was found to be 3.31E-02 mSv/MBq. The mean effective dose of 3.89E-02 mSv/MBq and effective dose of 1.95 mSv was estimated from 50 MBq (treatment planning dose) of [^{44}Sc]Sc-PSMA-617.

Conclusion: [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 is found to be a very promising radiopharmaceutical that can be employed for pre [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 therapeutic dosimetric assessment.

INTRODUCTION

Metastatic castration resistant prostate carcinoma (mCRPC) presents a challenging task in treatment of prostatic carcinoma patients [1-4]. Overall survival in mCRPC patients is reported to be less than 19 months(*5*). With introduction of prostate specific membrane antigen (PSMA) directed imaging and therapeutic ligands paradigm shift in management of mCRPC has been achieved [6]. Several radionuclide labeled PSMA targeting agents against the external and internal domain of PSMA were developed. Enhanced target binding along with shorter circulation time was achieved using small sized ligands directed against external domain of PSMA [7]. Among the small ligands tested were several urea based compounds, the glutamate phosphoramidates and the 2-(phosphinylmethyl) pentanedioic acids [8, 9]. For diagnostic imaging and treatment follow up of mCRPC patients, these PSMA ligands were labeled with SPECT tracers such as [^{111}In]In-PSMA [10], [^{99m}Tc]Tc-MIP-1404 [11], [^{99m}Tc]Tc-MIP-1405 [11], [^{123}I]I-MIP-1072 [12, 13] and [^{123}I]I-MIP-1095 [6, 12] and PET tracers like [^{68}Ga]Ga-PSMA-HBED-CC/ I&T, 11, 617 [6, 14-19], [^{124}I]I-MIP-1095 [13, 20], [^{18}F]F-DCFBC [4] and [^{18}F]F-DCFPyL [22, 23]. Therapeutic success was achieved with β^- emitting [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 [24-26], [^{177}Lu]Lu-PSMA-I&T [27-29], [^{90}Y]Y-PSMA [4] and [^{131}I]I-MIP-1095 [20, 30].

Therapeutic success in terms of objective response with decline in PSA levels to [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 therapy in 70% of mCRPC patients has been described [25, 31]. In another review >50% reduction of serum PSA level in 30%-70% of mCRPC patients along with 10%-32% non- responders to [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 therapy have been reported [30]. To date no substantial reasoning for lack of response in this fraction of mCRPC patients is provided. However, it is proposed that high dose delivery to tumor lesions while maintaining safety and avoiding toxicity could be a potential solution in enhancing response in resistant population, thus emphasizing role of personalized dosimetry in these patients [32].

At present, for treatment with [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 initial administered doses are based on previous experience with PRRT, and escalated according to ongoing individual experience of respective clinicians at various centers.

Emerging concepts of theranostic and personalized medicine in oncology seeks the use of highly sensitive and specific diagnostic PET probes that may later be labeled with therapeutic radionuclide [7]. It is assumed that diagnostic PET agent distribution will predict therapy dose and better therapeutic outcome reliably [7]. (*7*). Several matching pairs of imaging/therapeutic radionuclides have been proposed that are considered reliable markers of bio kinetics and dose determination. Among them high emphasis is being placed on generator produced PET

radiopharmaceuticals such as gallium-68 and scandium-44 for imaging agents partnered with lutetium-177 based therapies and in future with scandium-47 based therapies [33].

Several urea based compounds using DOTA and DOTAGA as chelators were efficiently labeled with imaging and therapeutic radionuclides and are seen as steps towards personalized therapy planning in mCRPC patients. PSMA-617 is one of the urea based PSMA ligands that has shown high tumor binding, high internalization as well as good labeling with both imaging and therapeutic radionuclides. At the moment PSMA-617 labeled with gallium-68 for imaging and lutetium-177 for therapy is being used in several centers across Germany [15, 34]. Owing to the high advocacy for patient specific dosimetry in improving safety and efficacy of [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 therapy, [^{68}Ga]Ga-PSMA-617 PET/CT imaging and low dose [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 SPECT and static imaging have been used for dosimetric analysis [32]. For pre therapeutic dosimetry [^{68}Ga]Ga-PSMA-617 ($t_{1/2}$=1.1 h) as imaging counterpart for [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 ($t_{1/2}$=6.7days) therapy was found deficient due to its limitation to image beyond 4 h and lower organ absorbed dose calculations. Low dose [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 SPECT and planar gamma camera studies has inherent limitations of prolonged hospital stay, multiple time point imaging and data collection which overestimates kidney dose and is deficient to determine lacrimal gland doses. Moreover, it is believed that organ absorbed doses determined by low dose dosimetry are unreliable owing to the fact that high therapeutic doses of [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 may follow altered pharmacokinetics resulting in different organ absorbed doses [5]. Hence, longer lived PET labeled PSMA compounds are seen as an alternative for pretherapeutic dosimetry and better dose planning in mCRPC patients.

Recent labeling of DOTATOC with cyclotron produced scandium-44 with half-life of 3.9 h having better energy and sensitivity, provided prolonged imaging up till 23.5 h [35, 36]. [^{44}Sc]Sc-DOTATOC was found to be safe and superior in detection of metastasis which were not apparent in previous [^{68}Ga]Ga-DOTATOC imaging or concurrent ultrasound or magnetic resonance images in patients of neuroendocrine tumors. The same coordination chemistry shared by scandium-44 with Lutetium -177 is considered the basis for similar *in vivo*/*in vitro* distribution and characteristics. A recent comparison of [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 with [^{68}Ga]Ga-PSMA-617, [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 and {^{68}Ga]Ga-PSMA-11 has also revealed that it shares similar *in vivo* kinetics and *in vitro* characteristics as [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 while gallium-68 labeled agents did show different kinetics and thus proposes [^{44}Sc]Sc-PSMA-617, a better candidate for pre [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 therapy dosimetric assessment in mCRPC patients [37]. In addition to cyclotron production scandium-44 can be produced from a ^{44}Ti/^{44}Sc generator, though in lesser activities as compared to cyclotron. Long half-life($t_{1/2}$) of scandium-44 gives added advantages of its possible transport to distant places from site of production [36], feasible delayed imaging with [^{44}Sc]ScPSMA-617 and sentinel node imaging prior to

surgery for primary prostate carcinoma . However presence of high energy gamma rays (>909 KeV) is considered a drawback.

Considering all potential benefits specially the pre therapeutic dosimetric analysis for [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 this study aims to determine bio distribution and normal organ absorbed doses for [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 in mCRPC patients and to explore its use as surrogate marker for pre [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 therapy dosimetric evaluation.

Materials and Methods

All procedures followed were in accordance with the ethical standards of institutional review board and all patients gave written informed consent.

Patient Population:

Between April 2016 to June 2017 five men_with progressive mCRPC and mean age of 69±2.2 years were enrolled for [^{44}Sc]Sc-PSMA 617 imaging (Table 1). The injected doses of [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 ranged from 40-62 MBq [1.08 -1.68 mCi] (mean ± SD: 50.16 ± 8.04 MBq). All patients except patient no 4, had received cycles of [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 in addition to conventional therapies.

TABLE 1. Subject Details, Injected Radioactivity of [^{44}Sc]Sc-PSMA, and Therapies Received

Patient No.	Age (yr)	Weight (kg)	Hct*	Injected Activity (MBq)	Injected Activity (MBq/kg)	PSA (ng/mL)	Therapies Received	
1	70	78	0.33	50.00	0.64	453.00	^{177}Lu PSMA (3),	Radio/chemo and antihormone therapy
2	72	80	0.30	62.23	0.78	26.00	^{177}Lu PSMA (1),	Antihormone
3	67	70	0.39	39.61	0.57	7.20	^{177}Lu PSMA (2),	Radio/antihormonal and bisphosphonate therapy
4	70	80	0.30	50.00	0.63	139.00	—	Radiotherapy
5	67	104	029	48.95	047	3000.00	^{177}Lu PSMA (1)	Radio/hormonal/chemo
Mean	69	82.4	0.32	50.16	0.62			
SD	2.2	12.76	0.04	8.04	0.11			

*Hematocrit.

Preparation of [^{44}Sc]Sc-PSMA-617:

3 ml of scandium-44 obtained after post processing according to literature of eluted ^{44}Sc from prototype 185 MBq (5 mCi) ^{44}Ti/^{44}Sc generator (Mainz) was used to label GMP-grade PSMA-617 obtained from ABX (Radeberg, Germany). Quality control for radiochemical yield & purity was checked using TLC with 0.1M sodium citrate; ITLC with1:1 v/v 1 M ammonium acetate/methanol and HPLC with Nucleodur 100-3 C18 ec 125/4; Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Germany. A radiochemical yield of 98% and radiochemical purity of 99% was obtained [38].

[^{44}Sc]Sc-PSMA-617 PET/CT Imaging Protocol:

Siemens Biograph 2 PET/CT scanner with a 58.5 cm axial field of view and a 16.2 cm longitudinal field of view was used for acquiring [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 PET/CT imaging over a period of 2 days. The scanner has a spatial resolution of about 6 mm in axial and transversal direction (at a radius of 10 mm). All patients underwent a low dose CT scan of abdomen for attenuation correction and patient positioning with kidneys in field of view, followed by dynamic imaging of abdomen for 30 minutes in list mode started simultaneously with i.v injection of [^{44}Sc]Sc-PSMA-617. Later static skull to mid-thigh PET/CT images were acquired at 45 min, 2 and 19.5 h post injection (p.i), each preceded by low dose CT examination for patient positioning and attenuation correction. For qualitative and quantitative analysis dynamic images were reconstructed into 6 images of 300s each using iterative reconstruction OSEM.

Qualitative: Analysis

All dynamic and static images were visually analyzed to see physiological and pathological tracer distribution as shown in figure 1 & 2. Organs with increased tracer uptake were identified as source organs for further dosimetric analysis.

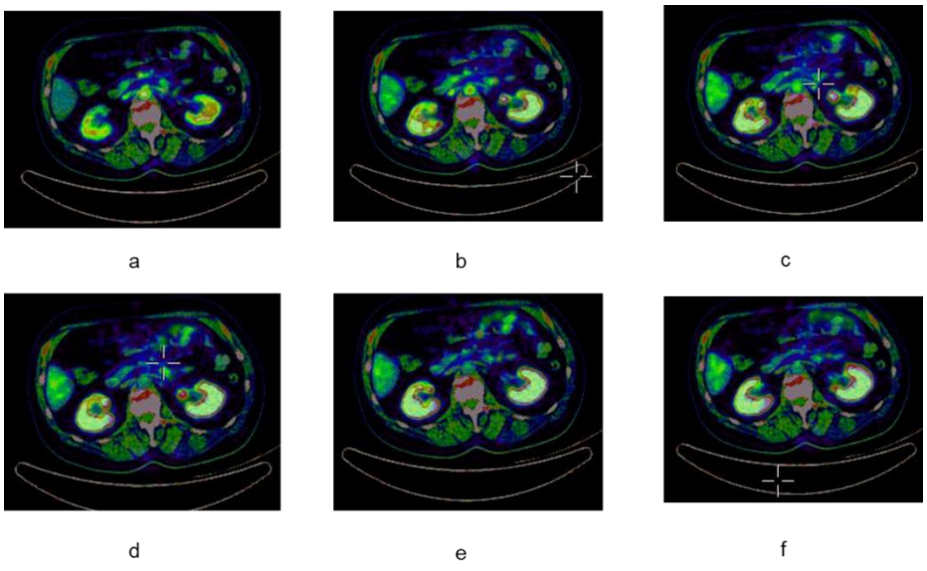


Figure 1: Physiological tracer distribution at (a) 150s, (b) 450s, (c) 750s, (d) 1050s, (e) 1350s and (f) 1650s

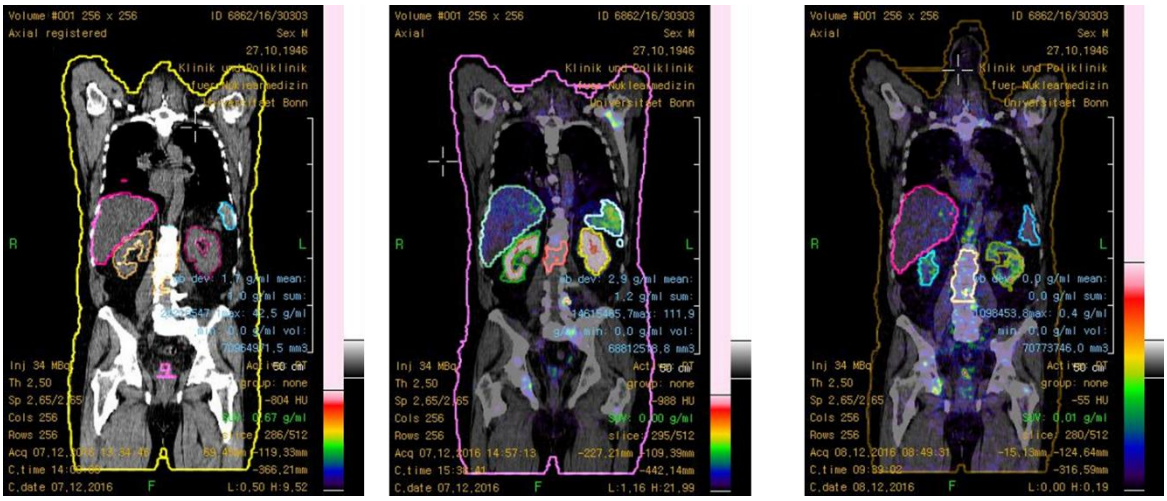


Figure 2: VOI drawn in (a) CT image at 45 min, (b) PET/CT images at 2 h and (c) at 19.5h

Quantitative Dosimetric Analysis:

For dosimetric analysis kidneys, liver, spleen, urinary bladder, small intestine, salivary glands and whole body were selected as source organs. MEDISO interview fusion software (MEDISO Medical Imaging Systems, Budapest, Hungary)was used to draw volume of interest (VOI) encompassing each source organ on CT image for calculating source organ volume and to determine mean counts per ml (KBq/ml) from PET image as shown in figure 2. Total source organ activity was calculated by multiplying each source organ volume with corresponding mean counts/ml. Total source organ activity was converted into MBq/ml. OLINDA/EXM software (Hermes, Germany) requires % source organ activities with respect to time for curve fitting and residence time calculation. Hence, % source organ activity for each source organ was calculated by dividing total source organ activity by injected activity and multiplying it with 100.

Assuming homogenous distribution of tracer in remainder of body, % of injected dose in image was scaled proportional to % weight of body in image for % whole body activity calculation.

$$\%\ Body\ weight(image) = \frac{CT\ volume\ of\ whole\ bodyimage \times mean\ CT\ density \times 100}{Patient\ weight}$$

Percent source organ activity were used to generate time activity curves and residence time calculations using OLINDA/EXM software (Hermes, Germany). Mono exponential curve fitting for whole body and bi exponential curve fitting for rest of source organs was applied. For remainder of body residence time, residence time of all source organs except urinary bladder contents was subtracted from whole body residence times [39].

Indirect blood based method with patient based RMBLR and red marrow mass was used to calculate bone marrow self-dose [40-43]. 1-2ml venous blood samples were collected at varying time

points i.e., (5, 10. 15, 20, 25, 30, 45) min, 2 and 19.5 h post injection. To calculate residence time for urinary bladder contents, trapezoidal method was used taking into account urinary bladder activity in images at 45 min, 2 and 19.5 h along with activity in urinary samples. Urine samples were collected in pre weighed containers after 45 min and 2 h static PET/CT imaging. Radioactivity in 1ml blood and urine samples was measured along with known standard activity using 1480 WIZARD^{TM} 3n Gamma counter.

OLINDA/EXM software (Hermes, Germany) was used to calculate mean organ absorbed doses and effective doses (ICRP103 factors) by adjusting for patient's body weight. It was done by multiplying the reference adult male body weight with fraction determined from dividing the patient weight with reference adult weight. The mean of residence times, organ absorbed doses (mSv/MBq) and effective doses (mSv/MBq) were calculated. The total effective dose in mSv received after injection of 62 MBq (highest dose injected) and 50 MBq (usual dose injected) of [^{44}Sc] Sc-PSMA-617 was calculated by multiplying the mean effective dose (mSv/MBq) with 62 and 50 MBq respectively.

RESULTS

Qualitative [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 Distribution and Kinetics:

The whole body PET/CT images at 45 m, 2 & 19.5 h revealed normal physiological uptake of [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 in kidneys, liver, spleen, salivary glands, small intestine and urinary bladder. Very faint uptake was also noticed in lacrimal glands with faint to absent uptake in nasal or oral mucosa. Rapid tracer kinetics were seen with peak uptake achieved in organs within an hour as shown in figure 3. Rapid blood clearance and excretion from kidneys created better tumor to soft tissue contrast. Liver exhibited the highest percent activity followed by kidneys, spleen, salivary glands and small intestine. Rapid fall in activity in liver and other source organs was observed. The decrement in kidneys, small intestine and salivary glands was gradual with exception of increase in activity at 2 h in salivary glands and small intestine in only one patient. Pathological uptake was also observed in metastatic bone and soft tissue.

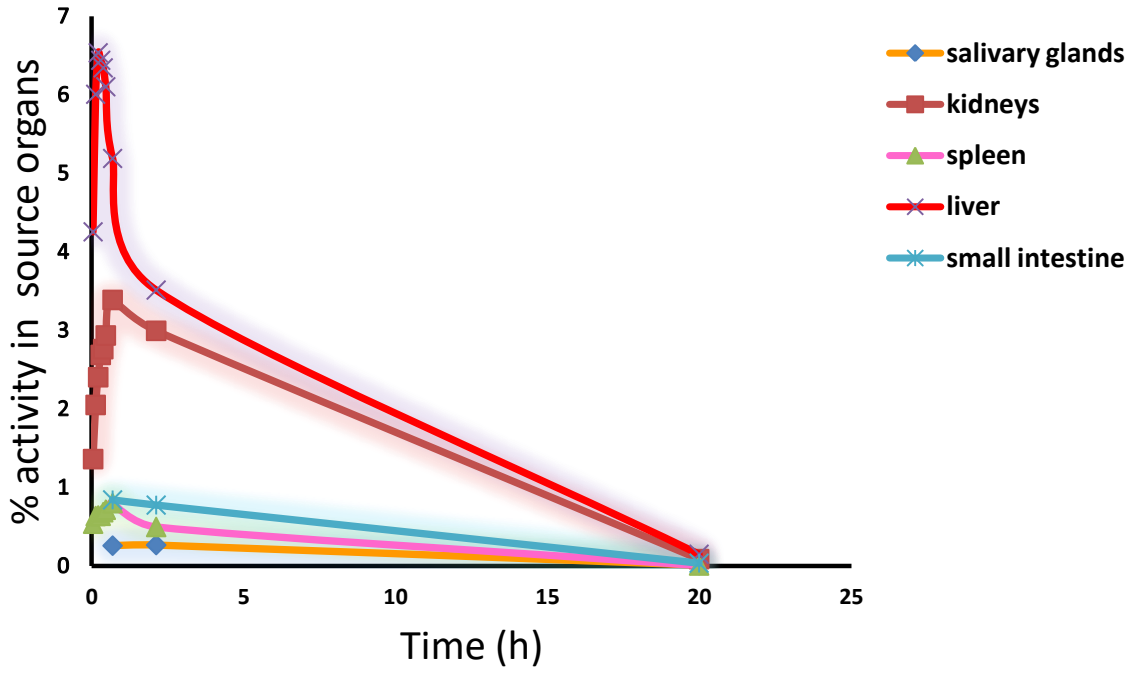


Figure 3: Time dependent changes of % injected activity in source organs

Dosimetry for Normal Organs:

Estimated residence times(MBq-hr/MBq) were found to be prolonged in liver followed by kidneys, urinary bladder, bone marrow and rest of organs as shown in table 2. Table 3 shows the individual patient, mean ± SD organ of absorbed doses and effective doses as calculated by OLINDA/EXM software. The results showed that kidneys r1eceived the highest mean absorbed dose of 3.19 E-01 mSv/MBq (range: 1.78 E-01 to 4.88 E-01 mSv/MBq) making it the critical organ followed by urinary bladder wall, spleen, salivary glands, liver and small intestine. Highest dose to kidneys were associated with the fact that they are the main route of excretion for PSMA-617. Bone marrow dose was found to be low and presented as organs with low toxicity risk while considering therapeutic application.

TABLE 2. Comparison of Individual and Mean Residence Times (MBq-h/MBq) for [^{44}Sc]Sc and [^{68}Ga]Ga-PSMA-617

	[^{44}Sc]Sc-PSMA-617							
Patient No.	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**Mean**	**±SD**	**[^{68}Ga]Ga-PSMA-617[44]**
Organs								
Salivary glands	0.02	0.01	0.01	0.03	0.07	0.03	±0.027	
Kidneys	0.22	0.36	0.12	0.34	0.15	0.24	±0.109	0.132
Liver	0.25	0.78	0.07	0.29	0.37	0.35	±0.263	0.093
Spleen	0.08	0.09	0.02	0.05	0.09	0.07	±0.031	0.009
Small intestine	0.02	0.04	0.02	0.07	0.08	0.05	±0.029	
Bone marrow	0.06	0.10	0.05	0.09	0.17	0.09	±0.047	
Urinary bladder contents	0.08	0.14	0.12	0.53	0.05	0.18	±0.195	0.07
Remainder of body	2.93	1.11	1.45	1.86	1.76	1.82	±0.684	1.25

TABLE 3. Individual and Mean Organ-Absorbed Doses With [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 (mSv/MBq)

	Organ-Absorbed Doses (mSv/MBq)						
	Patient 1	**Patient 2**	**Patient 3**	**Patient 4**	**Patient 5**	**Mean**	**±SD**
Organs							
Adrenals	7.91E-02	1.12E-01	4.21E-02	9.19E-02	5.58E-02	7.62E-02	±2.79E-02
Brain	2.67E-02	1.10E-02	1.51E-02	1.80E-02	1.53E-02	1.72E-02	±5.86E-03
Esophagus	3.48E-02	2.67E-02	1.85E-02	2.66E-02	2.17E-02	2.57E-02	±6.17E-03
Eyes	2.65E-02	1.10E-02	1.50E-02	1.78E-02	1.46E-02	1.70E-02	±5.84E-03
Gall bladder wall	5.06E-02	7.29E-02	2.42E-02	4.70E-02	3.97E-02	4.69E-02	±1.77E-02
Left colon	4.16E-02	3.02E-02	2.34E-02	3.74E-02	2.68E-02	3.19E-02	±7.51E-03
Small intestine	5.06E-02	4.69E-02	3.20E-02	7.87E-02	6.69E-02	5.50E-02	±1.81E-02
Stomach wall	4.03E-02	3.09E-02	2.09E-02	3.11E-02	2.53E-02	2.97E-02	±7.29E-03
Right colon	4.05E-02	3.31E-02	2.52E-02	3.56E-02	2.58E-02	3.20E-02	±6.54E-03
Rectum	3.84E-02	2.33E-02	2.55E-02	4.79E-02	2.19E-02	3.14E-02	±1.13E-02
Heart wall	3.70E-02	2.90E-02	1.96E-02	2.81E-02	2.31E-02	2.74E-02	±6.61E-03
Kidneys	2.93E-01	4.88E-01	1.80E-01	4.56E-01	1.78E-01	3.19E-01	±1.48E-01
Liver	8.52E-02	2.29E-01	2.95E-02	9.67E-02	9.47E-02	1.07E-01	±7.35E-02
Lungs	3.28E-02	2.43E-02	1.76E-02	2.45E-02	2.01E-02	2.39E-02	±5.78E-03
Pancreas	4.31E-02	3.71E-02	2.30E-02	3.68E-02	2.90E-02	3.38E-02	±7.84E-03
Prostate	3.97E-02	2.60E-02	2.77E-02	5.71E-02	2.14E-02	3.44E-02	±1.44E-02
Salivary glands	9.67E-02	3.54E-02	5.23E-02	1.16E-01	2.53E-01	1.11E-01	±8.60E-02
Red marrow	3.64E-02	3.27E-02	2.47E-02	3.72E-02	3.43E-02	3.31E-02	±5.00E-03
Osteogenic cells	3.04E-02	2.30E-02	1.93E-02	2.78E-02	2.58E-02	2.53E-02	±4.30E-03
Spleen	2.35E-01	2.48E-01	6.38E-02	1.63E-01	2.16E-01	1.85E-01	±7.52E-02
Testes	2.99E-02	1.38E-02	1.82E-02	2.66E-02	1.52E-02	2.07E-02	±7.13E-03
Thymus	3.19E-02	1.79E-02	1.76E-02	2.23E-02	1.79E-02	2.15E-02	±6.12E-03
Thyroid	3.10E-02	1.47E-02	1.73E-02	2.11E-02	1.71E-02	2.02E-02	±6.44E-03
Urinary bladder wall	1.21E-01	1.72E-01	1.55E-01	6.05E-01	6.84E-02	2.24E-01	±2.16E-01
Whole body	3.36E-02	2.25E-02	1.92E-02	2.84E-01	2.03E-02	7.59E-02	±1.16E-01
Mean effective dose				0.0389 mSv/MBq			
Effective dose from 50 MBq				1.94 mSv			
Effective dose from 62 MBq				2.41 mSv			

DISCUSSION

PSMA-617 a modified version of PSMA-11 that binds to the external domain of PSMA. Comparative bio distribution studies with PSMA-11 has revealed supremacy of PSMA-617 due to high target binding and subsequent efficient internalization with in prostate carcinoma cells [44]. It has been labeled with gallium-68, lutetium-177, indium-111 and yttrium-90. [^{68}Ga]Ga-PSMA-617 has been in use in many nuclear medicine centres as a counterpart to pre and post [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 therapy for disease monitoring [44, 45]. Recently PSMA-617 has been labeled with long lived PET agents like scandium-44 using DOTA as a linking chelator. Preclinical (*in vitro, in vivo)* and clinical studies with scandium-44 labeled peptides and PSMA ligand for neuroendocrine tumors [35] and prostate carcinoma [37] respectively have proposed scandium-44 a better surrogate marker for lutetium-177 based therapies and probable better candidate for pretherapeutic dosimetric analysis.

In this study we found the physiological uptake of [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 in liver, kidneys, salivary glands, spleen, small intestine, urinary bladder consistent with low level uptake in normal organs of PSMA described in literature [15, 44]. Pathological uptake was seen in both skeletal and soft metastatic tissue. Kidneys were the major route of excretion with rapid peak uptake seen at 45 min

and fast clearance showing minimal activity at 18 h concurrent with early uptake and fast clearance characteristic of PSMA-617. Probable toxicity of salivary glands proposed by A Afshar- Oromieh et al due to late trapping of [^{68}Ga]Ga-PSMA-617 in salivary glands [44] was not observed in this study. Increase in activity in 2 h image was observed in only one of the patients which later decreased to minimal activity at 19.5 h while rest of the patients showed peak uptake at 45 min followed by gradual decrease. The low probability of salivary gland toxicity depicted by kinetics of [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 is consistent with dosimetry results of [^{68}Ga]Ga-PSMA-617 [44]. Occurrence of transient xerostomia or mild reversible xerostomia with [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 as well as other lutetium-177 labeled PSMA therapies [34, 46-48] also supports that salivary glands toxicity should be of less concern in these patients. Lacrimal glands showed faint uptake with no enhanced accumulation in later images, therefore we considered its activity with in remainder of body activity. Faint to negligible uptake in nasal mucosa was seen with [^{44}Sc]Sc-PSMA-617. The rapid initial uptake in liver and spleen followed by fast clearance as result of blood pool effect and its clearance from these organs is consistent with literature [44].

Quantitative analysis revealed high total activity and prolonged residence time in liver followed by kidneys, spleen and other organs consistent with results of [^{68}Ga]Ga-PSMA-617. Residence time of source organs with [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 were found to be higher than [^{68}Ga]Ga-PSMA-617 [44]. Long half-life of 3.927 h and ability to follow bio kinetics up to 19.5 h or more with [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 account for the higher residence times as compared to [^{68}Ga]Ga-PSMA-617. The organ absorbed doses were highest in kidneys followed by urinary bladder wall, spleen, salivary glands, liver and small intestine. Kidneys with mean dose of 3.19E-01 mSv/MBq (range:1.78E-01-4.88E-01 mSv/MBq) were the organs at risk as is with the rest of small ligands based PSMA agents [44, 49]. Urinary bladder wall with mean dose of 2.24E-01 mSv/MBq was the second highest organ to receive dose owing to the kidneys being its physiological route of excretion. Salivary glands received a dose of 1.11E-01mSv/MBq which was higher than [^{68}Ga]Ga-PSMA-I&T but was not reported with [^{68}Ga]Ga-PSMA-617 besides showing a rise in mean SUV at later time points [44]. Bone marrow dose was found to be low consistent with previous dosimetric studies with gallium-68 labeled agents. Mean organ absorbed dose for bone marrow was found to be 3.31 E-02 mSv/MBq and ranged from 2.47 E-02 to 3.72 E-02. Low marrow dose suggests low risk of marrow toxicity with PSMA based therapies. However, the marrow toxicity can vary with burden of bone and marrow metastases in the patient as was found to be highest in patient no 1 with high tumor burden. Further, our results are concurrent with that of [^{68}Ga]Ga-PSMA-617 ,[^{68}Ga]Ga-PSMA-11 and [^{68}Ga]Ga-PSMA-HBED-CC with reference to high to low dose received by organs as shown in figure 4. However absorbed doses were found to be higher for [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 than [^{68}Ga]Ga-PSMA-617, [^{68}Ga]Ga-PSMA-11, [^{68}Ga]Ga-PSMA-I&T as shown in figure 4 but less than [^{124}I]I-PSMA [49].

Comparison of organ absorbed doses of [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 with pre and post therapeutic dosimetric results of [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 given in table 4 [50-52] and comparison of doses with other gallium labeled PSMA agents as shown in figure 4 also show that it is able to predict doses better than [^{68}Ga]Ga-PSMA-617. However interpatient dosimetric comparison studies of [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 with [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 are warranted.

TABLE 4. Comparison of Organ-Absorbed Doses of [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 With [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 in mSv/MBq and [^{68}Ga]Ga-PSMA-617[44,50–52]

	[^{44}Sc]Sc-PSMA-617	[^{68}Ga]Ga-PSMA-617	Pre[^{177}Lu]Lu-PSMA-617 Therapy	Post[^{177}Lu]Lu-PSMA Therapy	
	Current Study	Afshar-Oromieh et al[44]	Kabasakal et al[50]	Delker et al[52]	Okamoto et al[51]
Kidneys	0.32	0.21	0.88	0.6	0.72
Spleen	0.19	0.029		0.1	
Liver	0.11	0.029	0.28	0.1	0.12
Whole body	0.08	0.013	0.061		0.06
Red marrow	0.03	0.01	0.034	0.012	
Parotid gland			1.17		0.55
Submandibular					0.64
Lacrimal gland					3.8
Salivary glands	0.11			1.41	

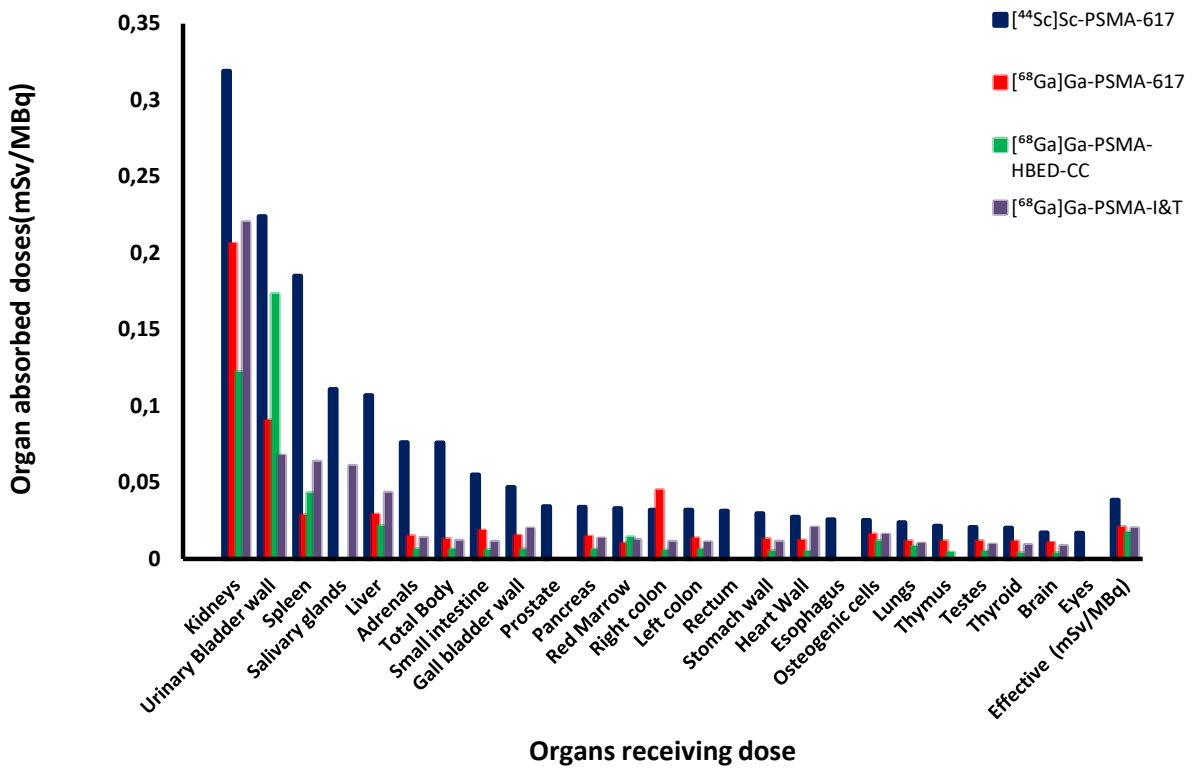


Figure 4: Comparison of Organ Absorbed Doses and effective dose (mSv/MBq) between [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 and other [^{68}Ga]Ga-PSMA agents [44, 49]

The mean effective dose of 3.98E-02 was found to be higher than [^{68}Ga]Ga-PSMA-617, [^{68}Ga]Ga-PSMA-11, [^{68}Ga]Ga-PSMA-I&T but less than [^{124}I]I-PSMA [49]. The total effective dose with usual dose administered (50MBq) of [^{44S}Sc]Sc-PSMA-617 was found to be 1.95mSv which was low as compared to rest of gallium-68 labeled PSMA agents as well [^{124}I]I-PSMA. Hence [^{44S}Sc]Sc-PSMA-617 having possibility of delayed imaging, higher organ absorbed doses and effective doses less than other PSMA labeled imaging agents and a similar bio distribution to already known ^{68}Ga-PSMA ligands could be a better and safe agent for prediction of therapeutic dosimetry for [^{177}Lu]Lu-PSMA-617. The biodistribution and dosimetric analysis in this study has proved that early uptake kinetics reaching peak followed by clearance of PSMA-617 from source organs up to 19.5 h can easily be interpreted. A comparison of [^{44S}Sc]Sc-PSMA-617 kinetics of our study with kinetics of [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 shown by Delker et al [52] as well as *in vivo* kinetics of [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 in pre-clinical small animal studies followed for 24 h [53] has shown comparable bio distribution with peak uptake as early as 1 h followed by gradual clearance till 24 h. Hence, suggesting sound reasons for use of this agent in personalized therapy planning. Further studies for interpreting normal organ absorbed doses for [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 considering bio kinetic data of [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 need to be carried out.

Dosimetric analysis in this study supports that probable organ absorbed doses for therapeutic dose of [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 can be determined while using this simple, better and optimized dosimetric study protocol for [^{44S}Sc]Sc-PSMA-617. The protocol can be completed within 24 hours and most important of all can be incorporated in daily clinical routine. It is important to mention that individual pretherapeutic dosimetric analysis with [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 is not necessary for all patients, but for patients not responding to standard doses or having a high cumulative dose or having reduced renal function in the lab.

CONCUSION

[^{44}Sc]Sc-PSMA-617 with similar *in vivo* and *in vitro* characteristics to [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 and low effective dose as compared to other known imaging agents for mCRPC seems to be a promising new agent for pre therapeutic dosimetric analysis for [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 and therefore for a more individualized tumor therapy. However further studies are warranted, especially to show the benefit for the individual patients.

REFERENCES

1. Karantanos T, Corn PG, Thompson TC. Prostate cancer progression after androgen deprivation therapy: mechanisms of castrate resistance and novel therapeutic approaches. Oncogene. 2013;32:5501-5511.

2. Hotte SJ, Saad F. Current management of castrate-resistant prostate cancer. Curr Oncol. 2010;17:S72-S79.

3. Maluf FC, Smaletz O, Herchenhorn D. Castration-resistant prostate cancer: systemic therapy in 2012. Clin (São Paulo, Brazil). 2012;67:389-394.

4. Chatalic KLS, Heskamp S, Konijnenberg M, et al. Towards personalized treatment of prostate cancer: PSMA I&T, a promising prostate-specific membrane antigen-targeted theranostic agent. Theranostics. 2016;6:849-861.

5. Pfestroff A, Luster M, Jilg CA, et al. Current status and future perspectives of PSMA-targeted therapy in Europe: opportunity knocks. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2015;42:1971-1975.

6. Afshar-Oromieh A, Babich JW, Kratochwil C, et al. The Rise of PSMA Ligands for Diagnosis and Therapy of Prostate Cancer. J Nucl Med. 2016;57:79S-89S.

7. Kulkarni HR, Singh A, Schuchardt C, et al. PSMA-Based Radioligand Therapy for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: The Bad Berka Experience Since 2013. J Nucl Med. 2016;57:97S-104S.

8. Lütje S, Heskamp S, Cornelissen AS, et al. PSMA ligands for radionuclide imaging and therapy of prostate cancer: Clinical status. Theranostics. 2015;5:1388-1401.

9. Mease RC, Foss CA, Pomper MG. PET imaging in prostate cancer: focus on prostate-specific membrane antigen. Curr Top Med Chem. 2013;13:951-962.

10. Mottaghy FM, Behrendt FF, Verburg FA. ^{68}Ga-PSMA-HBED-CC PET/CT: where molecular imaging has an edge over morphological imaging. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2016;43:394-396.

11. Vallabhajosula S, Nikolopoulou A, Babich JW, et al. ^{99m}Tc-Labeled Small-Molecule Inhibitors of Prostate-Specific Membrane Antigen: Pharmacokinetics and Biodistribution Studies in Healthy Subjects and Patients with Metastatic Prostate Cancer. J Nucl Med. 2014;55:1791-1798.

12. Kulkarni HR, Baum R, Weineisen M, et al. Therapy of Metastasized Castrate-Resistant Prostate Cancer Using Lu-177 Labeled DOTAGA-PSMA Small Molecules: First Clinical Results in a Larger Patient Cohort. J Nucl Med. 2015;56:1169-1176.

13. Zechmann CM, Afshar-Oromieh A, Armor T, et al. Radiation dosimetry and first therapy results with a $^{124}I/^{131}I$-labeled small molecule (MIP-1095) targeting PSMA for prostate cancer therapy. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2014;41:1280-1292.

14. Sachpekidis C, Eder M, Kopka K, et al. ^{68}Ga-PSMA-11 dynamic PET/CT imaging in biochemical relapse of prostate cancer. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2016;43:1288-1299.

15. Afshar-Oromieh A, Malcher A, Eder M, et al. PET imaging with a [^{68}Ga]gallium-labelled PSMA ligand for the diagnosis of prostate cancer: biodistribution in humans and first evaluation of tumour lesions. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2013;40:486-495.

16. Weineisen M, Simecek J, Schottelius M, et al. Synthesis and preclinical evaluation of DOTAGA-conjugated PSMA ligands for functional imaging and endoradiotherapy of prostate cancer. EJNMMI Res. 2014;4:63.

17. Barrio M, Fendler WP, Czernin J, et al. Prostate specific membrane antigen (PSMA) ligands for diagnosis and therapy of prostate cancer. Expert Rev Mol Diagn. 2016;16:1177-1188.

18. Haberkorn U. PSMA ligands for diagnosis and therapy of prostate cancer. Cancer Imaging. 2014;14:O10-O10

19. Afshar-Oromieh A, Hetzheim H, Kubler W, et al. Radiation dosimetry of Ga-PSMA-11 (HBED-CC) and preliminary evaluation of optimal imaging timing. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2016;43:1611-1620.

20. Banerjee SR, Foss CA, Pullambhatla M, et al. Preclinical Evaluation of Y-86-Labeled Inhibitors of Prostate Specific Membrane Antigen for Dosimetry Estimates. J Nucl Med. 2015;56:628-634.

21. Kuo H-T, Pan J, Lin K-S, et al. Synthesis and Evaluation of ^{18}F-AmBF3-PSMA Derivatives as PET Imaging Agents for Prostate Cancer. J Nucl Med . 2016;57:1155-1155

22. Chen Y, Pullambhatla M, Foss CA, et al. 2-(3-{1-carboxy-5-[(6-[^{18}F]fluoro-pyridine-3-carbonyl)-amino]- pentyl}-ureido)-pentanedioic acid, [^{18}F]DCFPyL, a PSMA-based PET imaging agent for prostate cancer. Clin Cancer Res. 2011;17:7645-7653.

23. Szabo Z, Mena E, Rowe SP, et al. Initial Evaluation of [^{18}F]DCFPyL for Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA)-Targeted PET Imaging of Prostate Cancer. Mol Imaging Biol. 2015;17:565-574.

24. Ahmadzadehfar H, Wegen S, Yordanova A, et al. Overall survival and response pattern of castration-resistant metastatic prostate cancer to multiple cycles of radioligand therapy using [^{177}Lu]Lu-PSMA-617. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2017;44:1448-1454.

25. Ahmadzadehfar H, Rahbar K, Kürpig S, et al. Early side effects and first results of radioligand therapy with ^{177}Lu-DKFZ-617 PSMA of castrate-resistant metastatic prostate cancer: a two-centre study. EJNMMI Res. 2015;5:114.

26. Yordanova A, Becker A, Eppard E, et al. The impact of repeated cycles of radioligand therapy using [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 on renal function in patients with hormone refractory metastatic prostate cancer. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2017;44:1473-1479.

27. Pillai MRA, Nanabala R, Joy A, et al. Radiolabeled enzyme inhibitors and binding agents targeting PSMA: Effective theranostic tools for imaging and therapy of prostate cancer. Nucl Med Biol. 2016;43:692-720.

28. Herrmann K, Bluemel C, Weineisen M, et al. Biodistribution and Radiation Dosimetry for a Probe Targeting Prostate-Specific Membrane Antigen for Imaging and Therapy. J Nucl Med. 2015;56:855-861.

29. Das T, Guleria M, Parab A, et al. Clinical translation of ^{177}Lu-labeled PSMA-617: Initial experience in prostate cancer patients. Nucl Med Biol. 2016;43:296-302.

30. Med P, Clin R, Author NA, et al. HHS Public Access. 2015;25:1-30.

31. Gaertner FC, Halabi K, Ahmadzadehfar H, et al. Uptake of PSMA-ligands in normal tissues is dependent on tumor load in patients with prostate cancer. Oncotarget. 2017;8:55094-55103.

32. Emmett L, Willowson K, Violet J, et al. Lutetium 177 PSMA radionuclide therapy for men with prostate cancer: a review of the current literature and discussion of practical aspects of therapy. J Med Radiat Sci. 2017;64:52-60.

33. Roesch F. Scandium-44: Benefits of a Long-Lived PET Radionuclide Available from the ^{44}Ti/^{44}Sc Generator System. Curr Radiopharm. 2012;5:187-201.

34. Rahbar K, Ahmadzadehfar H, Kratochwil C, et al. German multicenter study investigating ^{177}Lu-PSMA-617 radioligand therapy in advanced prostate cancer patients. J Nucl Med. 2017;58:85-90.

35. Singh A, van der Meulen NP, Müller C, et al. First-in-Human PET/CT Imaging of Metastatic Neuroendocrine Neoplasms with Cyclotron-Produced ^{44}Sc-DOTATOC: A Proof-of-Concept Study. Cancer Biother Radiopharm. 2017;32:124-132.

36. Pruszyński M, Majkowska-Pilip A, Loktionova N, et al. Radiolabeling of DOTATOC with the long-lived positron emitter ^{44}Sc. Appl Radiat Isot. 2012;70:974-979.

37. Umbricht CA, Benešová M, Schmid RM, et al. ^{44}Sc-PSMA-617 for radiotheragnostics in tandem with ^{177}Lu-PSMA-617—preclinical investigations in comparison with ^{68}Ga-PSMA-11 and ^{68}Ga-PSMA-617. EJNMMI Res. 2017;7:9.

38. Eppard E, de la Fuente A, Benešová M, et al. Clinical Translation and First In-Human Use of [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 for PET Imaging of Metastasized Castrate-Resistant Prostate Cancer. Theranostics. 2017;7:4359-4369.

39. Stabin MG. Fundamentals of nuclear medicine dosimetry. New York: Springer; 2008: 119-170.

40. Hindorf C, Lindén O, Tennvall J, et al. Evaluation of methods for red marrow dosimetry based on patients undergoing radioimmunotherapy. Acta Oncol (Madr). 2005;44:579-588.

41. Sgouros G, Stabin M, Erdi Y, et al. Red marrow dosimetry for radiolabeled antibodies that bind to marrow, bone, or blood components. Med Phys. 2000;27:2150-2164.

42. Siegel JA. Establishing a Clinically Meaningful Predictive Model of Hematologic Toxicity in Nonmyeloablative Targeted Radiotherapy: Practical Aspects and Limitations of Red Marrow Dosimetry. CANCER Biother Radiopharm. 2005;20:126-140.

43. Shen S, DeNardo GL, Sgouros G, O'Donnell RT, et al. Practical determination of patient-specific marrow dose using radioactivity concentration in blood and body. J Nucl Med. 1999;40:2102-2106.

44. Afshar-Oromieh A, Kratochwil C, Benesova M, et al. The Theranostic PSMA ligand PSMA-617 in the diagnosis of prostate cancer: Biodistribution in humans and first evaluation of tumor lesions. J Nucl Med. 2015;56:1697-1705.

45. Baum RP, Kulkarni HR. 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.

46. Rahbar K, Schmidt M, Heinzel A, et al. Response and tolerability of a single dose of ^{177}Lu-PSMA-617 in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer: a multicenter retrospective analysis. J Nucl Med. 2016;57:1334-1339.

47. Baum RP, Kulkarni HR, Schuchardt C, et al. Lutetium-177 PSMA Radioligand Therapy of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: Safety and Efficacy. J Nucl Med. 2016;57:1006-1013.

48. Ahmadzadehfar H, Eppard E, Kürpig S, et al. Therapeutic response and side effects of repeated radioligand therapy with ^{177}Lu-PSMA-DKFZ-617 of castrate-resistant metastatic prostate cancer. 2016;7:12477-12488.

49. Pfob CH, Ziegler S, Graner FP, et al. Biodistribution and radiation dosimetry of ^{68}Ga-PSMA HBED CC a PSMA specific probe for PET imaging of prostate cancer. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2016;43:1962-1970.

50. Kabasakal L, AbuQbeitah M, Aygün A, et al. Pre-therapeutic dosimetry of normal organs and tissues of ^{177}Lu-PSMA-617 prostate-specific membrane antigen (PSMA) inhibitor in patients with castration-resistant prostate cancer. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2015;42:1976-1983.

51. Okamoto S, Thieme A, Allmann J, et al. Radiation dosimetry for ^{177}Lu-PSMA-I&T in metastatic castration-resistant prostate cancer: Absorbed dose in normal organs and tumor lesions. J Nucl Med. 2017;58:445-450.

52. Delker A, Fendler WP, Kratochwil C, et al. Dosimetry for ^{177}Lu-DKFZ-PSMA-617: a new radiopharmaceutical for the treatment of metastatic prostate cancer. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2016;43:42-51.

53. Bene ova M, Schafer M, Bauder-Wust U, et al. Preclinical Evaluation of a Tailor-Made DOTA-Conjugated PSMA Inhibitor with Optimized Linker Moiety for Imaging and Endoradiotherapy of Prostate Cancer. J Nucl Med. 2015;56:914-920.

6.3 Regeneration des ^{44}Ti/^{44}Sc-Generators

Im Jahr 2007 wurden in der Arbeitsgruppe Rösch 185 MBq ^{44}Ti aus einem massiven 1,5 g ^{nat}Sc-Target isoliert und nach Aufreinigung auf eine mit AG 1-X8 gefüllt Säule (H = 150 mm, D = 3mm, V_0 = 0,55 ml) aufgebracht [1]. Durch Elution mit 20 ml mit 0,07 M Salzsäure/0,005 M Oxalsäure konnten 180 MBq ^{44}Sc mit nur 90 Bq ^{44}Ti-Durchbruch in 20 ml Eluat erhalten werden. Dies konnte mit optimierten Bedingungen durch eine Elution mit 0,07 M Salzsäure/0,005 M Oxalsäure erreicht werden. Da 20 ml eine deutlich zu niedrige Volumenaktivität für Markierungen aufwiesen, wurde das System mit einem Postprocessing gekoppelt, welches die Aktivität aus den 20 ml Eluat auf einem Ionentauscher fixiert und etwa 70-80 % der Aktivität in 3ml Eluat (0,25 M Amoniumacetat-Puffer) abgibt [2]. Seit dieser Entwicklung diente der ^{44}Ti/^{44}Sc-Generator als Quelle von ^{44}Sc für Radiomarkierungen und ist auch Teil von Kooperationen zur Applikation von ^{44}Sc-markierter Radiopharmaka an Patienten an der UK Bonn.

Nach 10-jähriger Nutzung zeigte der Generator im Jahr 2017 einen erhöhten Durchbruch an ^{44}Ti. Effektiv konnten in einer Elution des Generators bis zu 200 kBq ^{44}Ti gefunden werden (1000 fache Zunahme [1]). Als erste Maßnahme wurde zwischen Generator und Postprocessing eine kurze Säule (Standard Strata-X Kartusche, 3 mm Durchmesser) eingebaut, welche auf eine Länge von 23 mm mit AG 1-X8 gefüllt wurde. Mit dieser Säule, welche ungewollt eluiertes ^{44}Ti fängt, konnte vorerst weiter mit dem Generator gearbeitet werden, bis die endgültige Aufarbeitung vorbereitet war. Bis Januar 2018 wurde diese Säule einmal gewechselt und eine etwas kleinere Säule eingebaut (20 mm Füllhöhe und dünnere Filter). Beide Säulen wurden entsprechend gelagert und bei der Aufarbeitung mit ausgewaschen.

Der Anstieg des Durchbruchs kann viele Ursachen haben. Zum einen kann das Ionenetauscher-Material auf der Generator-Säule mit der Zeit zerstört werden, da es konstant der radioaktiven Strahlung ausgesetzt ist. Im Verlauf der Jahre mussten bereits mehrmals Fittings und Schläuche, welche direkt am Generator anliegen, gewechselt werden, nachdem diese durch Strahleneinwirkung porös geworden waren. Ein weiterer Grund kann im Aufbau den Generator gefunden werden. Das Mutternuklid ^{44}Ti ist nicht zu 100% auf dem Tauschermaterial fixiert [1]. Bei jeder Elution bewegt sich das ^{44}Ti in Richtung der Elution, weswegen das Generator-Prinzip auch eine Rückelution nach jeder Elution vorsieht. Trotz des konstanten Eluierens und Rückeluierens kann sich das Elutionsprofil immer mehr verbreitert haben, wodurch nach 10 Jahren Nutzung Ausläufer des ^{44}Ti Profils anfingen von der Säule zu kommen.

Mit diesen Voraussetzungen wurde im Januar.2018 mit der Überführung des ^{44}Ti auf eine neue Säule begonnen.

Vorbereitung der neuen Säule: Herstellung, Aufarbeitung und Befüllung

Da nicht sicher war ob das Tauschermaterial beschädigt ist, wäre auch eine Neufixierung des ^{44}Ti auf der alten Säule möglich gewesen. Um zukünftigen Problemen mit dem Tauschermaterial vorzubeugen, wurde eine komplett neue Peek-Säule von der Werkstatt des Instituts für Kernchemie hergestellt. Diese wurde nach dem Bauplan der alten Säule aus dem Jahr 2007 mit den selben Maßen (H = 150 mm, D = 3mm, V_0 = 0,55 ml) nachproduziert. Die Säule wurde beidseitig mit einem Female Luerlock Ausgang versehen, um die Ausgänge sicher an das Postprocessing und die Vorratsflasche anzuschließen.

Das Säulenmaterial musste vor dem Befüllen folgendermaßen präpariert werden: Es wurden 3,56 g des AG 1-X8 in 10 ml Milli-Q Wasser aufgeschlämmt und quellen gelassen. Nach dem Absetzen konnten einzelne in einander verklebte Partikel und größere Partikelcluster an der Oberfläche der Suspension abgenommen werden. Nach 5 - 6 Wiederholungen (auf 45 ml auffüllen und bis 20-25 ml abnehmen) waren keine gröberen Strukturen mehr zu erkennen und eine Suspension aus feinen Partikeln setzte sich am Boden des Vials ab. Als weitere Präparation wurde das AG 1-X8, welches in seiner Chlorid-Form eingesetzte wurde, in seine Bromid-Form überführt. Dazu wurden 4-5 ml HBr (50 % in Wasser) zu dem Tauschermaterial in 20 ml Milli-Q Wasser gegeben und auf 50 ml mit Milli-Q Wasser aufgefüllt. Nach mehrfachem Schütteln wurde die überstehende Lösung abgenommen und die komplette Prozedur vier Mal mit HBr und zwei Mal mit purem Milli-Q Wasser wiederholt. Die finale Suspension von AG 1-X8 wurde in 30 ml Mili-Q-Wasser aufgenommen.

Anschließend wurde das Tauschermaterial in die Säule gefüllt und mehrfach leicht Druck auf die Säule gegeben, um die maximale Menge an Tauschermaterial in die Säule zu drücken. Nach Einsetzen der Filter und Verschließen der Säule wurde die Säule langsam mit 10 ml 4 M Salzsäure eluiert. Hierbei wird das Tauschermaterial in die Chlorid-Form überführt und schwillt damit an. Anschließend wurde die Säule langsam mit 15 ml 0,2 M Oxalsäure eluiert und danach mit Milli-Q-Wasser auf Lagerbedingungen überführt. Nach einer Nacht wurde die Säule zum ersten Mal, mit den später auch für die Generator-Elution genutzten Bedingungen, eluiert. Es wurden 20 ml 0,07 M Salzsäure/0,005 M Oxalsäure langsam über die Säule gegeben. Es konnte ein sehr starker Rückdruck festgestellt werden, welcher aber für eine neue Säule vollkommen normal ist. Die erste Elution dauerte fast 90 Minuten, wo eine spätere normale Elution der Generatorsäule maximal 30 Minuten dauert.

Aufbau für die Überführung der Aktivität auf die neue Säule

Um die Freisetzung von ^{44}Ti zu verhindern, wurde die Aufarbeitung über ein geschlossenes System durchgeführt. Hierzu wurde zwischen der Generatorsäule und dem Vorratsgefäß ein Dreiwegehahn eingebaut. Dieser wurde mit der neuen Säule verbunden, wodurch eine Elution/Rückelution durch beide Säulen in das Vorratsgefäß möglich wurde. Im späteren Verlauf wurde ein weiterer Dreiwegehahn zwischen dem ersten Dreiwegehahn und der neuen Säule eingebaut, um die Zufuhr von Verdünnungslösungen zum Vorratsgefäß zu ermöglichen. Der Aufbau ist in der folgenden Abbildung 1 zu sehen:

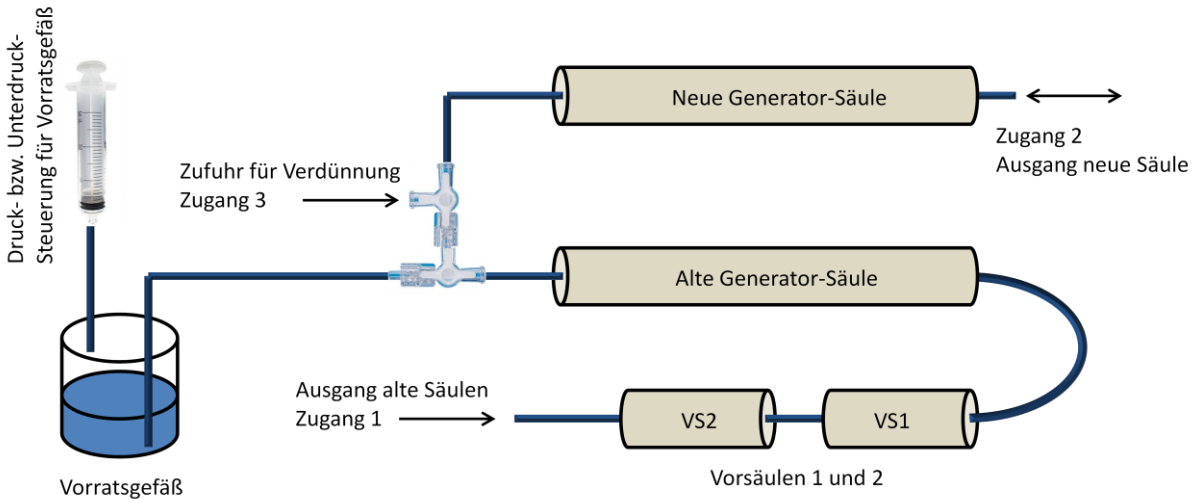


Abbildung 1: finaler Aufbau der ^{44}Ti Übertragung von der alten Generator-Säule und Vorsäulen VS1 und VS2 auf die neue Generator-Säule

Durch diesen Aufbau konnte die Handhabung von freien salzsauren Lösungen mit ^{44}Ti verhindert werden, da zu keinem Zeitpunkt ^{44}Ti Aktivität von dem System eluiert wurde. Es wurde nur ^{44}Sc als Tochternuklid bei den Spülvorgängen aus Zugang 2 erhalten. Dem Aufbau liegt eine Verdünnung in dem Vorratsgefäß (Maximum 25 ml) zu Grunde, bei der 2 ml einer 0,5 M Salzsäure/0,005 M Oxalsäure genutzt werden um das ^{44}Ti von der alten Säule zu lösen und in das Vorratsgefäß zu spülen. Dort wird die Lösung mit 18-20 ml 0,005 M Oxalsäure verdünnt. Damit erhält man nach Durchmischung eine 0,05 M Salzsäure/0,005 M Oxalsäure Lösung im Vorratsgefäß. Diese kann nun durch Umstellung der Hähne auf die neue Säule gepumpt werden und nach Retentionswerten aus Literatur [1] kann man ablesen, dass das ^{44}Ti in einer solchen Lösung kaum Retention auf dem AG 1-X8 der neuen Säulen hat. Ein negativer Punkt dieser Methode ist, dass die

0,5 M salzsaure Lösung das ^{44}Ti nicht optimal auf der alten Säule mobilisiert. Dementsprechend kann nur ein kleiner Teil der Aktivität transferiert werden (maximal 10-20%). Weiterhin ist die perfekte Durchmischung im Vorratsgefäß extrem wichtig, da bei zu ungleichmäßiger Mischung das ^{44}Ti (aus der Lösung und bereits auf der neuen Säule fixiertes) über Zugang 2 eluiert werden würde und somit eine Kontamination mit ^{44}Ti stattfinden kann.

Während der Arbeit wurde das Elutionsverfahren mehrfach optimiert, um mehr ^{44}Ti pro Elution zu transferieren und mit den letzten Elutionen auch das gesamte ^{44}Ti auf die neue Säule zu übertragen. Nachdem erste Elutionen noch vorsahen, die kompletten 18-20 ml Oxalsäure-Lösung über die alte Säule zu geben, wurde bei späteren Elutionen die komplette Oxalsäure Lösung über Zugang 3 zugegeben und damit die alte Säule unter 0,5 M Salzsäure gelagert. Weiterhin wurde die Salzsäurekonzentration nach 10 Elutionen von 0,5 auf 0,6 M angehoben, um eine bessere Elution des ^{44}Ti zu erzielen. Die Vorsäulen wurden nur bei den ersten Elutionen vorgeschaltet und später entfernt, da die auf ihnen befindliche Aktivität fast vollständig runtergespült war.

Finales Elutionprotokoll:

Ein kompletter Durchlauf des Transfers startete mit der Elution der vollständig durchmischten ^{44}Ti Lösung (0,06 M Salzsäure/0,005 M Oxalsäure) aus dem Vorratsgefäß über die neue Säule. Das aus Zugang 2 aufgefangene Eluat enthielt nur ^{44}Sc, wie durch Messung der Aktivität direkt nach Elution und einer Woche danach getestet wurde. Daraufhin wurden die Hähne umgestellt und 2 ml 0,6 M Salzsäure/0,005 M Oxalsäure durch Zugang 1 über die alte Säule in das Vorratsgefäß gepumpt. Nach Druckausgleich wurden die Hähne erneut umgestellt und 18-20 ml 0,005 M Oxalsäure über Zugang 3 in das Vorratsgefäß gegeben. Dort wurde die Lösung kurz geschüttelt und dann über mehrere Stunden stehen gelassen, um eine vollständige Durchmischung zu garantieren.

Dieser gesamte Vorgang wurde 2-3 mal täglich wiederholt. Insgesamt wurde dieser Vorgang 32 mal über 5 Wochen durchgeführt. Da diese Methode eine konstante Elution der neuen Säule in derselben Richtung bedeutet, bestand die Gefahr, dass bei zu häufiger Elution in derselben Richtung trotz niedrigerer Salzsäure-Konzentrationen, das frisch fixierte ^{44}Ti über Zugang 2 zu eluieren. Vorbeugend wurde deswegen nach etwa 5-6 Elutionsschritten immer eine Rückelution über die neue Säule anstatt über die alte Säule durchgeführt. Diese Elution verlief analog zum allgemeinen Elutionsprozess mit dem Unterschied, dass die neue Säule wieder auf Oxalsäure zurück gespült wurde: erst 2 ml 0,6 M Salzsäure/0,005 M Oxalsäure und anschließend 5 ml 0,005 M Oxalsäure von Zugang 2 über die neue Säule in den Vorrat. Abschließend wurde über Zugang 3 13-15 ml 0,005 M Oxalsäure zur Verdünnung in das Vorratsgefäß gegeben.

Ergebnis:

Die Elutionslösungen aus Zugang 2 zeigten bei keiner Elution einen nennenswerten Durchbruch an ^{44}Ti und konnten somit über den kurzlebigen wässrigen Radioaktivabfall entsorgt werden. Über die Wochen konnte ein konstanter Anstieg der ^{44}Sc-Aktivität in dem Eluat aus Zugang 2 gemessen werden, was repräsentativ für ^{44}Ti-Menge auf der neuen Säule ist. Besonders die Werte der ersten Elutionen am Morgen, wo sich über Nacht ein radiochemisches Gleichgewicht zwischen ^{44}Ti und ^{44}Sc auf der neuen Säule einstellen konnte, zeigten bis zur 5. Woche ein konstantes Ansteigen der Aktivität auf der neuen Säule. In den zwei abschließenden Wochen wurde regelmäßig vor und nach der Elution die Aktivität im Vorratsgefäß und auf den Säulen gemessen. In der 5. Woche zeigte die neue Säule eine Aktivität von fast 600-650 MBq im ^{18}F-Fenster des Curiemeters. Zu beachten ist, dass ^{44}Sc normal einen Faktor von 0,7 im Fluorfenster hat (100 MBq gemessen entsprechen 70 MBq effektiv) und der Faktor für ^{44}Ti noch deutlich niedriger ausfällt, da verschiedene Gammalinien des ^{44}Ti zu einer deutlich höheren gemessenen Aktivität führen als effektiv vorhanden. Auch ohne einen Wert für die absolute Aktivität konnte gezeigt werden, dass sich durch die letzten Elutionen die Aktivität auf der neuen Säule kaum erhöht hatte und auf der alten Säule stabil war. Weiterhin zeigte der flüssige Abfall einen konstanten Wert, welcher auf Restaktivität durch die 10-jährige Nutzung als Vorratsgefäß zurückzuführen war. Mit diesen Werten wurde der Transfer des ^{44}Ti von der alten auf die neue Säule beendet, da in keinem der letzten Elutionsschritte ein Transfer von ^{44}Ti auf die neue Säule zu beobachten war.

In einem finalen Test wurde die alte Säule über Zugang 1 mit 4 M Salzsäure gespült und überprüft, was an Aktivität im Vorrat zu finden ist. Die 4 M Salzsäure müsste nach Literatur [1] eine optimale Elutionskraft auf das ^{44}Ti ausüben und alles noch fixierte ^{44}Ti eluieren. Es konnten nach Abzug der Restaktivität des Vorratsvials (3 MBq) gerade mal 7 MBq im Curiemeter gemessen werden, welche < 1 MBq ^{44}Ti entsprechen. Da sich diese Aktivität in fast 3 ml 4 M Salzsäure befand und somit nur unter extremer Verdünnung auf die neue Säule aufzubringen wäre, wurde von einer weiteren Verwendung abgesehen und die Aktivität über dem radioaktiven Flüssigabfall entsorgt. Als abschließende Maßnahme wurden alle Schläuche, Hähne und das alte Vorratsgefäß mit der Druck-Spritze entsorgt und ein komplett neues Vorratsgefäß gebaut und alle Verschlauchungen und Spritzen ersetzt. Mit dem neuen Elutionssystem wurde die neue Generator-Säule in die Bleiburg des Generators eingebaut und an das Postprocessing angeschlossen.

Nach ersten Elutionen mit geringe Ausbeuten zeigten alle weiteren Elutionen, dass ohne Postprocessing um die 175 MBq (122,5 MBq nach Korrektur) ^{44}Sc mit einem ^{44}Ti-Durchbruch von 100-150 Bq erhalten werden konnten. Damit sind > 90 % (Wert vor Aufarbeitung: 190 -195 MBq unkorrigiert) der ^{44}Ti-Aktivität erfolgreich transferiert worden. Nach Aufarbeitung durch das

Postprocessing stehen bei optimalen Bedingungen 135 MBq (95 MBq nach Korrektur) zur Verfügung, welche mit einem ^{44}Ti-Durchbruch von < 20 Bq wieder optimal für Radiomarkierungen geeignet sind.

Literatur 6.3

1. Filosofov BD V, Loktionova NS, Rösch F. A ^{44}Ti/^{44}Sc radionuclide generator for potential application of ^{44}Sc-based PET-radiopharmaceuticals. 2010;156:149-156.

2. Pruszyński M, Loktionova NS, Filosofov D V., Rösch F. Post-elution processing of ^{44}Ti/^{44}Sc generator-derived ^{44}Sc for clinical application. Appl Radiat Isot. 2010;68(9):1636-1641.

Anerkennung

Ich möchte Dr. Filosofov für seine Anleitung und Unterstützung bei der Aufarbeitung des ^{44}Ti/^{44}Sc-Generators danken.

6.4 *In vivo*-Click-Anwendung von DATA^{5m}- und DOTA-PEG$_{11}$-Tetrazinen

Einleitung:

Für die Anwendung von komplexeren Target-Vektoren wie z.B. Antikörpern muss man in der Nuklearmedizin deren Pharmakokinetik und die damit verbundenen *in vivo*-Halbwertszeit berücksichtigen. Die *in vivo*-Halbwertszeit bestimmt, wie lange der Target-Vektor braucht, um sich im Zielgewebe anzureichern und aus umliegendem Gewebe bzw. dem Blut ausgewaschen zu werden. Besonders Antikörper oder Antikörper-Fragmente zeigen eine sehr langsame Pharmakokinetik bis zu mehreren Tagen. Die Halbwertszeit des verwendeten Radionuklides muss an diese langsame Pharmakokinetik angepasst sein, so dass nach der Anreicherung des Target-Vektors noch detektierbare Mengen an Aktivität vorhanden sind. Die aktuelle Anwendung von Antikörpern für die PET erfolgt fast ausschließlich mit dem ^{89}Zr, welches mit über drei Tagen Halbwertszeit lange Zirkulationszeiten und eine langsame Anreicherung über mehrere Tage ermöglicht [1]. Für das ^{89}Zr wird der Chelator DFO bzw. das neue DFO* verwendet [2]. Durch die längere Halbwertszeit des ^{89}Zr ist die Strahlenbelastung für die Patienten allerdings höher als bei einer Messung mit ^{68}Ga oder ^{18}F.

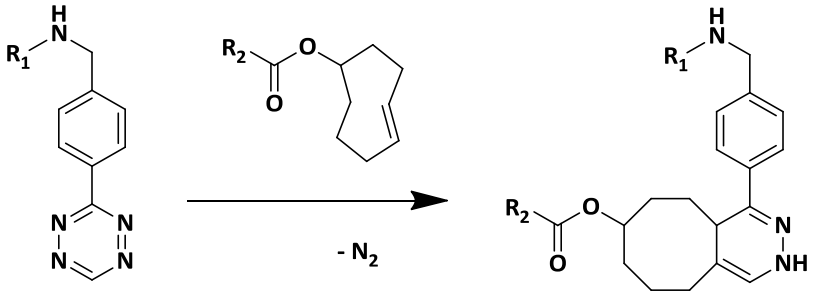
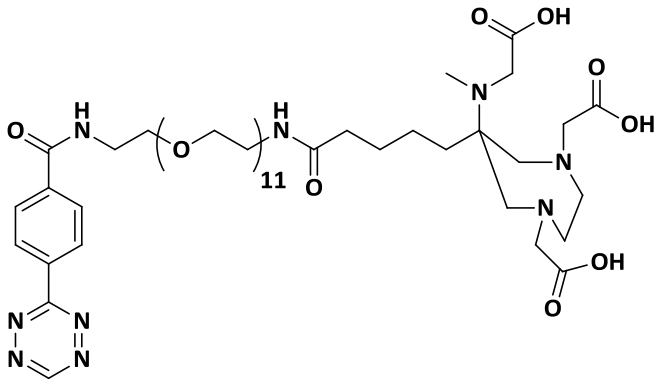


Abbildung 1: Clickreaktion zwischen R_1-Tetrazin und R_2-Transcycloocten unter Abspaltung von Stickstoff.

Um den Einsatz von kurzlebigen Nukliden wie ^{68}Ga oder ^{18}F für Antikörper zu ermöglichen, wurde der *in vivo*-Click-Ansatz entwickelt [3, 4]. Bei diesem Ansatz wird die Applikation des Antikörpers von der Applikation der Radioaktivität getrennt. Damit die Radioaktivität dennoch *in vivo* an den Antikörper bindet und sich somit am Target-Gewebe anreichert, wird sich einer Diels-Alder Klick-Reaktion bedient. Dazu wird der Antikörper mit einem Transcycloocten (TCO) funktionalisiert, während an dem Chelator ein Tetrazin (Tz) gekoppelt wird. Die Diels-Alder [4+2] Cycloaddition zwischen dem Tetrazin und dem Transcycloocten wird aufgrund ihrer extremen Geschwindigkeit und Quantitativität als Click-Reaktion bezeichnet (Abbildung 1). Die Besonderheit dieser Click-Reaktion

ist, dass sie auch *in vivo* sehr gut abläuft. Dies konnte bereits in verschiedenen Studien gezeigt werden [3, 4]. Damit ist ein Pretargeting möglich, wobei ein Antikörper (funktionalisiert mit TCO) injiziert wird und sich über einen passenden Zeitraum *in vivo* am Target anreichern kann. Nachdem die Anreicherung abgeschlossen ist, wird das radioaktiv markierte Chelator-Tz Derivat injiziert; es reichert sich über die Click-Reaktion mit dem Antikörper am Target an. Die für den radioaktiv markierten Tracer wichtige Pharmakokinetik ist die des Tetrazins, welche extrem schnell ist und somit kurzlebige Nuklide zulässt. Weiterhin zeigen Chelator-Tz Derivate allgemein eine schnelle renale Ausscheidung, wodurch schnell ein guter Kontrast von Target zu umliegendem Gewebe erreicht werden kann [3].

^{68}Ga markiertes DATA^{5m}-PEG$_{11}$-Tz für Pretargeting mit 5B1-TCO



DATA^{5m}-PEG$_{11}$-Tz

Im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Jason Lewis vom Momorial Sloan-Kettering Cancer Center in New York wurde das DATA^{5m}-PEG$_{11}$-Tz synthetisiert. Dazu wurde von der Arbeitsgruppe Rösch aus Mainz der Chelator DATA^{5m} zur Verfügung gestellt und in New York mit einem PEG$_{11}$-Spacer und anschließend dem Tetrazin gekoppelt. Das erhaltene DATA^{5m}-PEG$_{11}$-Tz wurde erfolgreich in Acetatpuffer pH 4,5 bei Raumtemperatur mit ^{68}Ga markiert und zeigte bereits nach 5 min >90 % radiochemische Ausbeute. Aufreinigung mittels Radio-HPLC und Kartusche lieferte das [^{68}Ga]Ga-DATA^{5m}-PEG$_{11}$-Tz in guten Ausbeuten für erste Tierversuche.

Bioverteilung in gesunden Mäusen:

In einem ersten Schritt wurde die Bioverteilung in gesunden Mäusen untersucht. Hierbei wurde eine sehr schnelle, rein renale Ausscheidung in die Blase festgestellt. Es konnte keine unspezifische Anreicherung in Organen beobachtet werden (Abbildung 2).

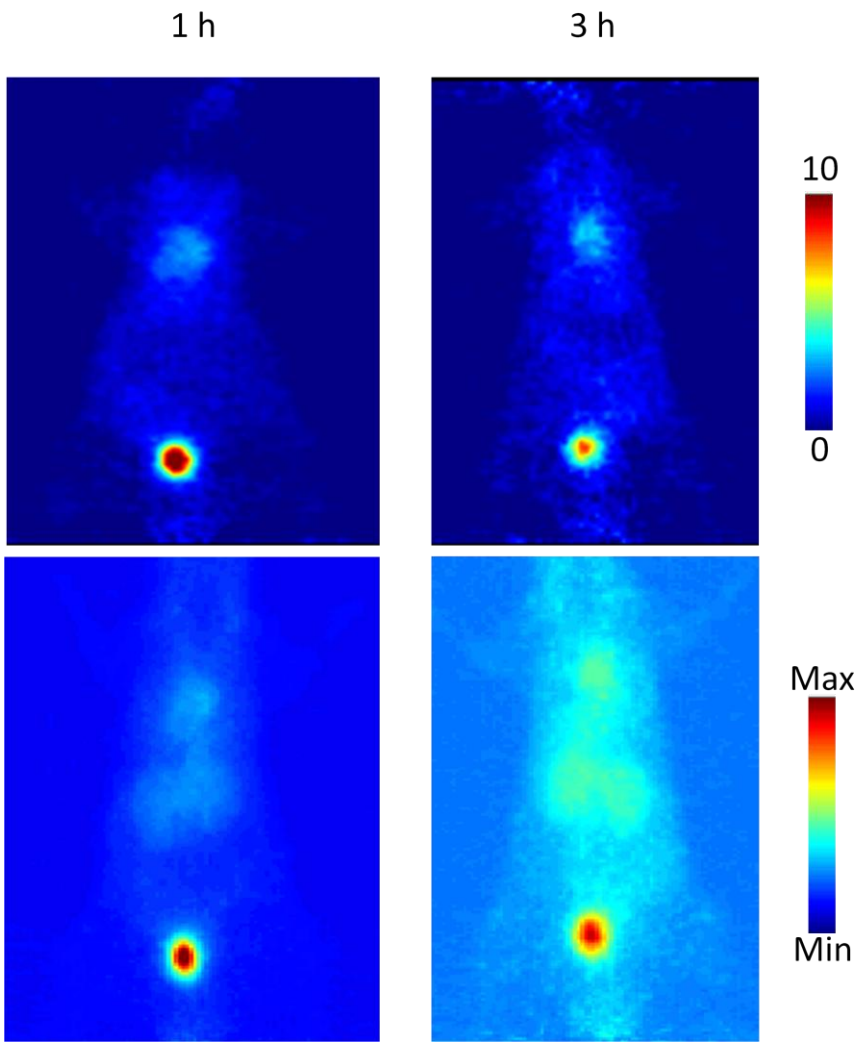


Abbildung 2: PET-Abbildungen von zwei gesunden Mäusen eine und drei Stunden p. i. von [^{68}Ga]Ga-DATA^{5m}-PEG$_{11}$-Tz

Bioverteilung in Bauchspeicheldrüsenkrebs-tragenden Mäusen:

Für die Pretargeting-Tierversuche wurden tumortragende Mäuse verwendet, welche an dem rechten hinteren Oberschenkel einen Bauchspeicheldrüsentumor trugen. Es handelt sich um ein BxPC3-Tumormodell, welches den Rezeptor CA19.9 expremiert. Zum Targeting dieses Rezeptors wurde der Antikörper 5B1 verwendet, welcher in der Arbeitsgruppe von Prof. Lewis etabliert ist. Dieser wurde

als 5B1-TCO eingesetzt und 72 Stunden vor Applikation des [^{68}Ga]Ga-DATA^{5m}-PEG$_{11}$-Tz appliziert. Wie in Abbildung 3 zu erkennen, konnte zwei und drei Stunden nach Injektion des [^{68}Ga]Ga-DATA^{5m}-PEG$_{11}$-Tz eine gute Visualisierung des Tumors erreicht werden. Dennoch ist das Tumor-zu-Hintergrund-Verhältnis nicht optimal. Besonders der relativ hohe Uptake im Blut (Abbildung 4), welcher auch in Abbildung 3 als Uptake im Herzen zu erkennen ist, zeigt, dass entweder noch Antikörper im Blut zirkulierte oder das Auswaschen des [^{68}Ga]Ga-DATA^{5m}-PEG$_{11}$-Tz zu langsam ist.

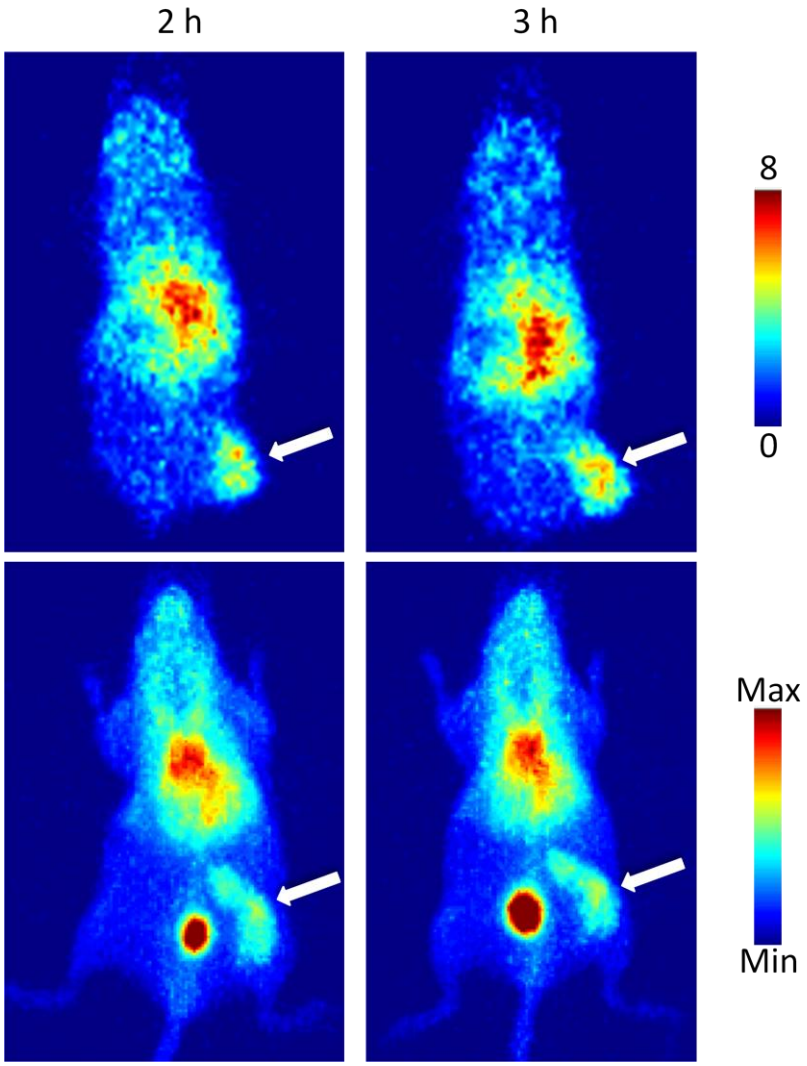


Abbildung 3: PET-Aufnahmen von zwei tumortragenden Mäusen eine und drei Stunden p. i. von [^{68}Ga]Ga-DATA^{5m}-PEG$_{11}$-Tz nach Pretargeting mit 5B1-TCO 72 Stunden vor Applikation des [^{68}Ga]Ga-DATA^{5m}-PEG$_{11}$-Tz; Weiße Pfeile markieren Tumoranreicherung

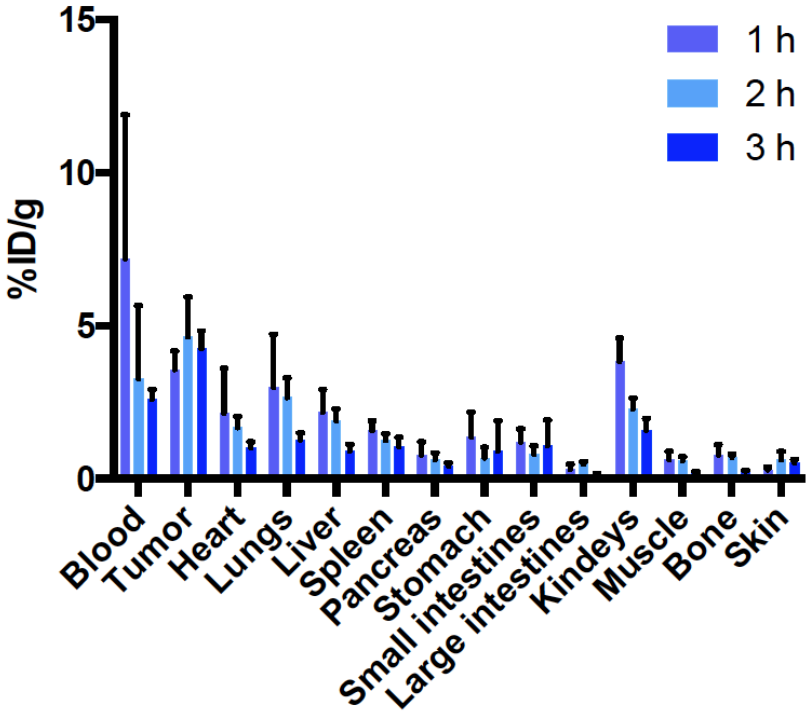
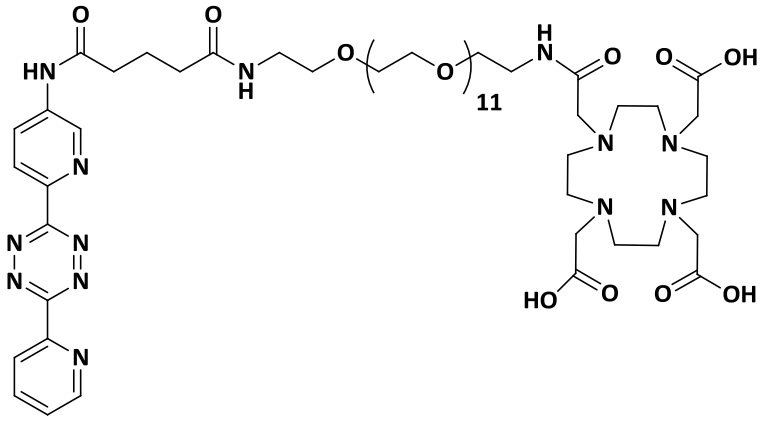


Abbildung 4: Biodistributionsdaten eine, zwei und drei Stunden nach Injektion von [^{68}Ga]Ga-DATA^{5m}-PEG$_{11}$-Tz nach Pretargeting mit 5B1-TCO 72 Stunden vor Applikation des [^{68}Ga]Ga-DATA^{5m}-PEG$_{11}$-Tz

Zusammenfassung:

Die Synthese des DATA^{5m}-PEG$_{11}$-Tz war erfolgreich. Es zeigt ausgezeichnete Markierungseigenschaften für ^{68}Ga bei Raumtemperatur. Erste Tierstudien zeigten ein rein renale Ausscheidung des [^{68}Ga]Ga-DATA^{5m}-PEG$_{11}$-Tz in gesunden Tieren und eine gute Tumoranreicherung in tumortragenden Mäusen bei Pretargeting mit 5B1-TCO. Der Tumor konnte in PET-Aufnahmen gut visualisiert werden und die Biodistributionsdaten zeigten keine unspezifische Aufnahme in anderen Organen. Einzig der relativ hohe Blut-Uptake erzeugt ein nicht optimales Tumor zu Background Verhältnis und es muss in der Zukunft geklärt werden, wie sich dieser Uptake unterdrücken lässt. Es wurden bereit Anstrengungen unternommen den Spacer zu verkürzen oder eine Lysin-Einheit in den Spacer einzubauen. In der Hoffnung, die renale Auswaschung zu beschleunigen.

^{44}Sc markierte DOTA-Tetrazine für Pretargeting-Experimente mit TCO-Bisphophonaten



DOTA-PEG$_{12}$-Tz

In der Arbeitsgruppe von Prof. Herth in Kopenhagen wurde ein ^{111}In markiertes DOTA-PEG$_{12}$-Tz evaluiert. Es konnte für SPECT Messungen nach *in vivo*-Pretargeting mit TCO funktionalisierten Antikörpern und Bisphosphonaten erfolgreich eingesetzt werden. ^{177}Lu-markiertes DOTA-PEG$_{12}$-Tz zeigte weiterhin eine reduzierte Dosimetrie in präklinischen Studien. Ein ^{44}Sc-markiertes DOTA-PEG$_{12}$-Tz würde eine Anwendung dieser Pretargeting-Strategie mit einem PET-Nuklid ermöglichen. Als solches wurde DOTA-PEG$_{12}$-Tz in Mainz mit ^{44}Sc radiochemisch evaluiert und die Stabilität gegen Humanserum und PBS-Puffer bestimmt. Nach erfolgreicher Markierung und guter Stabilität wurden Tierversuche mit jungen Ratten angesetzt, um *in vivo*-Pretargeting-Versuche mit einem TCO-Bisphosphonat durchzuführen. Das TCO-Bisphosphonat wird eine Stunde vor dem [^{44}Sc]Sc-DOTA-PEG$_{12}$-Tz injiziert. Es reichert sich bei gesunden jungen Ratten in den Wachstumsfugen an den Oberschenkelknochen und Schultergelenken an.

Radiomarkierung mit ^{44}Sc und Stabilitätsstudien:

Die Radiomarkierung erfolgte im Eluat des Postprocessings des ^{44}Ti/^{44}Sc-Generators, 0,25 M Amoniumacetat Puffer pH 4, bei 95 °C. Es wurde keine Optimierung der Precursormenge vorgenommen, da für die Tierversuche die Menge des DOTA-PEG$_{11}$-Tz ein Vielfaches des applizierten TCO je Tier sein musste (Verhältnis 100 : 1 für Tz :TCO) und diese Menge deutlich höher war als für eine normale Markierung nötig. Dennoch konnte gezeigt werden, dass 40 nmol des DOTA-PEG$_{12}$-Tz in 3 ml Eluat die 110 MBq ^{44}Sc erfolgreich komplexieren konnten. Es kam bereits nach 5 min zu einer Markierung >90 % und nach 10 min konnte ein nahezu quantitative Markierung erhalten werden.

Untersuchungen der Markierung bei 5, 10 und 20 Minuten offenbarten eine Degradierung der Substanz durch zusätzliche Peaks auf der Radio-HPLC. Dies konnte auch bei der Herstellung des kalten Komplexes durch Vermessen auf einer LC-MS bestätigt werden. Da bei 10 Minuten bereits eine Markierung >95 % vorlag und die Nebenprodukte noch kaum sichtbar waren, wurde die Markierung für die Tierversuche nach 10 Minuten abgebrochen und mit kaltem traseSELECT® Wasser verdünnt.

Die finale Markierung erfolgte mit den vollen 3 ml-Eluat des Postprocessing mit 66 nmol DOTA-PEG_{11}-Tz und Zugabe von 100 µl Ethanol gegen Radiolyse. Nach 10 Minuten bei 95 °C wurde die Reaktion abgebrochen und mit 3 ml traceSELECT® Wasser verdünnt. Anschließend wurde das [^{44}Sc]Sc-DOTA-PEG_{12}-Tz und DOTA-PEG_{12}-Tz auf einer C-18 Kartusche (SEP-PAK LIGHT C18 von Waters®) fixiert und von dieser in 400 µl Ethanol eluiert. In 20 - 25 Minuten wurde das Ethanol bei 98 °C abgedampft und die verbleibenden <50 µl in zwei mal 1 ml 0,9 % steriler Kochsalzlösung aufgenommen (zweifaches Ausspülen des Vials mit je 1 ml). Die finale Lösung wurde mit 0,9 % steriler Kochsalzlösung auf 2,4 ml verdünnt. Damit enthielten 400 µl jeweils 11 nmol [^{44}Sc]Sc-DOTA-PEG_{12}-Tz bzw. DOTA-PEG_{11}-Tz, was der zu applizierenden Menge für eine 140 - 160 g schweren Ratte entspricht, bei Applikation von 3 µg TCO pro 1 g Körpergewicht. Die Markierung wurde mit 100 - 110 MBq ^{44}Sc begonnen und die finale Formulierung in 0,9 % Kochsalzlösung enthielt 70 - 75 MBq, was eine optimale Aktivität von 11 - 13 MBq ^{44}Sc pro Injektion von 400 µl bedeutet.

Qualitätskontrolle wurde mittels Radio-DC (Dünnfilmchromatropie mit Citratpuffer pH 7 auf TLC Silica gel 60 F_{254} Platten von Merck) direkt nach Reaktionsende, aus der Ethanolphase und aus der finalen Formulierung durchgeführt. Während die Markierungslösung noch 1 - 2 % freie Aktivität zeigte, konnten im Ethanol und der finalen Formulierung >99,9 % Ausbeute festgestellt werden. Vorangegangene Untersuchungen der Ethanolphase mittels Radio-HPLC zeigten keine Degradierung des [^{44}Sc]Sc-DOTA-PEG_{11}-Tz durch das Erhitzen in Ethanol. Weiterhin wurde die Click-Fähigkeit des [^{44}Sc]Sc-DOTA-PEG_{11}-Tz in den Testmarkierungen nach Abdampfen des Ethanols durch ein zweites DC-System getestet: Reverse Phase DC-Platten mit 50 % Acetonitril / 50 % Wasser (beide mit 0,1 % TFA). Dazu wurde die Ethanolphase und eine Bisphosphonat-TCO Lösung im Verhältnis 1 : 10 gemischt und in direktem Vergleich mit der reinen Ethanolphase auf die DC-Platte aufgetragen. Das Bisphosphonat verbleibt mit einem R_f von 0 auf der Baseline und somit auch alles an das Bisphosphonat geclickte [^{44}Sc]Sc-DOTA-PEG_{11}-Tz, während das freie [^{44}Sc]Sc-DOTA-PEG_{11}-Tz auf einen Rf von 0,7 - 0,8 steigt. Mit nur einem Spot auf der Baseline bei dem Bisphosphonat-TCO konnte gezeigt werden, dass alles radiomarkierte [^{44}Sc]Sc-DOTA-PEG_{11}-Tz noch ein click-fähiges Tetrazin trägt.

Die Testmarkierungen wurden nach Aufarbeitung auf ihre Stabilität gegen Humanserum und PBS-Buffer getestet. Dazu wurden kleine Mengen von 50 µl Ethanol in 1 ml des Testmediums gelöst und in einem Heitzschüttler bei 37 °C geschüttelt. Für ^{44}Sc wurden Werte bei 1, 2, 4, 8 und 24 Stunden genommen und mit Radio-DC überprüft. Der [^{44}Sc]Sc-DOTA-PEG$_{12}$-Tz Komplex zeigte sich in beiden Medien als vollständig stabil mit > 98 % nach 24 Stunden und > 99 % nach 8 Stunden.

In vivo-Bioverteilung und PET-Aufnahmen:

Für die Tierversuche wurden junge männliche Wister Ratten verwendet. Ingesamt wurden 8 Tiere verwendet: n = 5 mit PB-TCO 1 h vor Injektion des TZ und n = 3 mit NaCl 1 h vor Injektion des Tz (Kontrolle). Weiterhin wurden aus beiden Gruppen jeweils ein Tier als 24 Stunden-Kontrolle erst nach 24 Stunden getötet. Alle anderen Tiere wurden 4 Stunden nach Injektion des [^{44}Sc]Sc-DOTA-PEG$_{12}$-Tz getötet. In den 4 bzw. 24 Stunden bis zur Tötung wurden sowohl TCO-Tiere als auch Kontrolltiere in einem Focus 120 (Siemens) µPET-Scanner gemessen. Messungen erfolgten dynamisch über eine Stunde und statisch über 30 Minuten 3,5 Stunden nach der Injektion. Nach Tötung der Tiere wurden Organe für die Messung in einem 2480 WIZARD^2 Automatic Gamma Counter (PerkinElmer, Deutschland) entnommen. Für die Feststellung der Aufnahme am Knochen wurde sowohl ein Femur (Oberschenkelknochen) als auch ein Humerus (Schultergelenk) entnommen.

Die Bio-Verteilung zeigt eine deutliche Anreicherung in Femur und Humerus bei Vorabinjektion von BP-TCO und eine reine renale Ausscheidung ohne Vorabinjektion (Abbildung 5). Die Anreicherung im Urin überstieg die der Niere um das 8-9 fache ohne BP-TCO und um das 3 fache bei Vorabinjektion von BP-TCO, weswegen die Werte nicht abgebildet wurden.

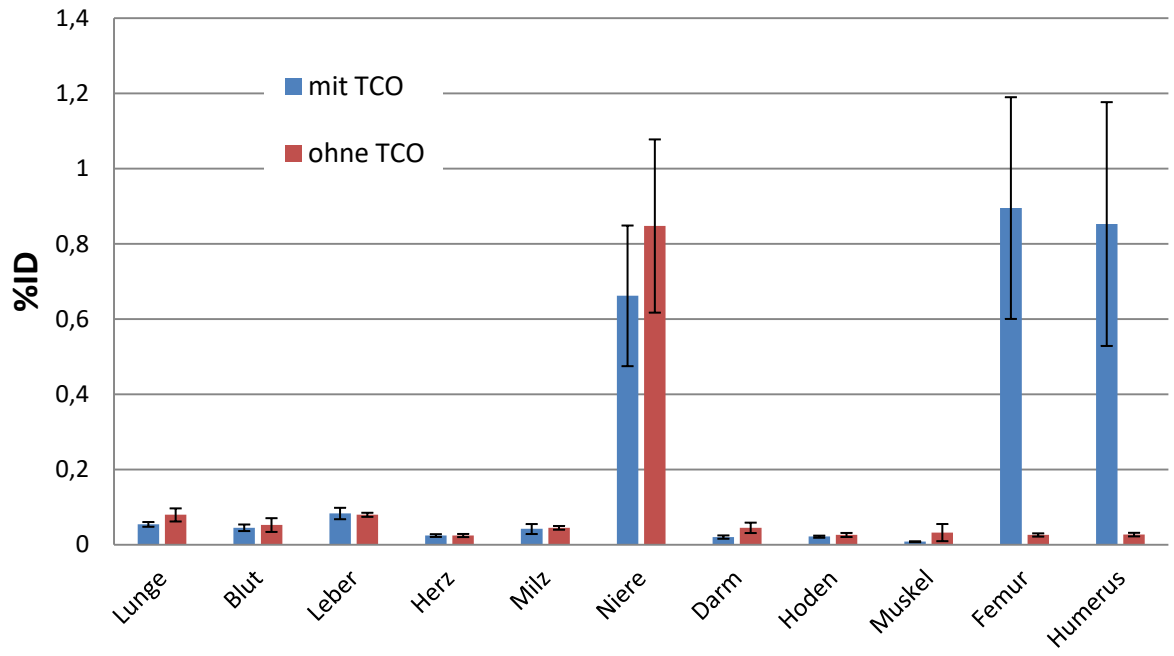


Abbildung 5: Bio-Verteilung von jungen männlichen Wister Ratten mit Vorabinjektion von BP-TOC (n = 5) und Vorabinjektion von NaCl (n = 3).

Die PET-Aufnahmen ohne Vorabinjektion des BP-TCO zeigten wie erwartet keine spezifische Aufnahme in Knochen oder Organen (Abbildung 6). Es konnte eine rein renale Ausscheidung festgestellt werden. Bei Vorabinjektion des BP-TCO konnte eine gute Visualisierung des vollständigen Skelettes, besonders der Gelenke, beobachtet werden. Die statische Messung 3,5 Stunden nach Injektion des [^{44}Sc]Sc-DOTA-PEG$_{12}$-Tz zeigt einen ausgezeichneten Kontrast (Abbildung 6).

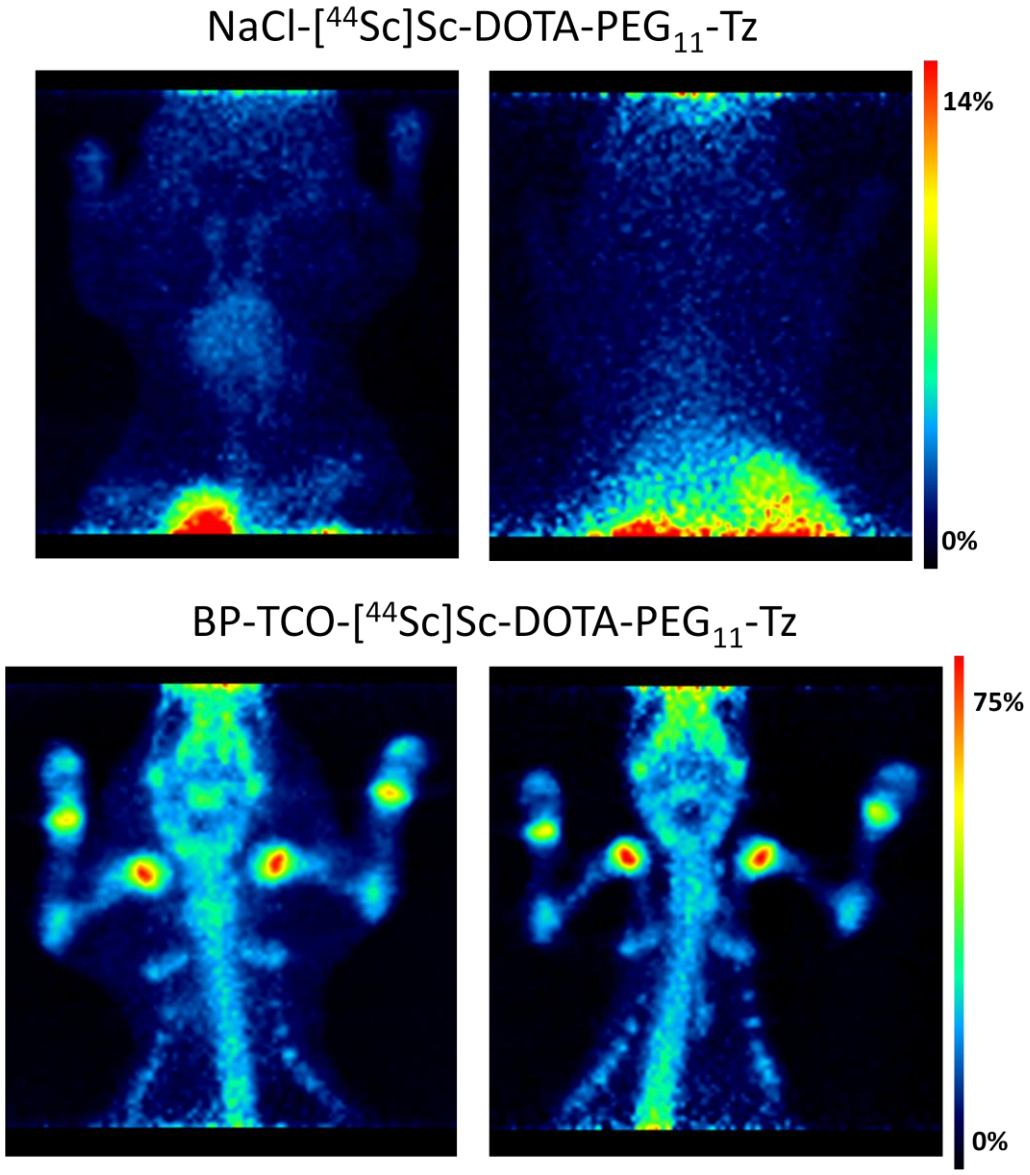


Abbildung 6: PET Aufnahmen von [^{44}Sc]Sc-DOTA-PEG$_{11}$-Tz ohne BP-TOC (oben) und mit BP-TCO (unten). Jeweils links die dynamische PET-Aufname über 1 Stunde (Summe über Frame 14-19, zeigt die letzten 30 Minuten) und rechts die statische PET-Aufname über 30 min, 3,5 Stunden nach Injektion des [^{44}Sc]Sc-DOTA-PEG$_{11}$-Tz. Rekonstruktion mittels OSEM 2D.

Weiterhin konnte anhand der dynamischen PET-Aufnahmen die Anreicherung von beiden Schultergelenken und dem Hintergrund als Referenz gegen die Zeit aufgetragen werden. Dazu wurden zwei "Region of Interest" (RoI) in je einem Schultergelenk und eine dritte RoI im Bauchraum definiert. Durch minütliche Ermittlung des SUV in den RoI konnte in den Schultergelenken bei Vorabinjektion von BP-TCO eine Anreicherung über 20 Minuten beobachtet werden, wobei zwischen 20 und 30 Minuten der konstante Zerfall des ^{44}Sc die Anreicherung übersteigt und der Wert zu sinken beginnt (Abbildung 7). In der RoI des Hintergrundes ist kaum Anreicherung zu beobachten, welche sich auch innerhalb von weniger als 30 Mintuen komplett ausgewaschen hat. Ohne Vorabinjektion von BP-TOC gleicht sich die RoI der Schulter vollständig der des Hintergrundes an.

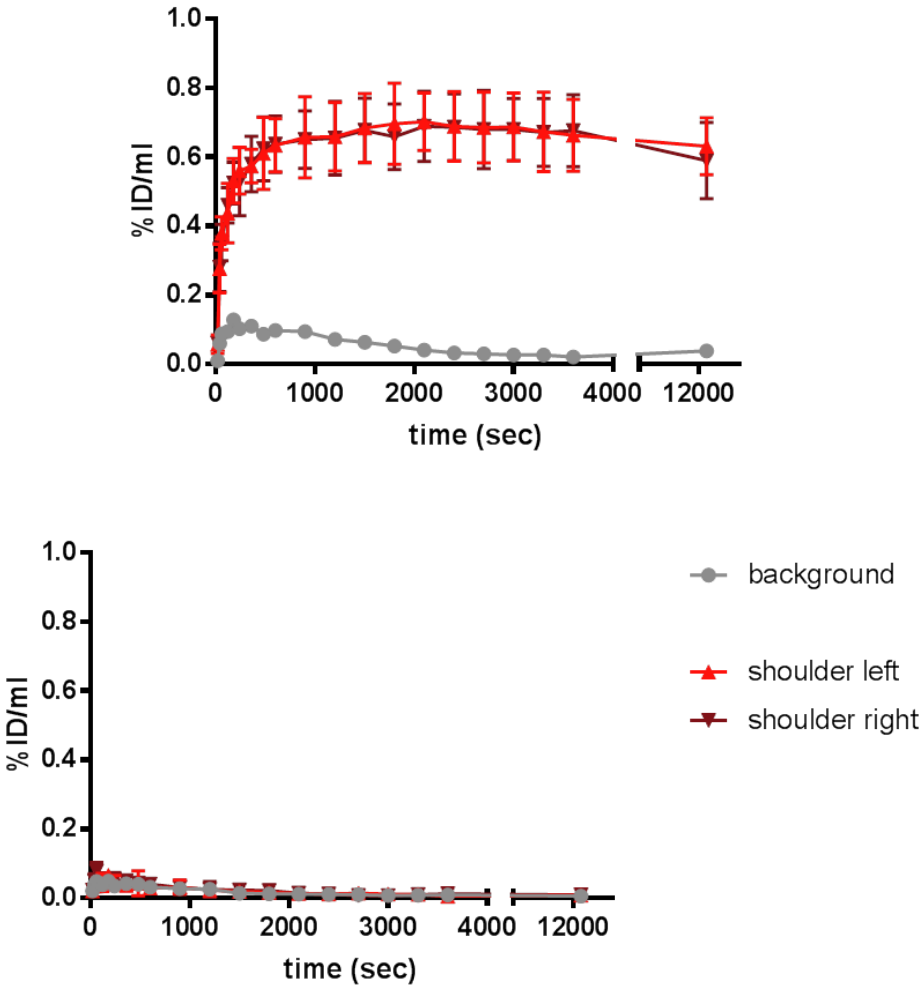


Abbildung 7: Aus der dynamischen PET-Messung erhaltene Werte für die Aufnahme in beiden Humerus (linke und rechte Schulter) und einem Hintergrundbereich in % der Injizierten Aktivität (%ID) pro ml. Oben Werte bei Vorabinjektion des BP-TOC (ALN-TCO) 1 Stunde vor Injektion des [^{44}Sc]Sc-DOTA-PEG$_{12}$-Tz. Unten Werte bei Vorabinjektion von Kochsalzlösung (NaCl) 1 Stunde vor Injektion des [^{44}Sc]Sc-DOTA-PEG$_{12}$-Tz.

Zusammenfassung und Ergebnis:

Die Radiomarkierung mit ^{44}Sc wurde erfolgreich auf die Bedingungen der Tierversuche optimiert und die passende Konzentration und Aktivität [^{44}Sc]Sc-DOTA-PEG$_{12}$-Tz in einem injektionsfähigen Volumen zur Verfügung gestellt werden. Nebenreaktionen wurden unterbunden und das [^{44}Sc]Sc-DOTA-PEG$_{12}$-Tz wurde nach Aufreinigung in >99,9 % radiochemischer Reinheit erhalten. [^{44}Sc]Sc-DOTA-PEG$_{12}$-Tz zeigt sich vollständig stabil gegen Humanserum und PBS-Puffer über 24 Stunden.

In den Tierversuchen konnte das *in vivo*-click-Prinzip erfolgreich umgesetzt werden. Bei allen Tieren mit Vorabinjektion des BP-TCO kam es zu einer hohen Anreicherung des [^{44}Sc]Sc-DOTA-PEG$_{12}$-Tz an Femur und Humerus (nach *ex vivo*-Biodistribution) als auch zu einer guten Visualisierung des Skelettes, besonders der Gelenke (in den PET-Aufnahmen). Ohne Vorabinjektion des BP-TCO kam es zu keiner Aufnahme des [^{44}Sc]Sc-DOTA-PEG$_{12}$-Tz und sowohl in der Bioverteilung als auch in den PET-Aufnahmen konnte ein reine renale Ausscheidung beobachtet werden.

Diese positiven Ergebnisse machen die Anwendung von [^{44}Sc]Sc-DOTA-PEG$_{12}$-Tz mit anderen TCO-funktionalisierten Derivaten wie Antikörpern erstrebenswert.

Literatur 6.4

1. van de Watering FCJ, Rijpkema M, Perk L, et al. Zirconium-89 Labeled Antibodies: A New Tool for Molecular Imaging in Cancer Patients. Biomed Res Int. 2014;2014:1-13.

2. Patra M, Bauman A, Mari C, et al. An octadentate bifunctional chelating agent for the development of stable zirconium-89 based molecular imaging probes. Chem Commun. 2014;50(78):11523-11525.

3. Zeglis BM, Sevak KK, Reiner T, et al. A Pretargeted PET Imaging Strategy Based on Bioorthogonal Diels-Alder Klick Chemistry. J Nucl Med. 2013;54(8):1389-1396.

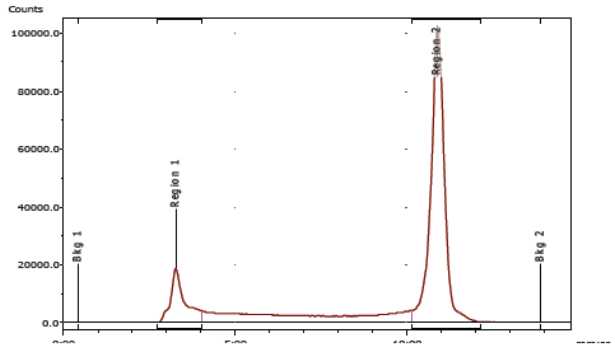
4. Zeglis BM, Brand C, Abdel-Atti D, et al. Optimization of a Pretargeted Strategy for the PET Imaging of Colorectal Carcinoma via the Modulation of Radioligand Pharmacokinetics. Mol Pharm. 2015;12(10):3575-3587.

6.5 Evaluation des DATA chelators mit [^{18}F]AlF^{2+}

Im Rahmen der Kooperation über *in vivo*-Click-Anwendung des DATA^{5m} (6.3) wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Lewis in New York (Memorial Sloan Kettering Cancer Center) das DATA^{5m}-PEG$_{11}$-Tz synthetisiert und mit [^{18}F]AlF^{2+} markiert. In ersten Markierungen zeigte der Chelator sehr gute Markierungsausbeuten >80 % (nach Radio-HPLC; Abbildung 1). Literaturbekannt sind vor allem NOTA bzw. NODAGA als Chelatoren für [^{18}F]AlF^{2+} [1, 2]. Weitere direkt für das [^{18}F]AlF^{2+} entwickelte Systeme und andere Chelatoren, wie HBED, wurden ebenfalls mit [^{18}F]AlF^{2+} evaluiert [3, 4].

Für die Anwendung des [^{18}F]AlF^{2+} wäre ein Chelator, welcher sowohl ^{68}Ga als auch das [^{18}F]AlF^{2+} komplexieren kann, optimal. Damit könnten das selbe Radiopharmakon in Kliniken, wo nur eines der beiden Nuklide zur Verfügung steht, eingesetzt werden bzw. bei Ausfall des Zyklotrons direkt die ^{68}Ga-markierte Variante verfügbar sein oder umgekehrt bei Generatorknappheit das zyklotronproduzierte [^{18}F]AlF^{2+} verwendet werden. Auch wenn das NOTA, welcher als erster Chelator für [^{18}F]AlF^{2+} publiziert wurde, diese Bedingungen erfüllen würde, ist seine Komplexstabilität mit dem [^{18}F]AlF^{2+} umstritten. Häufig wird 1% Ethanol zugesetzt oder von den allgemeinen Bedingungen abgewichen, da das [^{18}F]AlF^{2+}-NODAGA nicht stabil ist in reinem PBS oder Humanserum [5]. Es wurden zwar bereits automatisierte Systeme zur Markierung mit [^{18}F]AlF^{2+}entwickelt [6] und einige veröffentlichte Derivate sind laut Literatur stabil [7], aber NOTA/NODAGA hat nie Verbreitung als [^{18}F]AlF^{2+}-Chelator erreicht. Damit besteht nach wie vor ein Bedarf an einem optimalen Chelator für [^{18}F]AlF^{2+} und ^{68}Ga.

Chromatogram: ^{18}F



Regions: ^{18}F Detector: PMT

Name	Start (mm:ss)	End (mm:ss)	Retention (mm:ss)	Area (Counts)	%ROI (%)	%Total (%)
Bkg 1	0:25	0:26	0:25			
Region 1	2:45	4:01	3:16	531981.1	15.87	12.18
Region 2	10:09	12:10	10:54	2819420.2	84.13	64.58
Bkg 2	13:54	13:55	13:54			
2 Peaks				3351401.3	100.00	76.76

Abbildung 1: Radio-HPLC der ersten Markierung von DATA^{5m}-PEG$_{11}$-Tz mit [^{18}F]AlF^{2+}

Produktion des [^{18}F]AlF^{2+}

Nach der ersten erfolgreichen Markierung des DATA^{5m}-PEG$_{11}$-Tz in den New Yorker Laboren von Prof. Lewis (Abbildung 1), wurde versucht, den reinen DATA^{5m}-Chelator in Mainz mit dem [^{18}F]AlF^{2+} zu evaluieren. Dazu wurden 2 verschiedene Herstellungsvarianten des [^{18}F]AlF^{2+} getestet.

Kalium-Hydrogen-Carbonat-Variante (wird so in der Arbeitsgruppe von Prof. Lewis verwendet): Vor dem Einsetzen des [^{18}F]F$^-$ wurde eine QMA-Kartusche (SPE-Kartusche, SEP-PAK LIGHT QMA, Waters®) mit 5 ml 0,4 M $KHCO_3$-Lösung und anschließend 10 ml traceSELECT® Wasser konditioniert. In einem ersten Schritt wurde 1 GBq des [^{18}F]F$^-$ auf 2 ml mit traceSELECT® Wasser verdünnt und auf der QMA Kartusche fixiert. Um Reste von anderen Ionen zu entfernen, wurde mit 10 ml traceSELECT® Wasser gewaschen. Anschließend wurde das [^{18}F]F$^-$ von der Kartusche mit 1 ml 0,4 M $KHCO_3$-Lösung eluiert und dabei fraktioniert. Die erhaltenen 200 µl-Fraktionen wurden im Curiemeter gemessen und die 2-3 Fraktionen mit der höchsten Aktivität vereinigt. Die erhaltenen 400-600 µl wurden mit metallfreier Essigsäure auf pH 4 eingestellt und 10-20 µl einer 2 mM $AlCl_3$-Lösung (in 0,1 M NaOAc-Puffer pH 4) zugegeben. Die Menge des $AlCl_3$ richtet sich nach der später verwendeten Menge an Chelator und sollte equimolar eingesetzt werden. Anschließend wurde die Lösung für 20 Minuten bei 40° C

inkubiert und anschließend die Lösung mit 650 µl eines organischem Lösungsmittels versetzt (Ethanol oder Acetonitril).

Natrium-Acetat-Variante (analoge zu Boschi *et al.* [4]): Vor dem Einsetzen des $[^{18}F]F^-$ wurde eine QMA-Kartusche (SPE-Kartusche, SEP-PAK LIGHT QMA, Waters®) mit 5 ml 0,5 M NaOAc-Puffer pH 4,5 und anschließend 10 ml traceSELECT ® Wasser konditioniert. In einem ersten Schritt wurde 1 GBq des $[^{18}F]F^-$ auf 2 ml mit traceSELECT ® Wasser verdünnt und auf der QMA Kartusche fixiert. Um Reste von anderen Ionen zu entfernen, wurde mit 10 ml traceSELECT® Wasser gewaschen. Anschließend wurde das $[^{18}F]F^-$ von der Kartusche mit 1 ml 0,5 M NaOAc-Puffer pH 4,5 eluiert und dabei in 200 µl-Schritten fraktioniert. Die erhaltenen 200 µl Fraktionen wurden im Curiemeter gemessen und die 2-3 Fraktionen mit der höchsten Aktivität vereinigt. Zu den erhaltenen 400-600 µl wurden 10-20 µl einer 2 mM $AlCl_3$-Lösung (in 0,1 M NaOAc-Puffer pH 4) zugegeben. Die Menge des $AlCl_3$ richtet sich nach der später verwendeten Menge an Chelator und sollte equimolar eingesetzt werden. Anschließend wurde die Lösung für 20 Minuten bei 40° C inkubiert und nach Abschluss der Lösung mit 650 µl eines organischem Lösungsmittels versetzt (Ethanol oder Acetonitril).

Beide Varianten liefern das $[^{18}F]AlF^{2+}$ in 600 µl wässriger Lösung pH 4 - 4,5 und nach Zugabe des organischen Lösungsmittel in 50:50 wässrig zu organischem Lösungsmittel, welches als optimale Markierungsbedingung mit $[^{18}F]AlF^{2+}$ gilt. Bei Einsatz von 1 GBq erhält man nach Ausbildung des $[^{18}F]AlF^{2+}$ etwa 600 MBq für die Markierung. Für die erste Evaluation des $DATA^{5m}$ wurden Markierungen mit etwa 100 MBq vorgesehen. Dafür wurden die erhaltenen 1,3 ml auf 6 Vials aufgeteilt und mit dem entsprechenden Lösungsmittel auf 1 ml aufgefüllt. Für die Ausbildung des $[^{18}F]AlF^{2+}$ wurde $AlCl_3$ in äquimolaren Mengen zu dem in den 6 Markierungen zusammen eingesetzten Chelators verwendet. Als organische Lösungsmittel wurden Ethanol und Acetonitril getestet, da beide in der Literatur Anwendung finden. Es wurde auch ohne organischen Anteil getestet, was ebenfalls in einer Literatur zu Ausbeuten geführt hatte. Dementsprechend bestand die finale Markierungslösung aus 50% Ethanol/Acetonitril und 50% $KHCO_3$-/NaOAc-Lösung pH 4. Weiterhin wurde die Temperatur zwischen 23 °C und 95 °C variiert und nach 10 bzw. 20 Minuten eine Probe für die Radio-HPLC entnommen.

Markierung des DATA^{5m} mit [^{18}F]AlF^{2+}

Erste eigene Markierungen in Mainz mit [^{18}F]AlF^{2+}-Herstellung mit der Kaliumhydrogencarbonat-Variante, lieferten nahezu keine Ausbeuten. Die besten Markierungen ergaben maximal 20-30 % markierten Komplex nach 20 Minuten bei 95 °C. Raumtemperaturmarkierungen erreichten keine Ausbeuten von über 10%. Die Wahl des organischen Lösungsmittels schien keinen Einfluss auf die Markierung zu haben. Nach diesen relativ schlechten Ergebnissen wurden unter Rücksprache mit dem Kooperationspartner in New York die Experimente mit einigen Optimierungen wiederholt. Es wurden alle Lösungen auf traceSELECT® umgestellt und die $AlCl_3$-Lösung neu angesetzt. Außerdem wurde aus der Literatur eine zweite Herstellung für [^{18}F]AlF^{2+} benutzt, welche 0,5 M NaOAc-Puffer pH 4,5 verwendet. Mit den Optimierungen konnten beim Wiederholen der Experimente einige Markierungen Ausbeuten von bis zu 50% erreichen, was aber immer noch deutlich hinter den >80 % der ersten Markierung in New York liegt.

Während den zweiten Markierungen konnte festgestellt werden, dass direkt nach Reaktionsabbruch gemessene Markierungen deutlich höhere Ausbeuten erzielten als Markierungen, welche mit Zeitverzug gemessen wurden. Allgemein zeigten die gemessenen Radio-HPLC, dass je länger eine Probe nach Abbruch der Reaktion im Autosampler der Radio-HPLC gestanden hatte, die Ausbeuten um so kleiner wurden. Dies wurde versucht mit mehreren Radio-HPLC aus derselben Radiomarkierung ($KHCO_3$, Ethanol, 95 °C) zu simulieren und es wurde festgestellt, dass die Ausbeute nach Reaktionsabbruch mit der Zeit konstant abfällt. Dies wäre auch passend mit den Ergebnissen aus New York, da dort ein deutlich schnelleres und teilweise automatisiertes System zum Einsatz kam, welches die Radio-HPLC direkt nach Reaktionsabbruch misst.

Aus diesen Ergebnissen konnte der Rückschluss gezogen werden, dass der [^{18}F]AlF^{2+}-DATA^{5m}-Komplex nicht stabil ist. Der Komplex bildet sich unter den Markierungsbedingungen bei 95 °C fast quantitativ aus, zerfällt aber konstant wieder. Es kann davon ausgegangen werden, dass der Komplex sich in der Markierungslösung schneller ausbildet als er zerfällt, solange die entsprechende Temperatur und Chelatorkonzentration vorhanden ist. Nach Abbruch der Reaktion und Quenschen mit Wasser für die Injektion in die Radio-HPLC kann sich der Komplex nicht wieder neu bilden und der erhaltene [^{18}F]AlF^{2+}-DATA^{5m}-Komplex beginnt sich zu zersetzen. Dies kann man dann in einem kontanten Zerfall des Komplexes als immer niedriger werdende Ausbeute auf der Radio-HPLC beobachten. Diese in Mainz gemessenen Ergebnisse konnten von der Arbeitsgruppe von Prof. Lewis später bestätigt werden.

Optimierung des DATA^{5m}-Chelators

Neuere Entwicklungen, welche auf der ISRS 2017 vorgestellt wurden, zeigten Verbesserungen in der Markierung (Raumtemperatur) und höher Stabilitäten mit [^{18}F]AlF^{2+} durch eine leichte Variation des NOTA (1,4,7-Triazacyclononan-triessigsäure) Chelators zum NODA (1,4,7-Triazacyclononan-diessigsäure) [8]. Für die [^{18}F]AlF^{2+}-Markierung wurde bisher das NODAGA eingesetzt bzw. das nicht funktionalisiert NOTA, welche 6 Bindungsstellen mit N_3O_3 aufweisen. Der neue NODA Chelator bietet nur 5 Bindungsstallen mit N_3O_2, da eine der Essigsäure-Arme entfernt wurde bzw. zur Kopplung an Targetmoleküle geblockt ist (Abbildung 2).

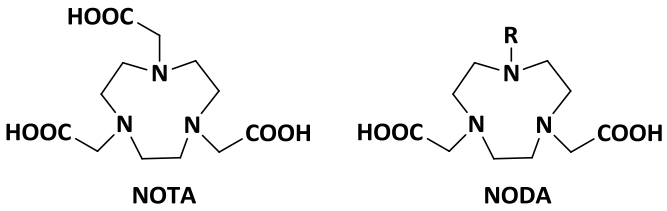


Abbildung 2: NOTA links und der neue NODA Chelator rechts

Die Ergebnisse des NODA legten nahe, dass auch bei dem DATA^{5m} nicht alle Essigsäure-Arme für die Komplexierung benötigt werden und das eine Verbesserung der Stabilität durch Entfernen eines Arms erreicht werden könnte. Um diese Vermutung zu testen, wurden zwei neue DATA-Derivate synthetisiert und mit [^{18}F]AlF^{2+} evaluiert. Die neue DATA-Derivate wurden ausgehend vom DATA^{5m} und DATA^{A4} synthetisiert und die neuen Chelatoren DADA^{5dm} und DADA^{A4m} erhalten (Abbildung 3).

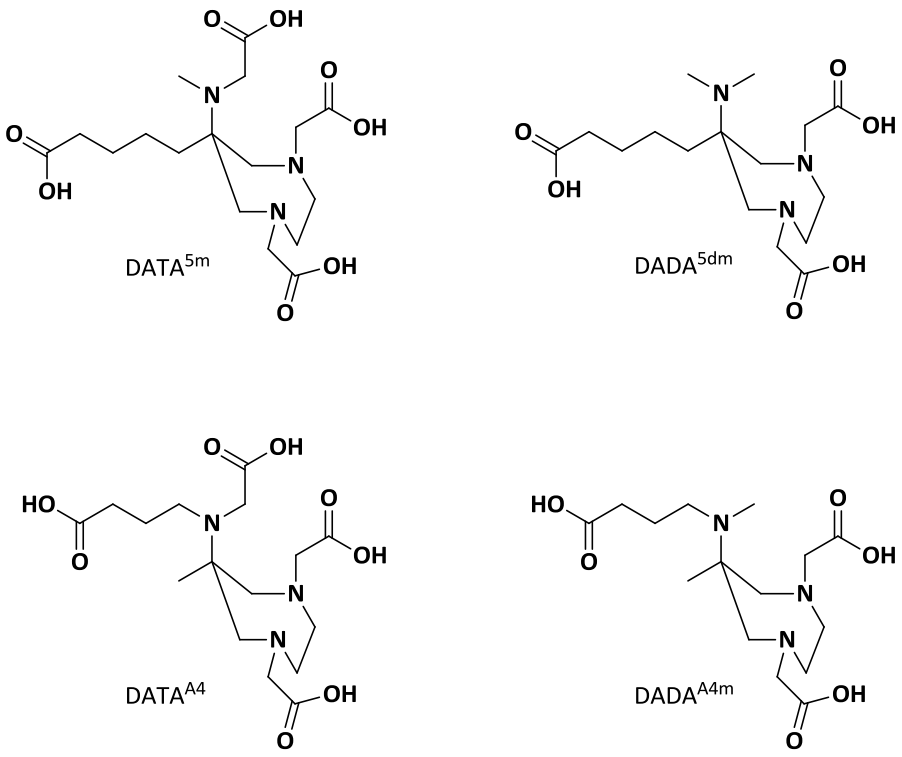


Abbildung 3: links DATA^{5m} und DATA^{A4} für die Markierung mit ^{68}Ga und rechts DADA^{5dm} und DADA^{A4m} für die Markierung mit [^{18}F]AlF^{2+}

Die neuen Chelatoren wurden analoge zu der bereits bekannten DATA^{5m}- und DATA^{A4}-Synthese aus der Arbeitsgruppe Rösch synthetisiert. Nach Entschützung der Essigsäure-Arme wurden beide Verbindungen mittels HPLC isoliert. Sie konnten in guten Ausbeuten erhalten werden. Für die Radiomarkierung wurde analog zu den für das DATA^{5m} durchgeführten Markierungen mit [^{18}F]AlF^{2+} vorgegangen. Über die $KHCO_3$-Aufarbeitung wurde das [^{18}F]F$^-$ zum [^{18}F]AlF^{2+} umgesetzt und mit dem erhaltenen [^{18}F]AlF^{2+} Markierungen mit Ethanol und Acetonitril bei Raumtemperatur und 95 °C durchgeführt.

Trotz Variation verschiedener Parameter konnte bei keiner Markierung eine Ausbeute festgestellt werden. Auch das Einsetzten von extrem hohen Precursoreinwaagen konnte nicht zur Ausbildung des gewünschten [^{18}F]AlF^{2+}-DATA^{5dm}- oder [^{18}F]AlF^{2+}-DADA^{A4m}-Komplexes führen. Im Gegensatz zum DATA^{5m}, wo die Komplexstabilität ein Problem darstellte, konnte gezeigt werden, dass beide neuen Chelatoren ungeeignet für die Markierung mit [^{18}F]AlF^{2+} sind. Damit lässt sich der positive Effekt, welcher beim NOTA zum NODA beobachtet wurde, nicht auf das DATA zum DADA übertragen. Hierbei ist das Entfernen des Essigsäure-Arms am exozyklischen Amin, wodurch die bessere Stabilität erreicht werden sollte, genau der Grund weswegen die DADA-Chelatoren keiner Markierung zeigen. An beiden Systemen wurde der Essigsäure-Arm am exozyklischen Amin durch

eine Methylgruppe ersetzt und damit der stertische Anspruch am exozyklischen Amin deutlich verringert. Wie in der Literatur zum DATA bereits gezeigt wurde, ist die Sterik an dem exozyklischen Amin sehr wichtig für die Konformation des Diazpinringes [9]. Eine zu hoher oder zu niedriger sterischer Anspruch an diesem Amin kann ein Umklappen des Diazepinringes wahrscheinlicher machen. Durch ein Umklappen des Ringes kann sich das exozyklische Amin nicht mehr an einer möglichen Komplexierung beteiligen und es steht nur die Ethylendiaminbrücke mit einer N_2O_2 Koordination zur Verfügung. Diese hat aber zu wenig Bindungsstellen und kann das $[^{18}F]AlF^{2+}$ nicht komplexieren. Nach den negativen Ergebnissen wurden weitere Variationen an dem DATA-Gerüst vorerst verworfen, aber eine Fixierung des Diazepinringes, genauer des exozyklischen Amins, in passender Position wäre eine Option den ursprünglich gewünschten Effekt einer höheren Stabilität umzusetzen.

Literatur 6.5

1. McBride WJ, Sharkey RM, Karacay H, et al. A Novel Method of ^{18}F Radiolabeling for PET. J Nucl Med. 2009;50(6):991-998.

2. Meyer JP, Houghton JL, Kozlowski P, et al. ^{18}F-Based Pretargeted PET Imaging Based on Bioorthogonal Diels-Alder Click Chemistry. Bioconjug Chem. 2016;27(2):298-301.

3. Cleeren F, Lecina J, Billaud EMF, et al. New Chelators for Low Temperature $Al^{18}F$-Labeling of Biomolecules. 2016:2-10.

4. Boschi S, Lee JT, Beykan S, et al. Synthesis and preclinical evaluation of an $Al^{18}F$ radiofluorinated GLU-UREA-LYS(AHX)-HBED-CC PSMA ligand. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2016;43(12):2122-2130.

5. Al-Momani E, Israel I, Samnick S. Validation of a $[Al^{18}F]$PSMA-11 preparation for clinical applications. Appl Radiat Isot. 2017;130(June):102-108.

6. Allott L, Da Pieve C, Turton DR, Smith G. A general $[^{18}F]AlF$ radiochemistry procedure on two automated synthesis platforms. React Chem Eng. 2017;2(1):68-74.

7. Poschenrieder A, Osl T, Schottelius M, et al. First ^{18}F-Labeled Pentixafor-Based Imaging Agent for PET Imaging of CXCR4 Expression In Vivo. Tomography. 2016;2(2):85-93.

8. Shetty D, Choi SY, Jeong JM, et al. Stable aluminium fluoride chelates with triazacyclononane derivatives proved by X-ray crystallography and ^{18}F-labeling study. Chem Commun. 2011;47(34):9732-9734.

9. Waldron BP, Parker D, Burchardt C, et al. Structure and stability of hexadentate complexes of ligands based on AAZTA for efficient PET labelling with gallium-68. Chem Commun (Camb). 2013;49:579-581.

6.6 Weiterführende *in vivo*-Evaluationen mit [^{225}Ac]Ac-DOTA^{ZOL}

In den Jahren 2016 und 2017 wurden von Pfannkuchen *et al. in vivo*-Tierversuche mit dem ^{225}Ac markierten DOTA^{ZOL} an gesunden, jungen Ratten durchgeführt, um die *in vivo*-Bioverteilung des [^{225}Ac]Ac-DOTA^{ZOL} zu evaluieren. Das DOTA^{ZOL} ist eine Weiterentwicklung der ursprünglichen Bisphosphonate, welche durch ihre gute Bindung an Hydroxyapatit eine hohe *in vivo*-Affinität zu Knochen aufweisen [1]. Allgemein werden Bisphosphonate zum Targeting von Knochenmetastasen eingesetzt, welche häufig als Konsequenz von Prostatakrebs oder Brustkrebs auftreten [1]. Das Zoledronat mit seinem Imidazolring erhöht die Affinität des Bisphosphonats und verbessert die Blutzirkulationszeit im Verhältnis zu den reinen Bisphosphonaten. DOTA^{ZOL} wurde bereits mit ^{68}Ga und ^{177}Lu evaluiert und zeigte eine Gute *in vivo*-Anreicherung am gesunden Knochen und an den Wachstumsfugen in den Gelenken von jungen Ratten [2].

Wie in Abschnitt 1.4 beschrieben, stellen α-Strahler eine mögliche Verbesserung für die Therapie gegenüber den bisher verwendeten β^--Strahlern dar, da diese eine deutlich höhere relative biologische Wirkungskraft (RBW) bei niedrigerer Reichweite ausüben können. ^{225}Ac weist mit 10 Tagen Halbwertszeit und einem reinen α-Zerfall optimale Bedingungen für die Therapie auf. Allerdings zerfällt das ^{225}Ac nicht direkt zu einem stabilen Kern, sondern hat mehrere Tochternuklide in einer relativ komplexen Zerfallsreihe. Die Hauptzerfallskette ist Teil der Neptunium-Reihe: $^{225}\mathrm{Ac} \xrightarrow{\alpha} {}^{221}\mathrm{Fr} \xrightarrow{\alpha} {}^{217}\mathrm{At} \xrightarrow{\alpha} {}^{213}\mathrm{Bi} \xrightarrow{\beta^-} {}^{213}\mathrm{Po} \xrightarrow{\alpha} {}^{209}\mathrm{Pb} \xrightarrow{\beta^-} {}^{209}\mathrm{Bi}$ [3]. In der Zerfallsreihe werden damit vier α-Teilchen und zwei β^--Teilchen freigesetzt. Es konnte bereits festgestellt werden, dass die beim Zerfall auf den Kern übertragenen Rückstoßenergie zu einem Bindungsbruch der dativen Bindungen und somit zu einer Freisetzung des Tochternuklids führt [4, 5]. Weiterhin ist das ^{221}Fr als Tochternuklid des ^{225}Ac ein Alkalimetall und mit einem Elektron in dem äußersten S-Orbital liegt es in Lösung als einfach positiv geladenes Ion vor. Für einfach positiv geladene Alkalimetalle eignet sich kein Chelator wie DOTA zur Komplexierung, da zu wenig mögliche Koordinationsstellen vorhanden sind. Auch wenn davon ausgegangen wird, dass ein Großteil der Tochternuklide am Target verbleiben, muss geklärt werden, wohin die Tochternuklide *in vivo* transportiert werden. Eine Akkumulation in anderen gesunden, insbesondere strahlensensitiven Organen wäre eine extreme Belastung für den Patienten und würde die Dosimetrie deutlich erhöhen. Eine rein renale Ausscheidung wäre optimal, aber auch eine Anreicherung in der Leber wäre möglich, wie es von ionischen ^{225}Ac bekannt ist [6, 7].

Die von Pfannkuchen *et al.* durchgeführten Tierversuche zeigten eine zu den Ergebnissen von Meckel *et al.* [2] vergleichbare Anreicherung an den Wachstumsfugen in den Gelenken. Weiterhin

konnte aber auch eine konstante Anreicherung in der Leber festgestellt werden, welche auf freies ^{225}Ac zurückgeführt wurde. Einzelne Messungen zum Verbleib der Tochternuklide zeigten eine renale Ausscheidung. Diese wurden aber nur für ^{213}Bi nach 10 Tagen durchgeführt. Damit bestand Bedarf an der Wiederholung einzelner Zeitpunkte und einer genaueren Messung der Tochternuklide.

Die Zielsetzung der neuen Tierversuche war eine erneute Bestimmung des 24 h-Wertes in 6 Tieren. Dabei sollten 3 Tiere das [^{225}Ac]Ac-DOTA^{ZOL} aus einer Markierung mit leicht erhöhter Markierungsvorläufermenge erhalten und 3 Tiere das [^{225}Ac]Ac-DOTA^{ZOL} aus einer Markierung analog zu Pfannkuchen *et al.* mit Coinjektion von DTPA. Die Ansätze sollten zeigen, ob bei den Markierungen von Pfannkuchen *et al.* freies ^{225}Ac coinjiziert wurde und für den Uptake in der Leber verantwortlich war. Weiterhin wurde die Messung der Organproben verändert: Diese erfolgt in einem WIZARD^2 Automatic Gamma Counter (PerkinElmer, Germany), der eine gammaspektroskopische Quantifizierung der Proben erlaubt, aufgrund seines Detektoraufbaus aber keine α-Emission nachweisen kann. Allgemein wäre eine Detektion der α-Zerfälle nicht geeignet zur Feststellung der Aktivität, da die extrem kurze Reichweite und Selbstabsorption in den Organen keine genaue Messung zulässt. Entsprechend wurden zwei Gammalinien, eine des ^{221}Fr (218 keV) und eine des ^{213}Bi (440 keV), zur Feststellung der Aktivität genutzt. Zur Messung der ^{225}Ac-Aktivität in einem Organ mittels dieser Linien muss jedoch bis zur Einstellung des Gleichgewichtes zwischen ^{225}Ac und seinen Töchtern ^{221}Fr und ^{213}Bi gewartet werden, weshalb die Messung der Organproben erst 24 h nach Entnahme erfolgte. Zur Feststellung des Verbleibs der Tochternuklide wurden die Organe zusätzlich direkt nach Entnahme gemessen. Dazu wurde die Entnahme der Organe schnell durchgeführt, alle Organe gemessen und dann erst mit der Untersuchung des nächsten Tieres angefangen. Die so erhaltenen Werte wurden auf den Todeszeitpunkt zerfallskorrigiert und dadurch die Aktivität an ^{221}Fr und ^{213}Bi in den Organen zum Todeszeitpunkt bestimmt. Besonders ^{221}Fr ist dabei von Interesse, da es eine sehr kurze Halbwertszeit von 5 Minuten hat und als direktes Zerfallsprodukt des ^{225}Ac Aufschluss über Ausspülen und Ausscheidung der Tochternuklide gibt.

Alphaspektroskopie und Radiomarkierung:

^{225}Ac und DOTA^{ZOL} wurden von ITG (Garching) zur Verfügung gestellt. Nach Erhalt des ^{225}Ac wurde die genaue Aktivität durch Alphaspektroskopie bestimmt. Durch Spülen mit 50 µl 0,1 M Salzsäure konnte die gesamte Aktivität aus dem Vial entfernt werden. In einer Verdünnungsreihe wurden 5 µl solange verdünnt, bis gemäß Spezifikation von ITG die Volumenaktivität in einem Bereich von 50-100 Bq ^{225}Ac in 10 µl lag. Diese 10 µl wurden auf eine Tantalplatte aufgebracht und für die Alphaspektroskopie eingedampft. Es konnte ein Wert von 0,15 MBq ^{225}Ac / 1 µl erhalten werden.

Für die Radiomarkierung wurden 1,1 MBq ^{225}Ac (7,3 µl) mit 200 µl 0,1 M Natriumascorbat pH 6 gemischt und 30 nmol (bzw. 40 nmol bei höherer Markierungsvorläufermenge) DOTA^{ZOL} zugegeben. Die Reaktion wurde für 30 Minuten in einem HLC BioTech (Germany) Heizschüttler auf 98 °C temperiert. Nach Abschluss der Reaktion wurde die Lösung mit 0,9 % steriler Kochsalzlösung auf 1 ml aufgefüllt,auf 4 Spritzen verteilt, das Vial nochmals mit 1 ml 0,9 % steriler Kochsalzlösung gespült und auf die 4 Spritzen verteilt, wodurch 4 Spritzen mit 250 KBq ^{225}Ac in 500 µl Injektionsvolumen erhalten wurden. Für die Herstellung des [^{225}Ac]Ac-DOTA^{ZOL} mit DTPA wurden nach erster Zugabe von 770 µl 0,9 % steriler Kochsalzlösung, 10 µl einer 5 mM DTPA-Lösung zugegeben und in einem Heizschüttler erneutfür 10 Minuten bei 35 °C temperiert. Danach wurde analog zum [^{225}Ac]Ac-DOTA^{ZOL} verfahren und die Aktivität auf 4 Spritzen aufgeteilt. Die befüllten Spritzen wurden in einem auf die ^{221}Fr und ^{213}Bi Linien kalibrierten Gammacounter vermessen und die genaue Aktivität festgestellt. Ein späteres Messen der leeren Spritzen und Zerfallskorrektur auf den Zeitpunkt der ersten Messung ergaben die effektiv injizierte Aktivität.

***In vivo*-Tierdaten:**

Es wurden junge, männliche Wister Ratten (gekauft von Janvier Labs) verwendet. Die Tiere wogen am Versuchstag zwischen 170 und 180 g und es wurde je Ratte 240 - 250 kBq [^{225}Ac]Ac-DOTA^{ZOL} injiziert. Der von Pfannkuchen *et al.* gefundene höhere Leberuptake mit einem SUV von 0,7 - 0,9 konnte sowohl durch die höhere Markierungsvorläufermenge als auch durch die Zugabe von DTPA unterdrückt werden (Tabelle 1). Zu erkennen ist, dass sich die Aufnahme in der Leber auf den selben Wert wie in der Niere halbiert hat und somit keine signifikant höhere Aufnahme mehr aufweist. Andere Organe zeigten keine Abweichungen in den SUVs.

Tabelle 1: Vergleich der Organaufnahme 24 h nach Injektion des [^{225}Ac]Ac-DOTA^{ZOL}: Links Pfannkuchen et al.; Mitte mit Zugabe von DTPA; Rechts bei höhere Markierungsvorläufermenge von 40 nmol. Angabe in SUV (±SD) über den Mittelwert aus 3-4 Tieren.

Organ	**[^{225}Ac]Ac-DOTA^{ZOL} 24 h p.i.**	**[^{225}Ac]Ac-DOTA^{ZOL} mit DTPA 24 h p.i.**	**[^{225}Ac]Ac-DOTA^{ZOL} mit 40 nmol 24 h p.i.**
Niere	0,32 (0,05)	0,31 (0,03)	0,25 (0,04)
Leber	0,73 0,09)	0,37 (0,06)	0,29 (0,08)
Femur gesamt	4,86 (0,36)	6,66 (0,61)	4,95 (0,77)

Ein weiterer in der Organaufnahme zu erkennender Trend ist die fast 30 % höhere Aufnahme im Femur bei der Zugabe von DTPA, mit einem durchschnittlichen SUV von 6,66 mit DTPA zu 4,86 bzw. 4,95 ohne DTPA. Dieser Anstieg in der Aufnahme ist besonders in Abbildung 1 mit der Auftragung der %ID/g für die beiden Oberschenkelknochen (Femur) zu erkennen.

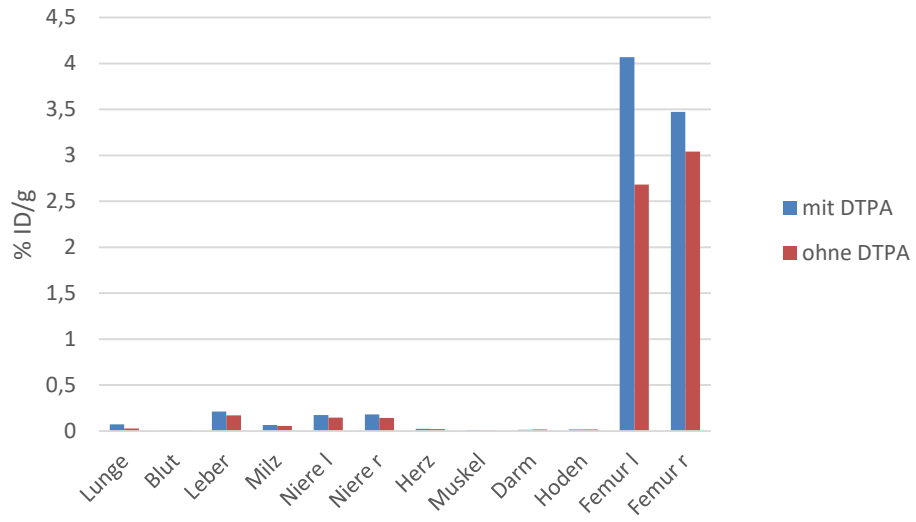


Abbildung 1: Organverteilung in %ID/g (% injizierte Aktivität / g Organ) für Zugabe von DTPA und ohne Zugabe von DTPA

Die Auswertung der Messungen direkt nach Organentnahme zeigten nach Zerfallskorrektur auf den Todeszeitpunkt, dass ^{221}Fr und ^{213}Bi über die Niere ausgeschieden werden (Tabelle 2). Hierbei entsteht das gefundene Wert für ^{221}Fr durch den Transport des ^{221}Fr vom Knochen über das Blut in die Niere und den Urin. Für das gefundene ^{213}Bi in der Niere und Urin gilt hingegen, dass es dort aus dem über die Niere ausgeschiedenen ^{221}Fr entstanden sein kann oder sich das ^{213}Bi selbst nach Bildung am Knochen aus ^{217}At in der Niere und im Urin angereichert hat. Es lässt sich anhand der Daten allerdings nicht verifizieren über welchen der beiden möglichen Wege das gefundene ^{213}Bi in Blase und Urin gelangt ist.

Zu beachten ist, dass nur bei Organen ohne signifikante ^{225}Ac-Aufnahme, wie der Niere, eine Zerfallskorrektur durchgeführt wurde. Dies ist durch die kurze Halbwertszeit des ^{221}Fr und ^{213}Bi im Verhältnis zu der sehr langen Halbwertszeit der Mutter ^{225}Ac begründbar. Die hohe Organaufnahme in der Niere ist durch Abtransport des ^{221}Fr (bzw. ^{213}Bi) vom Knochen in die Niere bedingt. Mit dem Todeszeitpunkt stoppt der Transport in die Niere und das dort vorhandene ^{221}Fr und ^{213}Bi beginnt zu zerfallen. Eine Zerfallskorrektur auf den Todeszeitpunkt gibt damit die wirkliche zum Todeszeitpunkt vorhandene Menge an ^{221}Fr an. Beim ^{213}Bi muss beachtet werden, dass eine beträchtliche Menge an

^{221}Fr vorhanden ist, welche das ^{213}Bi nachbildet, und somit eine einfache Zerfallskorrektur keine genaue Menge an ^{213}Bi liefern kann. Analog dazu befindet sich am Knochen eine signifikante Menge an ^{225}Ac, welche das ^{221}Fr und ^{213}Bi als Tochternuklide nachbildet. Beim Todeszeitpunkt fällt der Abtransport des ^{221}Fr (bzw. ^{213}Bi) weg, aber die Nachbildung des ^{221}Fr aus ^{225}Ac geht stetig weiter. Man kann den Knochen hierbei wie einen Generator betrachten, welcher bis zum Todeszeitpunkt konstant eluiert wird (Abtransport). Also steigen nach dem Todeszeitpunkt die ^{221}Fr- und ^{213}Bi-Aktivität wieder an, bis das Gleichgewicht zwischen der Mutter ^{225}Ac und seinen Töchtern hergestellt ist. Eine Zerfallskorrektur würde somit nicht die wirkliche Aktivität wiederspiegeln. Daher wäre es eigentlich sinnvoll die Nachbildung der Töchter aus dem ^{225}Ac zu berechnen, da zum Todeszeitpunkt weniger ^{221}Fr und ^{213}Bi am Knochen war als 10 Minuten danach gemessen werden kann, was aber ohne einen absoluten Wert an ^{225}Ac nicht möglich ist.

Tabelle 2: Organverteilung der selben Proben direkt nach Organentnahme (Femur unkorrigiert und restliche Organe zerfallskorrigiert auf Todeszeitpunkt) und im Gleichgewichtszustand nach 24 h. Nieren- und Urin-Werte hervorgehoben. Angabe der Werte in SUV (n = 3).

	Messung zum Todeszeitpunkt		**Messung im 24h Gleichgewicht**	
Organ	^{221}Fr	^{213}Bi	^{221}Fr	^{213}Bi
Urin	**19,99**	**2,56**	**0,11**	**0,12**
Lunge	1,14	0,37	0,09	0,08
Blut	0,59	0,21	0,01	0,01
Leber	1,58	0,48	0,32	0,35
Milz	0,83	0,22	0,10	0,11
Niere l	**11,69**	**1,91**	**0,27**	**0,29**
Niere r	**11,65**	**1,84**	**0,27**	**0,29**
Herz	0,75	0,17	0,04	0,04
Muskel	0,16	0,04	0,01	0,01
Darm	1,38	0,22	0,02	0,03
Hoden	0,22	0,06	0,03	0,03
Femur l	**3,86**	**5,54**	**5,62**	**6,20**
Femur r	**3,72**	**5,34**	**5,36**	**6,03**
Femur total	**3,79**	**5,44**	**5,49**	**6,12**

Wenn man das ^{225}Ac mit 10 Tagen Halbwertszeit als Mutternuklid des ^{213}Bi mit 45 Minuten Halbwertszeit in einem Generator betrachtet, stellt sich das Gleichgewicht mit dem ^{213}Bi erst langsam, basierend auf der Halbwertszeit des ^{213}Bi, ein. Damit kann an den unkorrigierten Knochenwerten des ^{213}Bi, welche 10 Minuten nach Entnahme gemessen wurden, im Verhältnis zu den Knochenwerten im Gleichgewicht nach 24 Stunden der prozentuale Abtransport abgeschätzt

werden. Dafür wurde die ^{225}Ac-Aktivität nach 24 Stunden im Gleichgewicht auf den Todeszeitpunkt mit der Halbwertszeit des ^{225}Ac zerfallskorrigiert. Der erhaltene Wert gibt die Aktivität an ^{221}Fr und ^{213}Bi wieder, welche am Knochen hätten vorhanden sein müssen ohne Verlust durch Abtransport und renale Ausscheidung. Der direkt nach Todeszeitpunkt gemessene Wert hingegen gibt die Restaktivität nach dem konstanten Abtransport wieder. Direkt nach Todeszeitpunkt findet man einen ^{213}Bi-Wert von 3,11 %ID/g im Femur und im Vergleich mit dem auf den Todeszeitpunkt korrigierten 24 Stunden-Gleichgewichtswert von 3,76 %ID/g im Femur erhält man, dass 83 % des zu erwartenden ^{213}Bi zum Todeszeitpunkt am Knochen gefunden wurde. Damit sind etwa 17 % der ^{213}Bi-Aktivität über die Niere ausgeschieden worden. Ob die weiteren Töchter ^{213}Po, ^{209}Pb und ^{209}Bi am Knochen verbleiben, kann nicht festgestellt werden. Eine analoge Rechnung für das ^{221}Fr ist nicht möglich, da bei 5 Minuten Halbwertszeit das Gleichgewicht zwischen ^{225}Ac und ^{221}Fr sich deutlich schneller wieder einstellt als beim ^{213}Bi und damit keine sinnvollen Werte erhalten werden können.

Zusammengefasst kann eine reine renale Ausscheidung des ^{221}Fr und ^{213}Bi festgestellt werden. Von der am Knochen vorhandenen Aktivität sind nach drei Zerfällen zum ^{213}Bi etwa 17 % der Aktivität abtransportiert worden. Es kann davon ausgegangen werden, dass größtenteils ^{221}Fr abtransportiert wird, aber ein Abtransport des ^{213}Bi ist nicht ausgeschlossen.

Ergebnis:

Die erneuten Tierversuche konnten Aufschluss über die gewünschten Fragestellungen liefern und zeigen, dass die erhöhte Leberaufnahme bei Pfannkuchen *et al.* auf die nicht vollständige Komplexierung des ^{225}Ac zurückzuführen war. Höher Markierungsvorläufereinwaagen verhindern die Injektion von freiem ^{225}Ac und somit eine ungewollte Anreicherung in der Leber. Zusätzlich wird durch die Coinjektion von DTPA ein Großteil des eventuell mitinjizierten freien ^{225}Ac in den ^{225}Ac-DTPA-Komplex überführt, welcher zügig über die Niere ausgeschieden wird. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die Koinjektion von DTPA zu einer bis zu 30 % erhöhten Femur-Aufnahme führen kann. Damit ist die Koinjektion von DTPA auf zwei Arten von Vorteil, was bei zukünftigen Applikationen von ^{225}Ac Radiopharmaka berücksichtigt werden sollte.

Die erweiterten Messungen direkt nach Organentnahme konnten guten Aufschluss über den Verbleib der Tochternuklide *in vivo* geben. Es konnte gezeigt werden, dass ^{221}Fr und ^{213}Bi eine rein renale Ausscheidung aufweisen. Weiterhin wurde festgestellt, dass etwa 17 % des ^{221}Fr und ^{213}Bi vom Knochen abwandert und über das Blut in die Niere und darüber in den Urin transportiert wird.

Literatur 6.6

1. Rubens RD. Bone metastases--the clinical problem. Eur J Cancer. 1998;34(2):210-213.

2. Meckel M, Bergmann R, Miederer M, Roesch F. Bone targeting compounds for radiotherapy and imaging: *Me(III)-DOTA conjugates of bisphosphonic acid, pamidronic acid and zoledronic acid. EJNMMI Radiopharm Chem. 2017;1(1):14.

3. Lieser KH. Karl Heinrich Lieser: Einführung in Die Kernchemie.; 1991.

4. Miederer M, Mcdevitt MR, Sgouros G, et al. Pharmacokinetics, Dosimetry, and Toxicity of the Targetable Atomic Generator, ^{225}Ac-HuM195, in Nonhuman Primates. J Nucl Med. 2004;45:129-137.

5. McDevitt MR, Scheinberg DA. Ac-225 and her daughters: The many faces of Shiva. Cell Death Differ. 2002;9(6):593-594.

6. Beyer GJ, Offord R, Kunzi G, et al. The influence os EDTMP-concentration on the biodistribution of radio-lanthanides and 225-Ac in tumour bearing mice. Eur Organ Nucl Res. 1997;(July 1997).

7. Davis I a., Glowienka K a., Boll R a., et al. Comparison of 225actinium chelates: Tissue distribution and radiotoxicity. Nucl Med Biol. 1999;26(5):581-589.

7.0 Zusammenfassung und Ausblick

Hauptabschnitt 1: DATA^{5m}

Die PET gewinnt als bildgebendes Verfahren in der Nuklearmedizin stetig an Wichtigkeit. Das gegenwärtig wichtigste PET-Generator-Nuklid ^{68}Ga ($t_{1/2}$=67,7 min, $E_{\beta,max}$=1,89 MeV) erfordert als dreiwertiges Metall Chelatoren zur Bindung an mögliche Targetmoleküle [1, 2]. Hierbei ist eine hohe Komplexstabilität mit dem Metall eine grundlegende Voraussetzung für einen möglichen Chelator und eine einfache und milde Markierungschemie vorteilhaft für die klinische Anwendung. Der DATA^{5m}-Chelator zeigte bereits seine ausgezeichneten Markierungseigenschaften und seine hohe Stabilität mit ^{68}Ga [3]. Auch das erste DATA^{5m}-Radiopharmakon, DATA^{5m}-TOC, wies dieselben ausgezeichneten radiochemischen Eigenschaften auf [4]. Mit diesen optimalen Voraussetzungen war die biologische Evaluation des [^{68}Ga]Ga-DATA^{5m}-TOC und die Herstellung und Evaluation von weiteren [^{68}Ga]Ga-DATA^{5m}-Radipharmaka von hohem Interesse. Im Rahmen dieses Abschnittes wurde DATA^{5m}-TOC in biologischen Studien auf seine *in vitro* und *in vivo*-Eigenschaften untersucht. Abschließend konnte DATA^{5m}-TOC auch in humanen Studien evaluiert werden. Weiterhin wurde das neue DATA^{5m}-PSMA radiochemisch evaluiert und in ersten *in vitro*-Studien bezüglich seiner Affinität und Internalisierung untersucht und mit den bereits bekannten Verbindungen PSMA-11 und PSMA-617 verglichen.

[^{nat}Ga]Ga DATA^{5m}-TOC *in vitro*-Studien

Anhand des [^{nat}Ga]Ga-DATA-TOC-Komplexes konnte in Affinitätsstudien an HEK293-h$SST_{2/3/5}$ Zellmembranen die Affinität zum humanen Somatostatin-Rezeptor (hsstr) 2, 3 und 5 untersucht und im selben Assay mit [^{nat}Ga]Ga-DOTA-TOC verglichen werden. Die erhaltenen IC_{50}-Werte zum hsstr 2, dem auf neuroendokrinen Tumoren am stärksten überexpremierten Rezeptor, zeigen, dass [^{nat}Ga]Ga-DATA-TOC mit 1,03 nM in eine ähnliche hohe Affinität wie [^{nat}Ga]Ga-DOTA-TOC mit 0,21 nM aufweist (Abbildung 1).

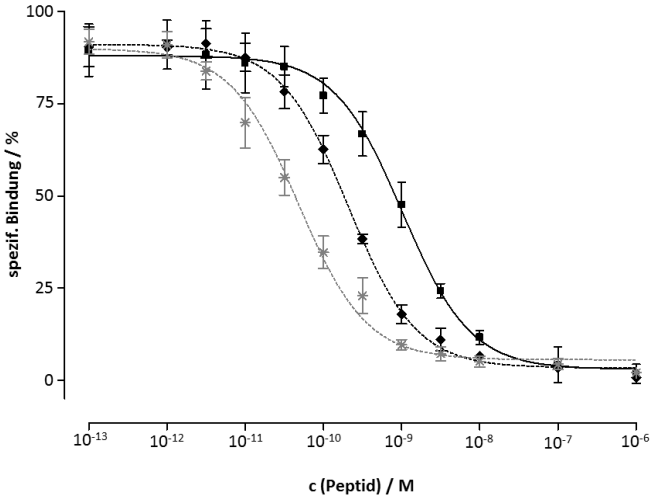


Abbildung 1: Verdrängungskurven zur IC_{50}-Bestimmung gegen $hsst_2$-Rezeptoren in HEK293-Zellmembranen: [^{nat}Ga]Ga-DATA-TOC: ■, IC_{50}=1,03±0,08 nM; [^{nat}Ga]Ga-DOTA-TOC: ◆, IC_{50}=0,21 ±0,01 nM; [LTT]SS28: ✳,IC_{50}=0,09±0,01 nM.

[^{68}Ga]Ga-DATA^{5m}-TOC *in vivo*-Tierstudien

In ersten präklinischen *in vivo*- und *ex* vivo-Tierstudien mit [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC an tumortragenden Mäusen (MPC-mCherry, NMRI nu/nu) wurden in direktem Vergleich zum [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC die Anreicherung im Tumorgewebe und der Exkretionsweg untersucht. In Blocking-Experimenten mit [NaI^3]Octreotid wurde die Spezifität des [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC zum Tumorgewebe untersucht (Abbildung 2).

Sowohl in den PET-Aufnahmen als auch in den *ex vivo*-Bioverteilungen wiesen beide Verbindungen eine Anreicherung im Zielgewebe des Tumors und eine reine renale Exkretion auf. Die Anreicherung im Tumorgewebe konnte durch Koinjektion von [NaI^3]Octreotid deutlich verringert werden und somit die Spezifität beider Derivate bestätigen. Weiterhin zeigte die *ex vivo*-Bioverteilung ein vergleichbares Verhältnis von Tumor-zu-Blut und Tumor-zu-Muskel, was bei beiden Derivaten einen guten Kontrast ermöglicht (Abbildung 3).

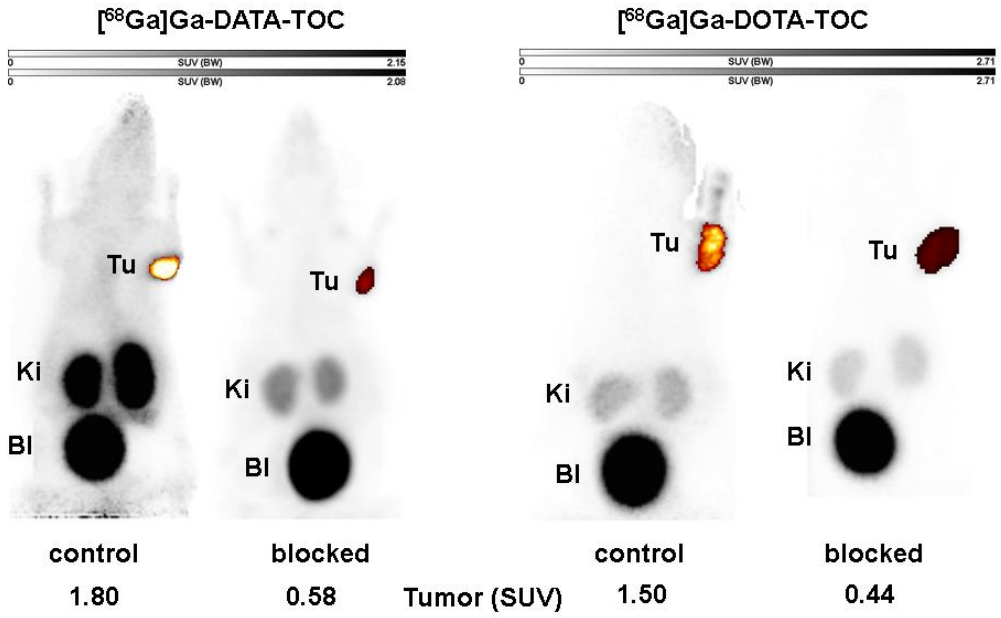


Abbildung 2: Projektionen der maximalen Intensität von PET-Aufnahmen des [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC (links) und [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC (rechts) 90 min p.i., zum Blocken wurden beide Verbindungen mit 100 µg [Nal^{3}]Octreotid koinjiziert; Tu: Tumor, Ki: Nieren, Bl: Blase.

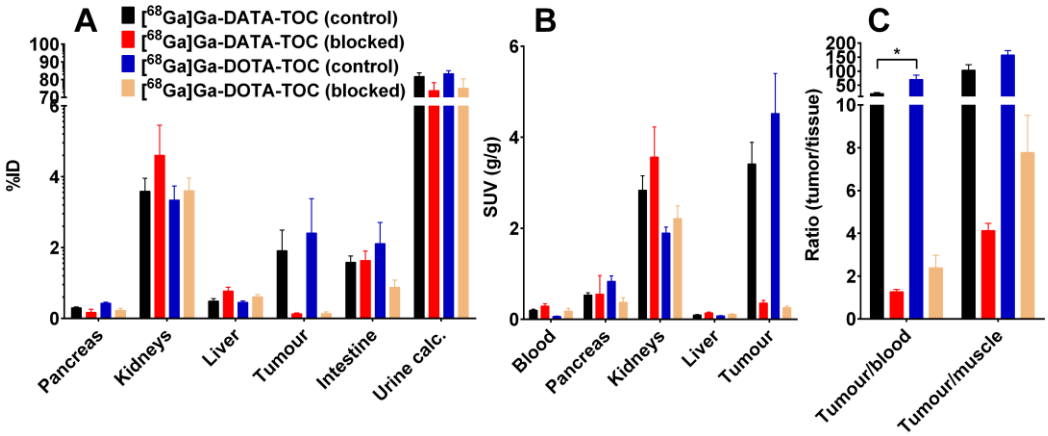


Abbildung 3: Bioverteilung von [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC und [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC in ausgewählten Organen, 60 min p.i. in MPC-mCherry NMRI-nude tumortragende Mäusen (Blocking mit 100 ug/Maus [Nal^{3}]Octreotid): **A** Prozent injizierte Aktivität (%ID); **B** SUV in g/g; **C** Tumor zu Gewebe Verhältnisse (SUV/SUV).

[^{68}Ga]Ga-DATA^{5m}-TOC *in vivo*-Humanstudien

Im Rahmen einer ersten klinischen Studie konnte das [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC in einem 46-jährigen Patienten mit differenzierbaren neuroendokrinen Tumoren im Pankreas in direktem Vergleich zum [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC evaluiert werden (Abbildung 4). Allgemein konnte eine geringere Aufnahme im Tumorgewebe für [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC gefunden werden (SUV([^{68}Ga]Ga-DATA-TOC)=46,9; SUV([^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC)=71,1). Dennoch konnte ein besserer Kontrast für [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC in den Bildern erhalten werden, da die Aufnahme in der benachbarten Leber im Vergleich deutlich geringer ausfällt. Damit lässt sich der Pankreas-Tumor besser von den umliegenden Organen differenzieren. Diese Daten konnten in einer aktuellen Patienten Studie, welche 19 Patienten beinhaltet, bestätigt werden (Tabelle 1).

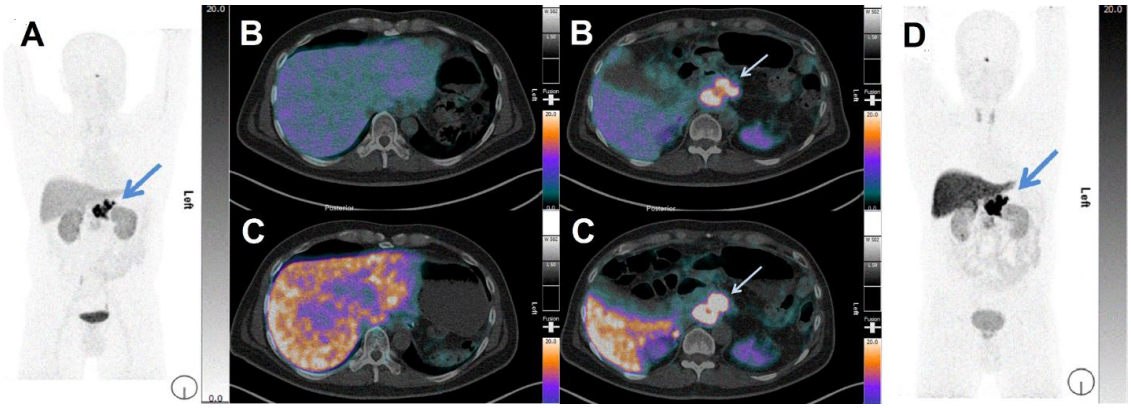


Abbildung 4: [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC PET/CT Aufnahme – (**A**) PET MIP, (**B**) transverse PET/CT Fusion. [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC PET/CT Aufnahme – (**C**) transverse PET/CT Fusion, (**D**) PET MIP. Pfeile weisen auf die hohe Aufnahme im primären NET im Pankreas.

Tabelle 1: Tumour-zu-Hintergrund Verhältnis der SUV_{max} der Lebermetastasen zum SUV des Hintergrundgewebes (HG) von [^{68}Ga]Ga-DATA-TOC und [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC über N = 12 Patienten

Verhältnis		SUV_{max}:HG	SUV_{mean}:HG
DATA^{5m}-TOC	Mean	2.87	2.07
	SD	0.64	0.62
DOTA-TOC	Mean	2.58	1.97
	SD	1.28	1.07
Verhältnis DATA^{5m}-TOC / DOTA-TOC		111.4%	105.1%

[^{68}Ga]Ga-DATA^{5m}-PSMA: radiochemische Evaluation

Markierungen des DATA^{5m}-PSMA mit ^{68}Ga zeigten, dass wie beim DATA^{5m}-TOC die ausgezeichneten Markierungseigenschaften des freien Chelators DATA^{5m} auf ein weiteres DATA^{5m}-Derivat übertragbar waren. Neben den schnellen Markierungskinetiken mit quantitativen Ausbeuten erwies sich der [^{68}Ga]Ga-DATA^{5m}-PSMA-Komplex als äußerst stabil gegenüber allen getesteten Medien, besonders Humanserum und PBS-Puffer.

[$^{nat/68}$Ga]Ga-DATA^{5m}-PSMA *in vitro*-Studien

In den *in vitro*-Bindungsstudien konnte das [^{nat}Ga]Ga-DATA^{5m}-PSMA mit 68,9 ± 1,13 nM eine Affinität im nanomolaren Bereich zum PSMA zeigen, welche dennoch eine Größenordnung über dem Literaturwert des [^{nat}Ga]Ga-PSMA-617 mit 6,4 ±1,02 nM liegt [5]. Die Internalisierungsstudien zeigten eine sehr hohe Internalisierung des [^{68}Ga]Ga-DATA^{5m}-PSMA im Verhältnis zu beiden parallel getesteten PSMA-617-Derivaten (Abbildung 5). Es konnte auch eine signifikante Internalisierung bei 4 °C beobachtetet werden. Diese konnte als spezifisch Aufnahme identifiziert werden, da Blocken mit 2-PMPA diese komplett unterdrückte.

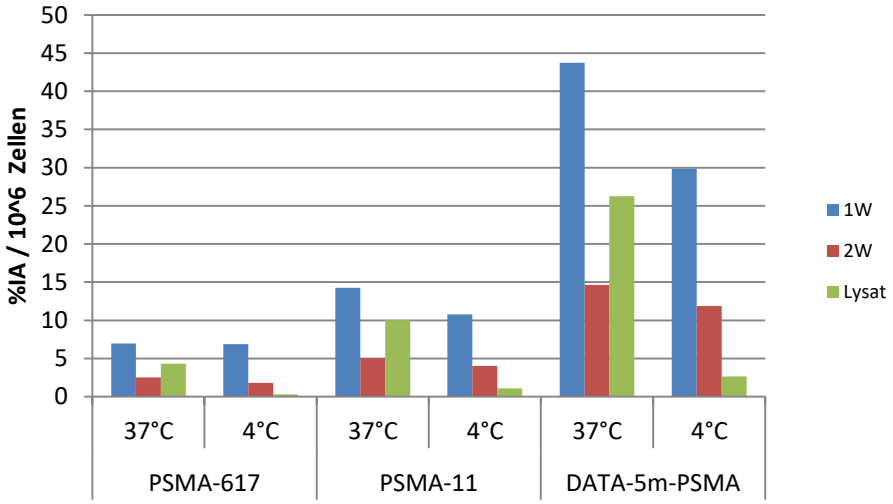


Abbildung 5: Internalisierung von [^{68}Ga]Ga- PSMA-617, [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 und [^{68}Ga]Ga-DATA^{5m}-PSMA auf LNCaP Zellen in %IA / 10^6 Zellen (% eingesetzte Aktivität in 10^6 gefunden)

Hauptabschnitt 2: AAZTA^5

Radiochemische Evaluation von AAZTA^5, AAZTA^5-TOC und AAZTA^5-PSMA mit ^{68}Ga, ^{44}Sc, ^{177}Lu und *in vitro*-Studien mit [$^{nat/68}$Ga]Ga-, [$^{nat/44}$Sc]Sc-, [$^{nat/177}$Lu]Lu-AAZTA^5-PSMA

In den letzten Jahrzehnten hat sich die Anwendung der Nuklearmedizin von der reinen Diagnostik und Visualisierung von Krankheiten stark weiterentwickelt zur Anwendung in der Therapie [6]. Diese erfolgt mit Therapienukliden, wie ^{177}Lu oder ^{90}Y, und ermöglicht eine nicht invasive Behandlung von Krebserkrankungen [7, 8]. Ein durch diesen Trend entstandenes Feld der Nuklearmedizin ist die Theranostik (oder engl. theranostic [10]). welches die direkte Verbindung von Diagnostik mit der Therapie darstellt. Das Ziel ist hierbei beide, Anwendungen mit demselben Radiopharmakon durch den einfachen Wechsel des Radionuklides zu ermöglichen. Die größte Herausforderung liegt darin, passende Chelatoren zu finden, um sowohl diagnostische Nuklide wie ^{68}Ga oder ^{44}Sc als auch Therapienuklide wie ^{177}Lu, ^{90}Y oder ^{47}Sc stabil zu komplexieren. Zusätzlich ist durch neue Targetmoleküle, welche immer komplexer werden (z.B. Antikörper), die Möglichkeit zur milden Markierung immer wichtiger.

Im ersten Teils dieses Abschnittes wurde das AAZTA^5, ein Chelator zur milden Komplexierung von ^{68}Ga, ^{44}Sc und ^{177}Lu, und seine TOC- und PSMA-Derivate radiochemisch evaluiert und auf ihre Komplexstabilität mit allen drei Nukliden getestet. Weiterhin wurden die AAZTA^5-PSMA-Komplexe mit $^{nat/68}$Ga, $^{nat/44}$Sc und $^{nat/177}$Lu in einem *in vitro*-Bindungsassay auf ihre Bindungsaffinität zu PSMA-positiven LNCaP Zellen getestet und die Internalisierung in diese Zellen untersucht.

Radiochemische Evaluation und Komplexstabilität

AAZTA^5, AAZTA^5-TOC und AAZTA^5-PSMA konnten mit allen drei Radiometallen quantitative Ausbeuten von >99 % bei Raumtemperatur in weniger als 5 Minuten erreichen. Dabei konnten für alle Nuklide und Derivate sehr kleine Precursormengen verwendet werden. Weiterhin zeigten die Markierungen, dass auch bei höheren pH-Werten nahe dem physiologischen pH immer noch eine schnelle und quantitative Komplexierung aller drei Nuklide mit allen Derivaten möglich war. Damit weisen das AAZTA^5 und seine Derivate optimale Markierungseigenschaften für alle getestete Nuklide auf. Die Komplexstabilität wurde gegen Humanserum, PBS-Puffer und EDTA/DTPA in PBS-Puffer gemessen. Besonders die ^{44}Sc-Komplexe aller Derivate stellten sich als sehr stabil über bis zu 24

Stunden heraus. Die Stabilität der ^{177}Lu-Komplexe war etwas geringer als die der ^{44}Sc-Komplexe im Verhältnis zu der Halbwertszeit des ^{177}Lu. Während alle ^{177}Lu-Komplexe über 24 Stunden stabil waren, kam es bei allen Derivaten zu einer leichten Degradierung der ^{177}Lu-Komplexe nach mehreren Tagen. Der ^{68}Ga-Komplex des AAZTA^5 war, wie bereits in der Literatur beschrieben, nicht vollständig stabil über die gewünschten 2-3 Stunden. Bei den ^{68}Ga-Komplexen der Derivate des AAZTA^5, dem AAZTA^5-TOC und AAZTA^5-PSMA, konnte hingegen eine hohe bis vollständige Stabilität über 2-3 Stunden gefunden werden. Damit wurde festgestellt, dass das Konjugieren eines Targetmoleküls an den Chelator einen positiven Effekt auf die Stabilität des ^{68}Ga-Komplexes ausübt.

In vitro-Bindungsaffinität- und Internalisierungs-Studien des AAZTA^5-PSMA

Die Komplexe des AAZTA^5-PSMA mit ^{nat}Ga, ^{nat}Sc und ^{nat}Lu wurden in einem etablierten Assay auf ihre Bindungsaffinität zu PSMA-positiven LNCaP-Zellen getestet und mit den literaturbekannten Komplexen des PSMA-617 mit ^{nat}Ga, ^{nat}Sc und ^{nat}Lu verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass das [^{nat}Ga]Ga-AAZTA^5-PSMA (K_i = 8,69 ± 0,95 nM) eine vergleichbare Affinität im selben nanomolaren Bereich wie [^{nat}Ga]Ga-PSMA-617 (K_i = 6,4 ± 1,02 nM) aufweist (Tabelle 2). Auch die [^{nat}Sc]Sc-AAZTA^5-PSMA und [^{nat}Lu]Lu-AAZTA^5-PSMA Komplexe wiesen eine Affinität im niedrigen nanomolaren Bereich von 30,57 ± 11,53 nM und 26,56 ± 11,14 nM, respektive, auf. Allgemein zeigen die Komplexe des AAZTA^5-PSMA eine niedrig nanomolare Affinität, welche nahe an der der Referenzverbindung liegt.

Tabelle 2: Inhibitorische Konstanten (K_i in nM) für [^{nat}Ga]Ga-, [^{nat}Sc]Sc-, [^{nat}Lu]Lu-PSMA-617 und -AAZTA^5-PSMA; Internalisierungswerte (IA = Injizierte Aktivität) von [^{68}Ga]Ga-PSMA-11, [^{68}Ga]Ga-, [^{44}Sc]Sc-, [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 und -AAZTA^5-PSMA.

derivative	**Ki ± SD / nM**		**Internalisation ± SD / %IA/10^6 cells**	
[$^{nat/68}$Ga]Ga-PSMA-11	12.0 ± 2.80	[23]	9.47 ± 2.56	[6]
[$^{nat/68}$Ga]Ga-PSMA-617	6.40 ± 1.02	[6]	17.67 ± 4.35	[6]
[$^{nat/68}$Ga]Ga-AAZTA^5-PSMA	8.69 ± 0.95		13.02 ± 0.24	
[$^{nat/44}$Sc]Sc-PSMA-617	4.72 ± 0,78	[9]	15.78 ± 2.14	[9[
[$^{nat/44}$Sc]Sc-AAZTA^5-PSMA	30.57 ± 11.53		19.96 ± 0.88	
[$^{nat/177}$Lu]Lu-PSMA-617	6.91 ± 1.32	[6]	17.51 ± 3.1	[6]
[$^{nat/177}$Lu]Lu-AAZTA^5-PSMA	26.56 ± 11.14		17.96 ± 2.0	

Für die Internalisierung der ^{68}Ga-, ^{44}Sc- und ^{177}Lu-Komplexe des AAZTA^{5}-PSMA konnte eine sehr hohe PSMA-spezifische Internalisierung in LNCaP-Zellen festgestellt werden. Die erhaltenen Werte sind vergleichbar mit denen Literaturwerten des PSMA-617 für die Internalisierung bei 37 °C. Die bei 4 °C erhaltenen Werte sind deutlich höher als bei den PSMA-617 Komplexen (Abbildung 6). Durch Experimente an PSMA-negativen PC-3-Zellen konnte aber gezeigt werden, dass es sich nicht um eine unspezifische Aufnahme handelt, wie auch schon das Blocken mit 2-PMPA gezeigt hatte. Allgemein zeigen alle drei AAZTA^{5}-PSMA Komplexe eine sehr hohe Internalisierung und sind damit in Verbindung mit den hohen Affinitäten vielversprechende Kandidaten für eine *in vivo*-Evaluation.

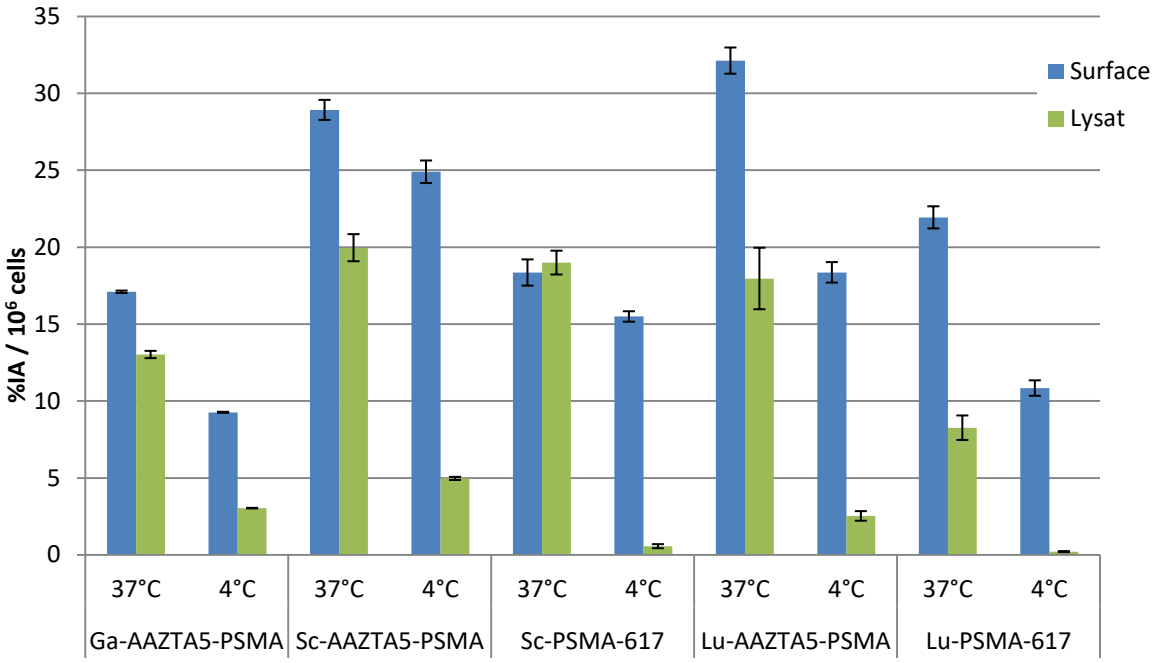


Abbildung 6: Internalisierungsdaten der ^{68}Ga-, ^{44}Sc- and ^{177}Lu-Komplexe des AAZTA^{5}-PSMA und PSMA-617 in LNCaP-Zellen.

***In vivo* Proof of Prinziple Tierversuche mit [^{44}Sc]Sc-AAZTA^{5}-PSMA**

Erste Tierversuche mit dem [^{44}Sc]Sc-AAZTA^{5}-PSMA konnten die guten Ergebnisse der *in vitro*-Studien bestätigen. Ein aus PSMA-positiven LNCaP-Zellen gebildeter Tumor konnte in einem Mausmodell durch das [^{44}Sc]Sc-AAZTA^{5}-PSMA in PET-Aufnahmen gut visualisiert werden. Weiterhin konnte die Tumoraufnahme mit 2-PMPA erfolgreich geblockt und damit die Spezifität bestätigt werden (Abbildung 7).

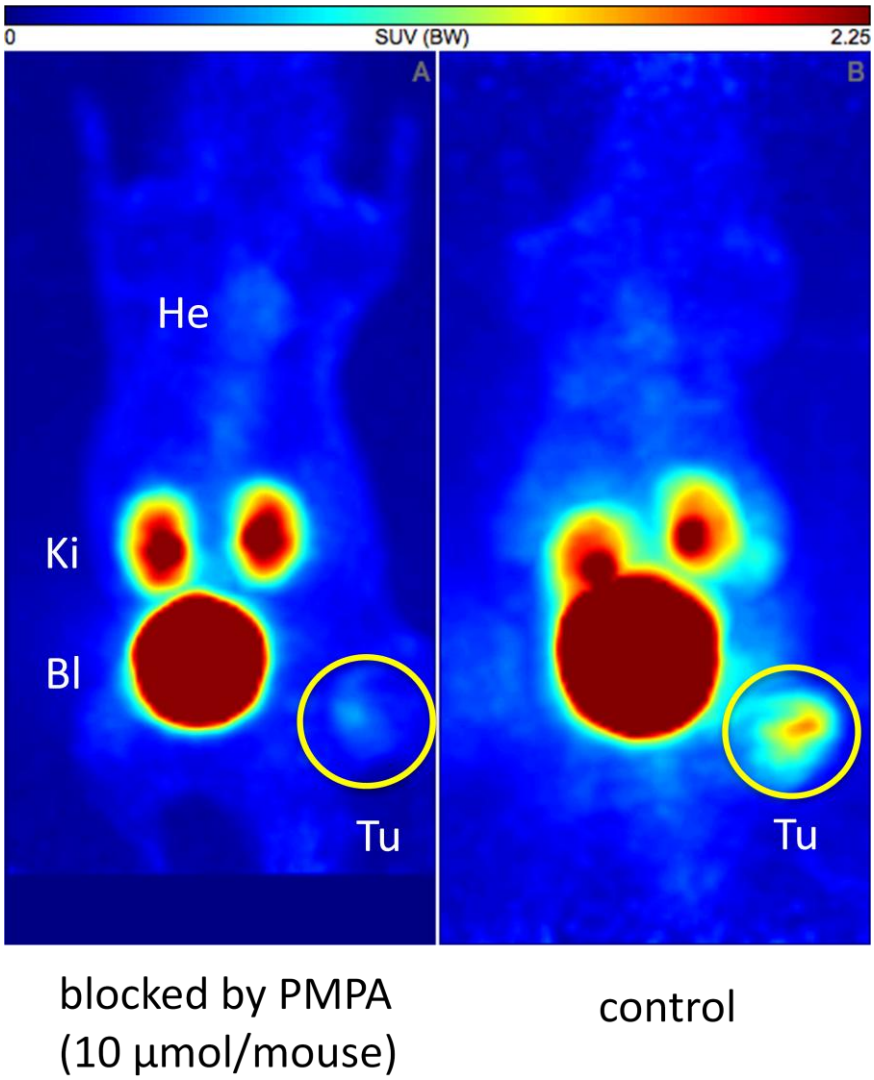


Abbildung 7: [^{44}Sc]Sc AAZTA^{5}-PSMA 90 min p. i.; links Tier mit Blocking durch 2-PMPA und rechts Kontrolltier mit gut sichtbarem Tumor (Tu). Weiter markierte Organe: Herz = He, Niere = Ki, Blase = Bl.

Radiomarkierung bifunktioneller AAZTA-Derivate mit ^{177}Lu für die Kopplung an Targetingvektoren unter milden Bedingungen

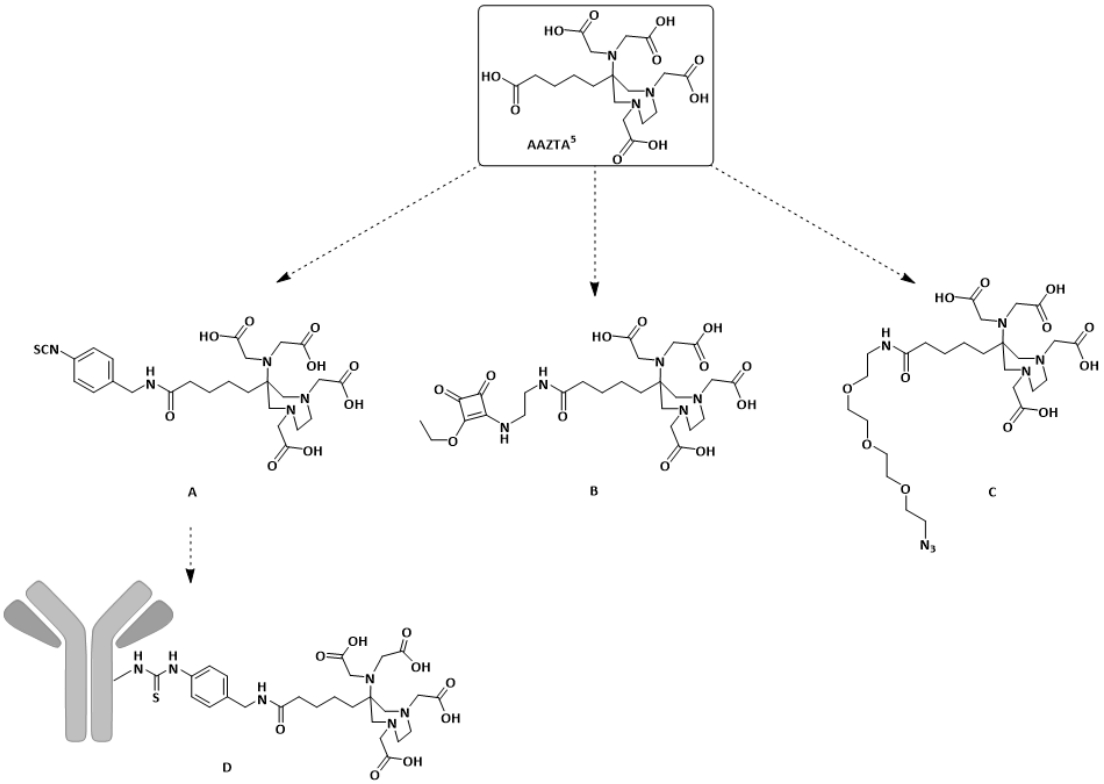


Abbildung 8: Struktur des AAZTA^5 und dessen Derivate: AAZTA^5-Bz-NCS (**A**), AAZTA^5-en-QS (**B**), AAZTA^5-TEG-N_3 (**C**) und AAZTA^5-Bz-NCS-mAb (**D**).

Die zu Beginn des zweiten Hauptabschnitts beschriebenen hervorragenden Radiomarkierungseigenschaften der verschiedenen AAZTA^5-Derivate und deren gute Stabilität mit ^{177}Lu machten eine Anwendung dieses Chelators für die milde Markierung von Antikörpern erstrebenswert. Für die Kopplung eines Chelators an einen Antikörper gelten dieselben Anforderungen wie für die Radiomarkierung in Form von milden Bedingungen, d.h. < 37 °C und pH 7. Entsprechend wurden drei, bereits für Antikörper angewendete Kopplungsstrategien, ausgewählt: Kopplung über einen NCS-Ester, pH-abhängige Kopplung über Quadratsäure und eine Click-Reaktion zwischen einem Azid und einem DBCO (Dibenzocyclooctin-amin). Die beiden erstgenannten Kopplungen binden an ein freies primäres Amin des Antikörpers, während die Clickreaktion eine vorangehende Funktionalisierung des Antikörpers mit dem DBCO voraussetzt. Es wurden die drei entsprechenden AAZTA^5-Derivate synthetisiert (Abbildung 8) und radiochemisch mit ^{177}Lu evaluiert: AAZTA^5-Bz-NCS (**A**), AAZTA^5-en-QS (**B**) und AAZTA^5-TEG-N_3 (**C**). Abschließend wurde das AAZTA^5-Bz-NCS an den monoklonalen Antikörper mAk gekoppelt und ebenfalls mit ^{177}Lu evaluiert (AAZTA^5-Bz-NCS-mAb (**D**)).

Radiomarkierungen

Die Liganden **A**, **B** und **C** lieferten in Abhängigkeit vom Puffersystem und dem Chelator-zu-Lutetium-Verhältnis quantitative radiochemische Ausbeuten (>95 %) bei Raumtemperatur nach 10 min (Tabelle 2). Besonders die Markierungen in HEPES-Puffer wiesen selbst bei niedrigen Verhältnissen von 2 : 1 (Chelator : Nuklid) immer eine fast quantitative Markierung auf. Die Markierung des AAZTA^5-Bz-NCS-mAb (**D**) lieferte keine quantitative Ausbeute. Nach 15 Minuten konnte eine Ausbeute von 60 % erhalten werden, welche selbst nach einer Stunde nur auf 73 % anstieg (Tabelle 3).

Tabelle 3: Radiomarkierungsausbeuten (in %) des Derivativs **D** in HEPES-Puffer bei 25 °C (n=3; A(^{177}Lu)=50 MBq).

	t / min	**Ausbeute / %**
[^{177}Lu]Lu-D	15	63,7 ± 3,0
	30	69,3 ± 4,4
	45	70,4 ± 4,3
	60	72,7 ± 3,5

***In vitro*-Stabilität**

Die ^{177}Lu-Komplexe von **B** und **C** wiesen eine Stabilität von > 90 % nach 24 Stunden auf. Der ^{177}Lu-Komplex von **A** hingegen zeigte eine Degradierung auf 50 % in humanem Serum. Diese Beobachtung konnte auch bei **D** gemacht werden, welches ein Kopplungsprodukt von **A** ist. Wahrscheinlich übt die NCS-Bz-Einheit einen zu starken sterischen Einfluss auf den Diazepin-Ring aus und destabilisiert damit den Komplex, wodurch eine Transchelatierung in das Transferrin im humanen Serum möglich wird.

Allgemein scheint die Funktionalisierung **A** mit einem NCS-Ester nicht für das AAZTA^5 geeignet zu sein. Die Varianten **B** und **C** zeigen aber beste Voraussetzungen, eine milde Kopplung an Antikörper zu ermöglichen. Damit wäre ein milde Markierung der Antikörper möglich.

Hauptabschnitt 3: Teilprojekte

Dosimetrie mit [^{44}Sc]Sc-PSMA-617

Für die Anwendung der PRRT (*engl.:* peptide receptor radionuclide therapy, PRRT) mit ^{177}Lu Radiopharmaka wie [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 ist eine dosimetrische Abschätzung der zu injizierenden Aktivität mit einem PET-Nuklid von Nöten. Aktuell erfolgt die Dosimetrie mit dem [^{68}Ga]Ga-PSMA-617. Dies ist aber nur in einem gewissen Umfang möglich, da die kurze Halbwertszeit des ^{68}Ga nur PET-Aufnahmen über maximal 6 Stunden zulässt. In dieser Arbeit wurde das [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 zur Bestimmung der Dosimetrie an 5 Patienten getestet. Mit seiner längeren Halbwertszeit ermöglicht das ^{44}Sc eine bessere Abschätzung der zu injizierenden Aktivität (Messung 24 Stunden nach Applikation). Die Studie konnte zeigen, dass [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 geeignet ist zur Bestimmung der Dosimetrie und welche Organe bezüglich der Toxizität der limitierende Faktor waren. Aufgrund der niedrigen Anzahl Patienten wurde nahegelegt, die Studie mit einer größeren Menge an Patienten zu wiederholen und damit die gewonnenen Ergebnisse statistisch abzusichern.

Regeneration des ^{44}Ti/^{44}Sc-Generators

Der im Rahmen dieser Arbeit genutzte ^{44}Ti/^{44}Sc-Generator [13, 14] wurde wegen des Durchbruches von ^{44}Ti aufgearbeitet. In einem ersten Schritt wurde in eine neu angefertigte Säule aufgearbeiteter AG 1-X8 Kationentauscher gefüllt und die Säule für das Beladen mit dem ^{44}Ti vorbereitet. Anschließend wurde in mehr als 30 über fast 5 Wochen dauernden Elutions- und Rückelutionsschritten das ^{44}Ti von der alten Generatorsäule auf die neue Säule gespült. Dafür wurde ein eigens entwickeltes Schlauchsystem, welches die Freisetzung des ^{44}Ti (60 Jahre Halbwertszeit) komplett verhinderte, verwendet. Nach dem vollständigen Überführen des ^{44}Ti konnte die neue Säule in die Generator-Bleiburg eingebaut werden. Nach mehrfachem Eluieren der neuen Säule mit dem Standard Generator-Protokoll konnte ein Übertrag von > 90% der ^{44}Ti-Aktivität von der alten auf die neue Generatorsäule festgestellt werden. Weiterhin konnte der ^{44}Ti-Durchbruch auf die in der Literatur angegebenen Werte von < 200 Bq ohne Postprocessing gesenkt werden.

In vivo-Click-Anwendung von DATA^{5m}- und DOTA-PEG$_{11/12}$-Tetrazinen

Im Rahmen einer Kooperation mit Prof. Lewis des Momorial Sloan Kettering Cancer Centers wurde das DATA^{5m}-PEG$_{11}$-Tz synthetisiert und erfolgreich bei Raumtemperatur mit ^{68}Ga markiert. In ersten *in vivo*-Tierversuchen an gesunden Mäusen konnte eine rein renale Exkretion des [^{68}Ga]Ga-DATA^{5m}-PEG$_{11}$-Tz nachgewiesen werden. Anschließende *in vivo*-Click-Tierversuche an tumortragenden Mäusen mit dem TCO-funktionalisierten Antikörper 5B1-TCO zeigten eine gute Anreicherung im Tumorgewebe. Hierbei wurde das 5B1-TCO 72 Stunden vor Applikation des [^{68}Ga]Ga-DATA^{5m}-PEG$_{11}$-Tz injiziert. Trotz der guten Visualisierung des Tumors wurde ein zu hoher Background und Blutuptake festgestellt. Entsprechende Anpassungen des Spacers werden aktuell in New York getestet.

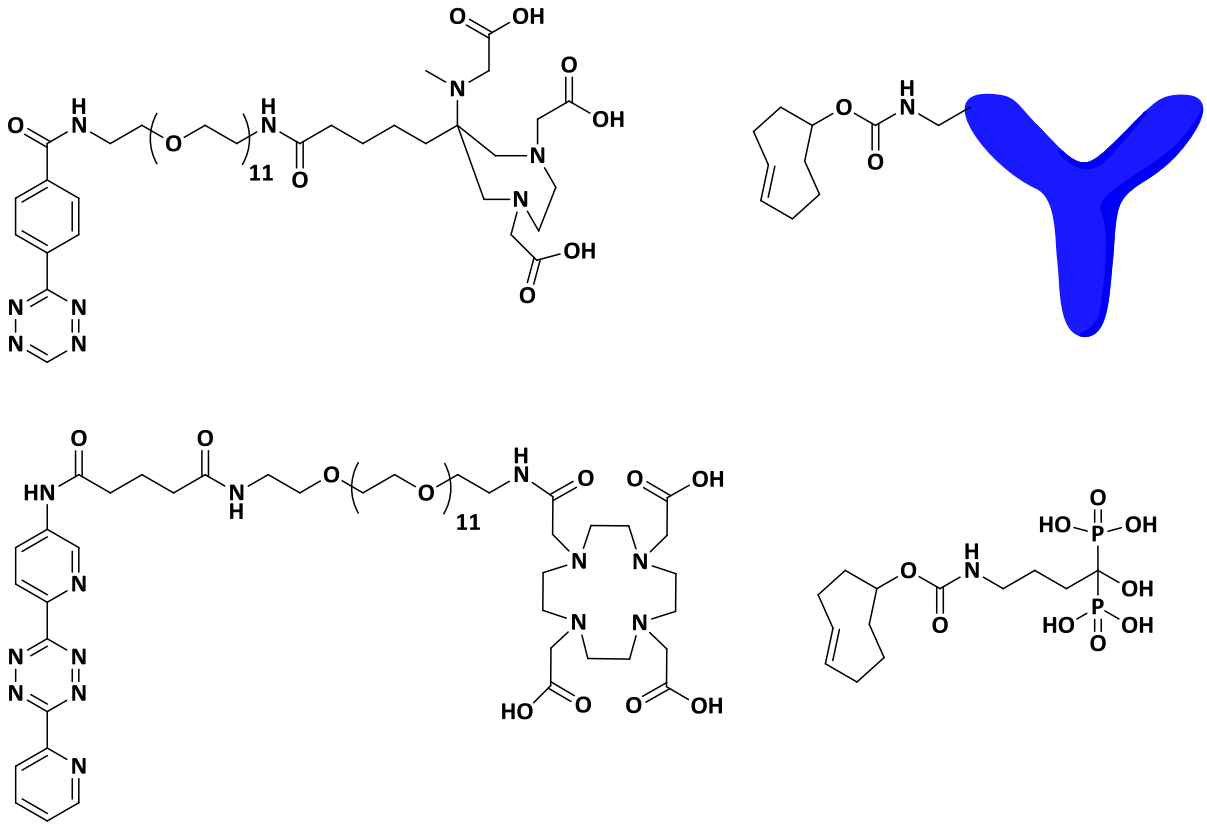


Abbildung 9: Angewendete Tetrazin- und TCO-Derivate: oben links DATA^{5m}-PEG$_{11}$-Tz und rechts das entsprechende TCO am Antikörper 5B1; unten links das DOTA-PEG$_{12}$-Tz und rechts das entsprechende TCO-Bisphosphonat

Das im Rahmen der Kooperation mit Prof. Herth evaluierte [^{44}Sc]Sc-DOTA-PEG$_{12}$-Tz konnte wie erwartet mit dem BP-TCO erfolgreich *in vivo* gute Ergebnisse zeigen und das *in vivo*-Click-Prinzip bestätigen. Es konnte ein selektive Knochenaufnahme in Schultergelenken (Humerus) und

Oberschenkelknochen (Femur) bei Vorabinjektion des BP-TCO festgestellt werden, wobei ohne BP-TCO eine reine renale Ausscheidung beobachtet wurde. In den PET-Aufnahmen konnte das Skelett und besonders die Gelenke bei Vorabinjektion von BP-TCO gut visualisiert werden (Abbildung 10).

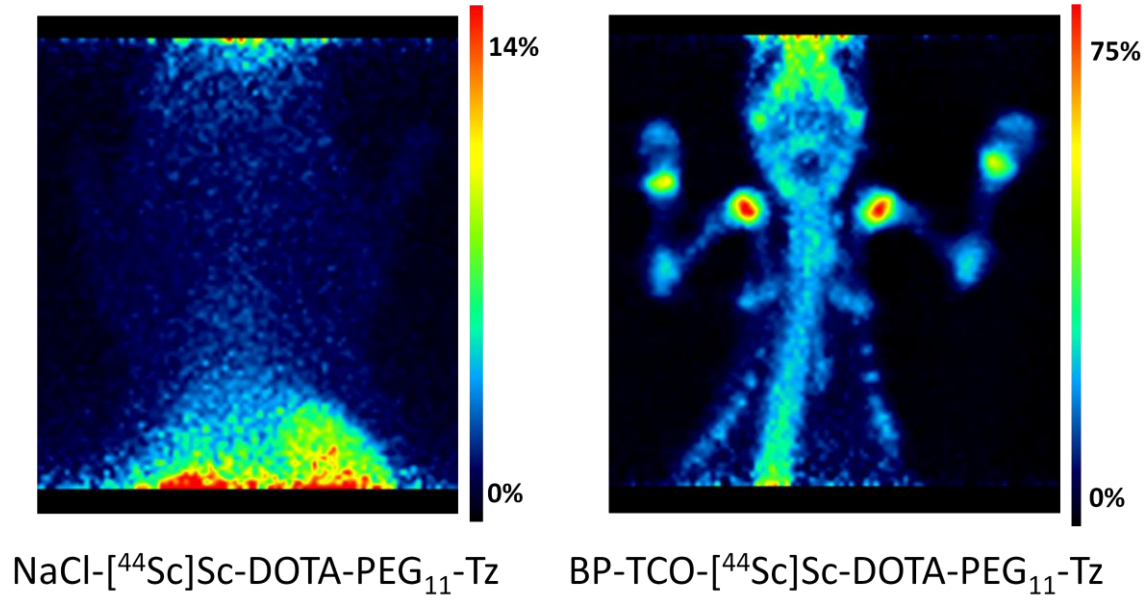


Abbildung 10: dynamische PET Aufnahmen von [^{44}Sc]Sc-DOTA-PEG$_{11}$-Tz ohne BP-TOC (links) und mit BP-TCO (rechts). 30 Minuten, 3,5 Stunden nach Injektion des [^{44}Sc]Sc-DOTA-PEG$_{11}$-Tz.

Evaluation des DATA-Chelators mit [^{18}F]AlF^{2+}

Eine erste nach Radio-HPLC erfolgreiche Radiomarkierung des DATA^{5m}-PEG$_{11}$-Tz mit [^{18}F]AlF^{2+} machte eine radiochemische Evaluation des ursprünglichen DATA^{5m} mit [^{18}F]AlF^{2+} in Mainz interessant. Dazu wurden zwei verschiedene Methoden zur Herstellung des [^{18}F]AlF^{2+}, verschiedene organische Lösungsmittel und sowohl Raumtemperatur als auch 95 °C Markierungstemperatur getestet. Nach der Wiederholung der Markierungen konnte festgestellt werden, dass das DATA^{5m} zwar bei 95 °C mit [^{18}F]AlF^{2+} einen Komplex ausbildet, dieser aber nicht stabil ist und sofort wieder zerfällt. Zwei Weiterentwicklungen des DATA^{5m} zum DADA^{5dm} und DADA^{A4m} analog zu dem neu entwickelten NODA [15] konnten keinerlei Markierung aufweisen, da ihre Struktur durch die Variation am exozyklischen Amin instabil wurde. Allgemein konnte kein passender Chelator für [^{18}F]AlF^{2+} gefunden werden.

Weiterführende *in vivo*-Evaluationen mit [^{225}Ac]Ac-DOTA^{ZOL}

Im Rahmen dieser Arbeit wurden weiterführende Tierversuche aufbauend auf den Ergebnissen von Pfannkuchen *et al.* durchgeführt. Es sollte durch Erhöhung der Precursormenge und Koinjektion von DTPA der festgestellte erhöhte Leberuptake untersucht werden. Die Ergebnisse zeigen, dass am Ende der Markierungen von Pfannkuchen *et al*. freies ^{225}Ac zugegen war und mit injiziert wurde, da sowohl die erhöhte Precursormenge als auch der Zusatz von DTPA den Leberuptake auf den selben Wert wie den anderer Organe (z. B. der Niere) normalisierte (Tabelle 4). Die Koinjektion von DTPA hatte zusätzlich einen positiven Effekt auf die Knochenaufnahme (Femur). Diese konnte bei gleichbleibender Aufnahme in allen anderen Organen um bis zu 30% erhöht werden. Dies hängt wahrscheinlich mit einer längeren Blutzirkulation zusammen, welche durch die starke und rein renale Exkretion des DTPA bedingt ist. Dieses sättigt die Niere über einen gewissen Zeitraum und verlängert so die Blutzirkulationszeit des DOTA^{ZOL} und damit dessen Anreicherung im Knochen.

Tabelle 4: Vergleich der Organaufnahme 24 h nach Injektion des [^{225}Ac]Ac-DOTA^{ZOL}: Links Pfannkuchen *et al*.; Mitte mit Zugabe von DTPA; Rechts bei höhere Precursormenge von 40 nmol. Angabe in SUV (±SD) über den Mittelwert aus 3-4 Tieren.

Organ	[^{225}Ac]Ac-DOTA^{ZOL} 24 h p.i.	[^{225}Ac]Ac-DOTA^{ZOL} mit DTPA 24 h p.i.	[^{225}Ac]Ac-DOTA^{ZOL} mit 40 nmol 24 h p.i.
Niere	0,32 (0,05)	0,31 (0,03)	0,25 (0,04)
Leber	0,73 0,09)	0,37 (0,06)	0,29 (0,08)
Femur gesamt	4,86 (0,36)	6,66 (0,61)	4,95 (0,77)

Weiterhin sollte der Verbleib der Tochternuklide *in vivo* untersucht werden. Dazu wurde der Messaufbau umgestellt und die Organe zusätzlich zu dem 24 Stunden Wert im Gleichgewicht auch direkt nach Entnahme gemessen. Diese Werte konnten auch für das ^{221}Fr mit nur knapp 5 Minuten Halbwertszeit auf den Todeszeitpunkt des Tieres korrigiert werden. Die erhaltenen Daten zeigen eine rein renale Exkretion des ^{221}Fr und der damit verbundenen Tochternuklide (Abbildung 11). Weitere Erkenntnisse konnten die ^{213}Bi-Werte direkt nach Organentnahme und im 24 Stunden Gleichgewicht liefern. Nach Korrektur der 24 Stunden Knochenwerte (Femur) auf den Todeszeitpunkt mit der Halbwertszeit des ^{225}Ac konnte die Aktivitätsmenge erhalten werden, welche zum Todeszeitpunkt theoretisch vorhanden hätte sein müssen (sofern kein Abtransport stattgefunden hat). Durch verrechnen mit dem effektiv vorhandenen Werte, konnte gezeigt werden, dass 83 % der

theoretischen ^{213}Bi-Aktivität vorhanden war. Damit sind 17 % des ^{221}Fr, ^{213}Bi und aller damit verbundenen Tochternuklide nicht am Knochen verblieben.

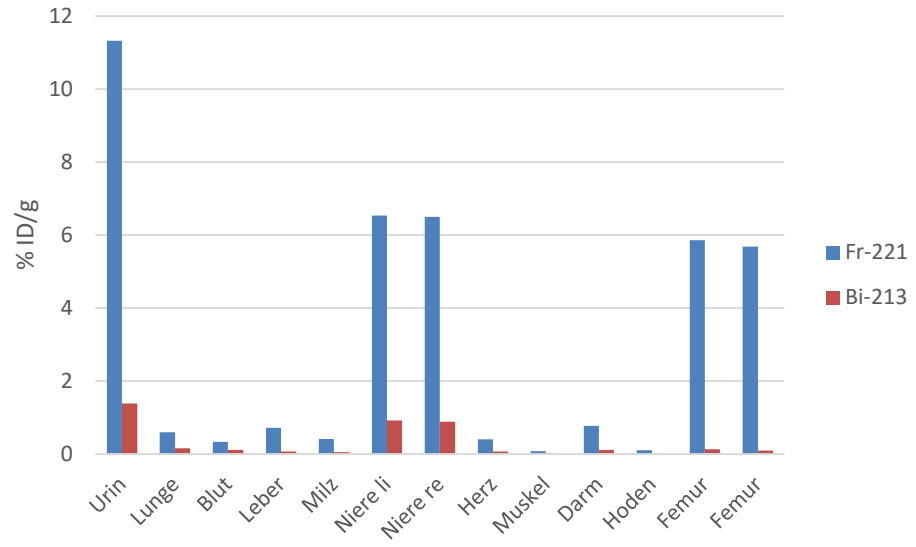


Abbildung 11: %ID/g (% injizierte Aktivität / Organgewicht in Gramm) der Tochternuklide ^{221}Fr und ^{213}Bi nach Abzug der ^{225}Ac

Ausblick

Der in dieser Arbeit verwendete ^{68}Ga-Chelator DATA^{5m} konnte durch die guten *in vitro*-und *in vivo*-Ergebnisse seiner TOC- und PSMA-Derivate seine Relevanz als möglicher Chelator für milde ^{68}Ga-Markierungen zeigen. Hierbei stellt das [^{68}Ga]Ga-DATA^{5m}-PEG$_{11}$-Tz eine der vielversprechendsten Anwendungen in Zukunft dar. Wie beim DOTA-PEG$_{11}$-Tz sichtbar wurde, sind auch Tetrazine temperaturempfindlich, was die Möglichkeit zur milden Radiomarkierung des DATA^{5m}-PEG$_{11}$-Tz hervorhebt. Durch die *in vivo*-Click-Anwendung kann der DATA^{5m}-Chelator trotz seiner aktuellen Beschränkung auf ^{68}Ga auch für Antikörper oder andere Targetmoleküle mit langsamer Pharmakokinetik eingesetzt werden.

Der AAZTA^5-Chelator und seine Derivate konnten in dieser Arbeit besonders als optimale Chelatoren für ^{44}Sc mit einer sehr hohen Stabilität überzeugen. In Kombination mit den guten Ergebnissen der ^{117}Lu-Markierungen besitzt das AAZTA^5 optimale Voraussetzungen für den Einsatz als Chelator mit milden Markierungseigenschaften für die theranostische Anwendung. Wie die erste Kopplung an den Antikörper mAk zeigte, sind die Auswahl einer guten Kopplungsstrategie und eine Optimierung des Spacers nächste Schritte den AAZTA-Chelator auch erfolgreich für die Radiomarkierung von Antikörpern einzusetzen. Hierbei ist die AAZTA^5-en-QS der aktuell vielversprechendste Kandidat.

Literatur 7.0

1. Rösch F. Past, present and future of ^{68}Ge/^{68}Ga generators. Appl Radiat Isot. 2013;76:24-30.

2. Roesch F, J. Riss P. The Renaissance of the ^{68}Ge/^{68}Ga Radionuclide Generator Initiates New Developments in ^{68}Ga Radiopharmaceutical Chemistry. Curr Top Med Chem. 2010;10(16):1633-1668.

3. Seemann J, Waldron BP, Roesch F, Parker D. Approaching “kit-type” labelling with ^{68}Ga: The DATA chelators. ChemMedChem. 2015;10(6):1019-1026.

4. Seemann J, Waldron B, Parker D, Roesch F. DATATOC: a novel conjugate for kit-type ^{68}Ga labelling of TOC at ambient temperature. EJNMMI Radiopharm Chem. 2017;1(1):4.

5. Benešová M, Schäfer M, Bauder-Wüst U, et al. Preclinical Evaluation of a Tailor-Made DOTA-Conjugated PSMA Inhibitor with Optimized Linker Moiety for Imaging and Endoradiotherapy of Prostate Cancer. J Nucl Med. 2015;56(6):914-920.

6. Baum RP, Kulkarni HR. Theranostics: From molecular imaging using Ga-68 labeled tracers and PET/CT to personalized radionuclide therapy - the bad berka experience. Theranostics. 2012;2(5):437-447.

7. Baum RP, Kulkarni HR, Schuchardt C, et al. ^{177}Lu-Labeled Prostate-Specific Membrane Antigen Radioligand Therapy of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: Safety and Efficacy. J Nucl Med. 2016;57(7):1006-1013.

8. Breeman WAP, Jong M, Visser TJ, Erion JL, Krenning EP. Optimising conditions for radiolabelling of DOTA-peptides with ^{90}Y, ^{111}In and ^{177}Lu at high specific activities. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2003;30(6):917-920.

9. Kwekkeboom DJ, Mueller-Brand J, Paganelli G, et al. Overview of results of peptide receptor radionuclide therapy with 3 radiolabeled somatostatin analogs. J Nucl Med. 2005;46(1):62S-66S.

10. Baum RP, Rösch F. Theranostics, Gallium-68, and Other Radionuclides.; 2013.

11. Eder M, Schäfer M, Bauder-Wüst U, et al. ^{68}Ga-complex lipophilicity and the targeting property of a urea-based PSMA inhibitor for PET imaging. Bioconjug Chem. 2012;23(4):688-697.

12. Eppard E, de la Fuente2 A, Benešová M, et al. Clinical translation and first in-human use of [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 for pet imaging of metastasized castrate-resistant prostate cancer. Theranostics. 2017;7(18).

13. Pruszyński M, Loktionova NS, Filosofov D V., Rösch F. Post-elution processing of ^{44}Ti/^{44}Sc generator-derived ^{44}Sc for clinical application. Appl Radiat Isot. 2010;68(9):1636-1641.

14. Filosofov BD V, Loktionova NS, Rösch F. A ^{44}Ti/^{44}Sc radionuclide generator for potential application of ^{44}Sc-based PET-radiopharmaceuticals. 2010;156:149-156.

15. Shetty D, Choi SY, Jeong JM, et al. Stable aluminium fluoride chelates with triazacyclononane derivatives proved by X-ray crystallography and ^{18}F-labeling study. Chem Commun. 2011;47(34):9732-9734.